

Université de Sherbrooke

Évaluation de la distribution de glycosaminoglycans par spectrométrie de masse en tandem dans les tissus de souris atteintes de mucopolysaccharidose de type II

Par
Iskren Menkovic
Programme de Sciences des radiations et imagerie biomédicale

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)
en Sciences des radiations et imagerie biomédicale

Sherbrooke, Québec, Canada
Décembre 2018

Membres du jury d'évaluation

Christiane Auray-Blais, LL.M., Ph.D., Département de pédiatrie, Université de Sherbrooke
Joe TR Clarke, MD, Ph.D., Département de pédiatrie, Université de Toronto
Darel Hunting, Ph.D., Département de médecine nucléaire et radiobiologie, Université de Sherbrooke

© Iskren Menkovic, 2018

À Snjezana et Ermin

À Christiane

RÉSUMÉ

Évaluation de la distribution de glycosaminoglycans par spectrométrie de masse en tandem dans les tissus de souris atteintes de mucopolysaccharidose de type II

Par : Iskren Menkovic

Programme de Sciences des radiations et imagerie biomédicale

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en Sciences des radiations et imagerie biomédicale, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Les mucopolysaccharidoses (MPSs) sont des maladies lysosomales causées par des mutations au niveau des gènes codant pour des enzymes impliquées au niveau du catabolisme des glycosaminoglycans (GAGs). Plus précisément, la MPS II est un syndrome multisystémique causée par une mutation du gène *IDS*, localisé sur le chromosome X, qui entraîne une déficience au niveau de l'enzyme iduronate-2-sulfatase. Ce défaut enzymatique perturbe le catabolisme de l'héparan sulfate (HS) et du dermatan sulfate (DS) entraînant leur accumulation dans différents tissus et liquides biologiques. Il existe deux formes de la MPS II, soit une forme non-neuronopathique (atténuée) et une forme neuronopathique (sévère), cette dernière entraînant une atteinte neurologique. Les autres manifestations progressives incluent généralement des complications au niveau de différents systèmes, tels le système respiratoire, cardiaque, squelettique et au niveau des tissus conjonctifs. La thérapie enzymatique de remplacement (TER) est l'un des traitements actuellement disponibles qui altère la progression de la maladie sans pour autant guérir le patient. Dans le cadre de la présente étude, l'objectif principal était d'étudier la distribution des biomarqueurs de la MPS II chez un modèle animal, soit la souris. Pour ce faire, les tissus de souris furent homogénéisés à l'aide d'un homogénéisateur à billes de céramique puis évaporés sous jet d'azote. Une réaction de méthanolyse utilisant le MeOH/HCl 3N a permis de générer des disaccharides à partir de GAGs. Finalement, les échantillons furent resuspendus dans une solution organique pour l'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Cette méthodologie a été validée et elle a permis d'évaluer la distribution de l'HS et du DS au niveau du foie, du cerveau, du cœur, des reins, du petit intestin, de la rate, des poumons ainsi que de l'urine et du plasma chez des souris MPS II traitées par TER, non traitées, ainsi que des souris contrôles saines. Nos résultats montrent une grande variabilité au niveau de la distribution de HS et du DS dans les tissus et les liquides biologiques. La concentration la plus élevée de HS a été mesurée au niveau du foie, suivis des reins, de la rate, des poumons, du petit intestin du coeur, et du cerveau alors que pour le DS, la concentration la plus importante a été observée au niveau des poumons, suivis du foie, de la rate, du cœur, des reins, du petit intestin et du cerveau. La TER s'est avérée efficace pour réduire la concentration des deux biomarqueurs dans tous les tissus, sauf au niveau du cerveau. En conclusion, la méthode développée dans le cadre de cette étude est robuste et pourrait être un outil de choix pour l'analyse des tissus de différents organes de souris afin d'évaluer l'efficacité de traitements futurs.

Mots clés : Maladie de Hunter, mucopolysaccharidose de type II, spectrométrie de masse en tandem, thérapie enzymatique de remplacement, biomarqueurs, maladies lysosomales

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des abréviations.....	x
Introduction.....	1
1.1 Le lysosome.....	1
1.1.1 Le lysosome: fonctions et utilités.....	1
1.1.2 La biogénèse du lysosome	1
1.1.3 Les maladies lysosomales	2
1.1.4 La classification des maladies lysosomales.....	3
1.2 Les mucopolysaccharidoses.....	8
1.2.1 Le catabolisme biochimique et les mécanismes cellulaires.....	8
1.2.2 Les manifestations cliniques.....	13
1.2.3 La fréquence des différents types de mucopolysaccharidoses.....	14
1.3 La mucopolysaccharidose de type II.....	14
1.3.1 Les caractéristiques de la mucopolysaccharidose de type II.....	14
1.3.2 Les manifestations cliniques de la MPS II	15
1.3.2.1 Les anomalies respiratoires.....	15
1.3.2.2 Les anomalies gastro-intestinales.....	16
1.3.2.3 Les anomalies cardiaques.....	16
1.3.2.4 Les anomalies squelettiques.....	16
1.3.2.5 Les anomalies neurologiques.....	17
1.3.2.6 Les anomalies orthodontiques.....	17
1.3.3 Les dosages en laboratoire	17
1.3.4 La forme neuronopathique et la forme non-neuronopathique de la MPS II.....	18
1.3.5 Les traitements.....	20
1.3.5.1 Les traitements symptomatiques.....	20
1.3.5.2 La transplantation de cellules souches.....	20
1.3.5.3 La thérapie génique.....	21

1.3.5.4	La thérapie de réduction de substrat.....	21
1.4	La thérapie enzymatique de remplacement.....	21
1.4.1	Le concept de la thérapie enzymatique de remplacement.....	22
1.4.2	La procédure médicale d'administration.....	22
1.4.3	Étude sur l'efficacité.....	23
1.5	Les biomarqueurs.....	24
1.5.1	La définition d'un biomarqueur.....	24
1.5.2	Les caractéristiques d'un biomarqueur idéal.....	24
1.5.3	Les biomarqueurs de la mucopolysaccharidose de type II.....	25
1.6	La présentation du projet de recherche.....	25
1.6.1	Problématique et hypothèse	25
1.6.2	Les objectifs du projet de recherche.....	26
1.6.3	Les visées du projet de recherche.....	27
1.7	Le modèle animal.....	27
1.7.1	Le traitement du modèle animal pour ce projet.....	28
1.8	L'extraction des glycosaminoglycans.....	29
1.9	La méthanolyse.....	31
1.10	La chromatographie liquide.....	35
1.10.1	L'utilité de la chromatographie liquide.....	35
1.10.2	Les principes de la séparation.....	36
1.10.3	L'effet de matrice.....	43
1.11	La spectrométrie de masse.....	46
1.11.1	Les principes de base.....	46
1.11.2	Les caractéristiques du spectromètre de masse utilisé.....	48
1.11.2.1	Les caractéristiques du mode d'ionisation.....	49
1.11.2.2	Les caractéristiques de l'analyseur de masse utilisé pour ce projet.....	50
1.11.3	L'optimisation des paramètres.....	52
1.9	La validation d'une méthode	55
1.9.1	Les paramètres de validation.....	55
	Article 1.....	58
	Discussion.....	93
	Conclusion.....	95

Remerciements.....	96
Liste des références.....	98

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Structure chimique de la molécule d'héparan sulfate	9
Figure 2	Catabolisme de l'héparan sulfate.....	11
Figure 3	Structure chimique de la molécule de dermatan sulfate	12
Figure 4	Catabolisme du dermatan sulfate.....	13
Figure 5	Homogénéisation des tissus: A) Homogénéisateur à billes de céramique Omni Bead Ruptor (Omni International™); B) Billes de céramique utilisée pour broyer le tissu dans un tube approprié à l'homogénéisation; C) Homogénat d'intestin (25 mg/mL).....	30
Figure 6	Effets de la méthanolyse sur l'héparan sulfate et le dermatan sulfate. *Correspond à une réaction de deutériométhanolyse utilisée pour la synthèse des standards internes deutérés de HS et de DS	33
Figure 7	Cinétique de la réaction de la méthanolyse pour l'héparan sulfate et le dermatan sulfate. La réponse correspond au rapport entre l'aire sous la courbe mesurée pour l'analyte (héparan sulfate ou dermatan sulfate) et son standard interne (héparan sulfate et dermatan sulfate deutérés).....	34
Figure 8	Ions précurseurs et ions produits pour l'héparan sulfate et le dermatan sulfate par spectrométrie de masse en tandem.....	35
Figure 9	Spectre de masse obtenu à l'aide d'un quadripôle-temps de vol d'un homogénat de foie de souris afin d'identifier l'interférent présent dans la matrice de foie	39
Figure 10	La colonne CORTECS HILIC permet de séparer l'interférent présent de manière endogène à différentes concentrations dans les tissus de souris du standard interne deutéré d'héparan sulfate	41
Figure 11	Séparation chromatographique de 6 µg de dermatan sulfate et de chondroïtine sulfate considérant que ces molécules ont des propriétés physico-chimiques similaires et possèdent les mêmes ions précurseurs et ions produits.....	42
Figure 12	Séparation chromatographique de l'héparan sulfate, du dermatan sulfate ainsi que de leurs standards internes deutérés respectifs.....	43

Figure 13 Coupe schématique d'un spectromètre de masse.....	47
Figure 14 Xevo TQ-S Micro, spectromètre de masse en tandem (à gauche) couplé à un système de chromatographie liquide à ultra haute performance Acquity I-Class (à droite) (Waters Corp.).....	48
Figure 15 Principes de l'ionisation par électronébulisation positive.....	50
Figure 16 Principes de fonctionnement d'un quadripôle. Les ions sont sélectionnés grâce à un champ électrique créé à l'aide de radiofréquences ainsi que de courant électrique	51
Figure 17 Optimisation des paramètres du voltage de la cellule à collisions pour l'HS et le DS. Les paramètres optimaux pour le voltage de collision sont de 14 et 8 volts pour l'HS et le DS, respectivement	54
Figure 18 Optimisation des paramètres du voltage du cône pour l'HS et le DS. Les paramètres optimaux sont de 16 et 32 volts pour l'HS et le DS, respectivement	54

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Classification des maladies lysosomales basée principalement sur la nature du substrat qui s'accumule au niveau du lysosome	5
Tableau 2 Classification des maladies lysosomales basée sur la nature du défaut moléculaire entraînant une accumulation de substrat	7
Tableau 3 Optimisation de la solution d'homogénéisation des tissus. La réponse mesurée correspond au rapport de l'aire sous la courbe mesurée pour l'analyte sur l'aire sous la courbe mesurée du standard interne.....	31
Tableau 4 Paramètres chromatographiques utilisés pour l'analyse d'un homogénat de foie par Q-TOF.....	38
Tableau 5 Paramètres MS/MS utilisés pour l'analyse d'un homogénat de foie par Q-TOF.....	39
Tableau 6 Paramètres chromatographiques utilisés pour l'analyse d'un homogénat de foie par UPLC-MS/MS (Xevo TQ-S micro, Waters Corp.).....	40
Tableau 7 Évaluation de l'effet de matrice dans différents tissus de souris avant l'optimisation de la méthodologie	45
Tableau 8 Paramètres de validation de la méthode quantitative développée en spectrométrie de masse dans le cadre de ce projet.....	57

Liste des abréviations

ATP	Adénosine triphosphate
CLN2	Protéase lysosomale (Tripeptidyl-peptidate I)
CS	Chondroïtine sulfate
DMB	1-9 diméthyl-méthylène bleu
DS	Dermatan sulfate
ESI	Électronébulisation
FDA	Food and Drug Administration
GAGs	Glycosaminoglycans
GlcNac	N-acétyl-galactosamine
GM1	Monosialotétrahexosylganglioside
HILIC	Chromatographie d'interactions hydrophiles
HS	Héparan sulfate
I2S	Iduronate-2-sulfatase
LAMP2	Protéine membranaire associée au lysosome
<i>m/z</i>	Rapport masse sur charge
MPS	Mucopolysaccharidose
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
NPC	Niemann-Pick type C
NOD SCID	Souris non obèses diabétiques immunodéficientes
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
TER	Thérapie enzymatique de remplacement
TOF	Spectromètre de masse en temps de vol
Q-Tof	Quadripôle couplé à une spectromètre de masse en temps de vol
Rab27A	Protéine membranaire impliquée dans le transport
UDP	Uridine diphosphate
UPLC	Chromatographie liquide ultra-performante
UPLC-MS/MS	Chromatographie liquide ultra-performante couplée à un spectromètre de masse en tandem
UPLC-Q-TOF	Chromatographie liquide ultra-performante couplée à un spectromètre de masse de type temps de vol

INTRODUCTION

1.1 Le lysosome

Le biochimiste et médecin d'origine belge, Christian de Duve, découvrit et attribua en 1955 le nom de « lysosome », à cet organite cellulaire. Celui-ci peut dégrader un nombre important de macromolécules endogènes et exogènes grâce aux nombreuses hydrolases qui y sont présentes (Solomon et Muro, 2017). Ainsi, un dérèglement, même très léger, au niveau du fonctionnement du lysosome peut entraîner de nombreuses conséquences sur l'ensemble de l'organisme.

1.1.1 Lysosome: fonctions et utilités

Le lysosome est un organite de forme sphérique ayant une taille de 0,5 μm à 1,2 μm présent dans la plupart des cellules végétales et animales (Appelqvist *et al.*, 2013). Chez l'homme, les lysosomes sont présents en une centaine de copies dans toutes les cellules du corps, sauf au niveau des hématies. Deux classes de protéines distinctes sont présentes au niveau du lysosome soit les hydrolases acides, au nombre d'environ 50, activées par le pH acide compris entre 4,5 et 5 au niveau du lumen du lysosome et les protéines membranaires, qui sont au nombre de 25 (Mindell, 2012). Ces enzymes et protéines sont toutes essentielles au lysosome pour que ce dernier puisse accomplir ses fonctions. Celles-ci consistent notamment à dégrader des macromolécules, à recycler des composantes de la cellule, à procéder à des fonctions relatives à la mort et à la prolifération cellulaire ainsi qu'à la défense de la cellule face aux pathogènes (Saftig et Klumperman, 2009).

1.1.2 La biogenèse du lysosome

La formation du lysosome débute au niveau du réticulum endoplasmique rugueux où les ribosomes synthétisent les enzymes qui deviendront les hydrolases acides. En plus de l'assemblage des divers acides aminés, les futures hydrolases subissent également des modifications post-traductionnelles telles que le clivage de la séquence signal ainsi que la glycosylation de certaines asparagines bien précises (Kornfeld, 1989). Ces résidus glycosylés favorisent les interactions entre les hydrolases alors synthétisées et les chaperons, ce qui permet à l'enzyme d'atteindre une conformation adéquate pour être exportée vers le côté cis

de l'appareil de Golgi. À l'entrée de l'appareil de Golgi, les hydrolases sont prises en charge par deux enzymes ayant pour rôle d'ajouter un groupement mannose-6-phosphate. Dans un premier temps, l'UDP-N-acétylglucosamine 1-phosphotransférase (également connue sous le nom de GlcNAc-1-phosphotransférase) catalyse le transfert d'un groupement UDP-GlcNAc-1-phosphate sur un carbone en position 6 de certains groupements mannose présents au niveau des oligosaccharides riches en celui-ci. Le substrat alors généré est pris en charge par la N-acétylglucosamine-1-phosphodiester α -N-acétyl-glucosaminidase qui a pour fonction de retirer le groupement terminal N-acétylglucosamine, ce qui exposera le groupement mannose-6-phosphate qui agit comme signal de reconnaissance. Au niveau du trans-Golgi, des ligands se lieront au niveau des récepteurs mannose-6-phosphate, puis le complexe comprenant l'hydrolase ainsi que les complexes ligands/récepteurs qui y sont rattachés seront enrobés dans des vésicules de transport pour être livrés aux endosomes et lysosomes. Le pH acide généré par des pompes à proton ATPase des endosomes, une structure cellulaire originant de la membrane cellulaire, activeront alors les hydrolases menant à la création du lysosome (Luzio *et al.*, 2014).

1.1.3 Les maladies lysosomales

Le concept de maladie de surcharge lysosomale a été introduit en 1965 par Heri-Géry Hers, médecin et chercheur, afin d'expliquer comment l'absence d'une enzyme, en l'occurrence l' α -glucosidase, pouvait mener à une maladie grave ayant de nombreux symptômes et complications multisystémiques aujourd'hui connue sous le nom de maladie de Pompe (Neufeld, 1991). Dr Hers a notamment observé que le substrat non dégradé en raison de la déficience enzymatique s'accumule au niveau des lysosomes entraînant un accroissement de la taille de plusieurs organelles cellulaires. Ce nouveau concept a par la suite permis de découvrir, voire d'élucider de nombreuses autres conditions ayant des mécanismes pathologiques reliés à un défaut de dégradation de substrat au niveau du lysosome, que ce soit en raison de la déficience de l'une des hydrolases ou bien en raison d'un défaut protéique au niveau de lysosome (Neufeld, 1991). Bien que la maladie de Pompe fut à l'origine de cette classe de maladies génétiques, il est faux de penser qu'il s'agit de la première maladie lysosomale découverte. De fait, c'est plutôt la maladie de Gaucher qui fut la première maladie lysosomale décrite en 1882 par un médecin français, Philippe Gaucher (Mehta, 2006). Puis, 16 ans plus tard, soit en 1898, une seconde maladie lysosomale a été décrite, soit la maladie

de Fabry (OMIM 301500), par William Anderson et Johannes Fabry, deux médecins d'origine anglaise et allemande travaillant indépendamment l'un de l'autre (Mehta, 2006). Il est toutefois important de mentionner qu'à l'époque, seules les anomalies macroscopiques ont été observées. Ainsi, les individus à l'origine de ces découvertes n'avaient pas élucidé les mécanismes pathologiques au niveau moléculaire. De nos jours, les maladies lysosomales comprennent environ une cinquantaine de maladies menant à une accumulation de substrat au niveau des lysosomes. Ces maladies, pour la plupart autosomiques récessives, sont caractérisées par une très grande variabilité phénotypique et génotypique de même que des atteintes multi-systémiques. Il est toutefois important de mentionner que bien que la très grande majorité des maladies lysosomales soient autosomiques récessives, il en existe trois qui sont liées au chromosome X, soit la maladie de Fabry, la mucopolysaccharidose de type II (MPS II) ou maladie de Hunter (OMIM 309900) ainsi que la maladie de Danon (OMIM 300257) (Staretz-Chacham *et al.* 2009). Lorsque considérées individuellement, les maladies lysosomales sont rares. Effectivement, la maladie lysosomale la plus fréquente est la maladie de Gaucher, une condition qui touche 1 individu sur 57 000, mais dont l'incidence peut atteindre 1 sur 1000 au niveau de la population juive ashkénaze. Toutefois, lorsque considérées dans un ensemble, les maladies lysosomales sont relativement fréquentes (Hult *et al.*, 2014; Meikle *et al.*, 1999). Dans certains pays du monde tel que les Émirats Arabes Unis, l'incidence des maladies lysosomales atteint 1 cas par 4 200 naissances (Kingma *et al.*, 2015). D'autres études portent toutefois à croire que ce chiffre pourrait être encore plus important. Effectivement, une étude réalisée par l'équipe du Dr Dau-Ming Niu à Taipei, Taiwan portant sur le dépistage populationnel de la maladie de Fabry chez les nouveau-nés a relevé une incidence de 1 sur 1 600 pour la variante cardiaque de la maladie (Lin *et al.*, 2009). Il est donc également possible que certaines variantes pour d'autres maladies lysosomales soient difficiles à identifier en clinique, faisant en sorte de sous-estimer l'incidence réelle des maladies lysosomales.

1.1.4 La classification des maladies lysosomales

Les différentes maladies lysosomales peuvent être classifiées en 6 groupes distincts. Cette classification se base sur la nature du substrat accumulé au niveau du lysosome (Tableau 1) ou bien sur la nature du défaut moléculaire entraînant un dysfonctionnement au niveau du lysosome (Tableau 2). Premièrement, les sphingolipidoses comprennent notamment la

maladie de Fabry ainsi que les trois types associés à la maladie de Gaucher (OMIM 230800, 230900, 23100), les mucopolysaccharidoses, dont la maladie de Hunter (mucopolysaccharidose de type II, MPS II; OMIM 309900), les oligosaccharidoses et les glycoprotéinoses dont fait partie la maladie de Pompe. Ensuite viennent les maladies causées par un défaut des protéines intégrales membranaires qui comprennent notamment la maladie de Danon et finalement vient une classe dite « autres » dont fait partie la maladie de Batten (Futerman et Meer, 2004).

Tableau 1. Classification des maladies lysosomales basée principalement sur la nature du substrat qui s'accumule au niveau du lysosome.

Sphingolipidoses		
Maladies	Protéines déficientes	Substrats accumulés
Maladie de Fabry Maladie de Farber Maladie de Gaucher Maladie de Niemann-Pick A/B Déficiência en l'activateur des sphingolipides GM1 gangliosides GM2 gangliosides (Tay-Sachs) GM2 gangliosides (Sandhoff) GM2 gangliosides	α -Galactosidase A Ceramidase β -Glucosidase Sphingomyélinase Activateur des sphingolipides β -Galactosidase β -Hexosaminidase A β -Hexosaminidase A/B Activateur de GM2	Glycosphingolipides Céramide Glucosylcéramide Sphingomyéline Glycolipides GM1 ganglioside GM2 ganglioside et glycosphingolipides GM2 ganglioside et glycosphingolipides GM2 ganglioside et glycosphingolipides
Mucopolysaccharidoses		
Maladies	Protéine déficientes	Substrats accumulés
MPS I (Hurler, Scheie, Hurler/Scheie) MPS II (Hunter) MPS IIIA (Sanfilippo) MPS IIIB (Sanfilippo) MPS IIIC (Sanfilippo) MPS IIID (Sanfilippo) MPS IV (Morquio-A) MPS IV (Morquio-B) MPS VI (Maroteaux-Lamy) MPS VII (Sly)	α -Iduronidase Iduronate-2-sulphatase Héparan N-sulfatase N-Acétyle- α -glucosaminidase Acétyle-CoA- α -glucosaminide acétyltransférase N-Acetylglucosamine-6-sulfatase Galactose-6-sulfatase β -Galactosidase Arylsulfatase B β -Glucuronidase	Dermatan sulfate et héparan sulfate Dermatan sulfate et héparan sulfate Héparan sulfate Héparan sulfate Héparan sulfate Héparan sulfate Kératan sulfate et chondroïtine sulfate Kératan sulfate Dermatan sulfate Dermatan sulfate, héparan sulfate et chondroïtine sulfate
Oligosaccharidoses et les glycoprotéinoses		
Maladie	Protéines déficientes	Substrats accumulés
Maladie de Pompe	α -Glucosidase	Glycogène
Défaut des protéines intégrales membranaires		
Maladies	Protéines déficientes	Substrats accumulés
Cystinose Maladie de Danon Maladie de stockage de l'acide sialique libre Mucopolipidose IV Niemann-Pick de type C	Cystinosine LAMP2 Sialine Mucolipine-1 NPC 1 et 2	Cystine Glycogène Acide sialique Lipides et acides mucopolysaccharides Cholestérol et sphingolipides
Autres		
Maladies	Protéines déficientes	Substrats accumulés
Galactosialidose Mucolipidoses Déficit multiple en sulfatases Céroïde-lipofuscine neuronale 1 Céroïde-lipofuscine neuronale 2 Céroïde-lipofuscine neuronale 3	Cathepsine A N-acetylglucosamine-1-phosphotransférase FGE Palmitoylthioestérase-1 CLN2 Transporteur d'arginine	Sialyloligosaccharides Oligosaccharides, mucopolysaccharides et lipides Sulfatides Lipofuscine Lipofuscine Lipofuscine

Bien que ce type de classification soit encore très utilisé de nos jours, des études sur les bases moléculaires à l'origine des différentes maladies ont permis de créer une nouvelle classification qui donne davantage de poids à la nature du défaut moléculaire à l'origine de la condition (Winchester, 2012). Ainsi, selon cette classification alternative, les différentes maladies lysosomales peuvent être classées en 8 catégories, soit les sphingolipidoses et les défauts d'activation des sphingolipides, les mucopolysaccharidoses, les glycoprotéinoses et oligosaccharidoses, les autres défauts enzymatiques, les défauts post-traductionnels des enzymes lysosomales, les défauts des membranes lysosomales et défauts de transport, les lipofuscinoses neuronales céréoïdes et finalement, les défauts de la biogenèse du lysosome et des organelles reliées au lysosome.

Tableau 2. Classification des maladies lysosomales basée sur la nature du défaut moléculaire entraînant une accumulation de substrat.

Sphingolipidoses incluant les défauts des activateurs des sphingolipides		
Maladies	Protéines déficientes	Substrats accumulés
Maladie de Fabry Maladie de Farber Maladie de Gaucher Maladie de Niemann-Pick A/B GM1 gangliosides GM2 gangliosides (Tay-Sachs) GM2 gangliosides (Sandhoff) GM2 gangliosides	α -Galactosidase A Céramidase β -Glucosidase Sphingomyélinase β -Galactosidase β -Hexosaminidase A β -Hexosaminidase A/B Activateur de GM2	Glycosphingolipides Céramide Glucosylcéramide Sphingomyéline GM1 ganglioside GM2 ganglioside et glycosphingolipides GM2 ganglioside et glycosphingolipides GM2 ganglioside et glycosphingolipides
Mucopolysaccharidoses		
Maladies	Protéines déficientes	Substrats accumulés
MPS I (H, S, H-S) MPS II (Hunter) MPS IIIA (Sanfilippo) MPS IV (Morquio-A) MPS IV (Morquio-B) MPS VI (Maroteaux-Lamy)	α -Iduronidase Iduronate-2-sulphatase Héparan N-sulfatase Galactose-6-sulfatase β -Galactosidase Arylsulfatase B	Dermatan sulfate et héparan sulfate Dermatan sulfate et héparan sulfate Héparan sulfate Kératan sulfate et chondroïtine sulfate Kératan sulfate Dermatan sulfate
Oligosaccharidoses et les glycoprotéinoses		
Maladies	Protéines déficientes	Substrats accumulés
Maladie de Pompe Aspartylglucosaminémie Fucosidose α -Mannosidose	α -Glucosidase Aspartylglucosaminidase α -L-Fucosidase α -Mannosidase	Glycogène Glycosyl-asparagines Oligos/glycopeptides Oligonucléotides
Autres défauts enzymatiques		
Maladies	Protéines déficientes	Substrats accumulés
Pycnodysostose	Cathepsine K	Collagène et protéines du système osseux
Défauts post-traductionnels des enzymes lysosomales		
Maladies	Protéines déficientes	Substrats accumulés
Déficit multiple en sulfatase Mucopolipidose II α/β / III α/β	FGE N-acétylglucosamine-1-phosphotransférase	Sulfatides, GAGs, glycolipides Oligonucléotides, GAGs, lipides
Défaut des protéines membranaires		
Maladies	Protéines déficientes	Substrats accumulés
Cystinose Maladie de Danon Mucopolipidose IV Maladie Niemann-Pick de type C	Cystinosine LAMP2 Mucopolipine-1 NPC 1 et 2	Cystine Glycogène Lipides et mucopolysaccharides Cholestérol et sphingolipides
Céroïde-lipofuscinose neuronale		
Maladies	Protéines déficientes	Substrats accumulés
Céroïde-lipofuscinose neuronale 1 Céroïde-lipofuscinose neuronale 2	Palmitoylthioestérase-1 Tripeptidyl peptidase-1	Lipofuscine Lipofuscine
Défaut dans la biogenèse du lysosome et les organelles associées au lysosome		
Maladies	Protéines déficientes	Substrats accumulés
Syndrome de Griscelli type 1 Syndrome de Griscelli type 2	Myosine 5A Rab27A	Granules de mélanine Granules de mélanine

L'avantage de cette seconde classification permet de regrouper davantage les maladies ayant des mécanismes pathologiques ainsi que des traitements similaires contrairement au premier type de classification qui propose plutôt des classes générales qui englobent des maladies relativement différentes d'un point de vue mécanistique (Winchester, 2012).

1.2 Les mucopolysaccharidoses

Les mucopolysaccharidoses (MPSs) représentent une des classes de maladies lysosomales caractérisée par une déficience d'enzymes impliquées au niveau du catabolisme des glycosaminoglycans (GAGs). À ce jour, 11 déficits enzymatiques sont connus pour causer 7 types de MPSs distinctes (Neufeld *et al.*, 2001). Ces déficits entraînent une accumulation de GAGs non dégradés ou partiellement dégradés au sein des lysosomes. Les GAGs accumulés se retrouvent au niveau des tissus et liquides biologiques, tels que le sang, l'urine et le liquide céphalorachidien causant des dommages cellulaires progressifs à de multiples organes et systèmes. Des anomalies au niveau squelettique ainsi qu'au niveau des articulations sont des symptômes communs et prononcés chez les patients pour tous les types de MPSs (Muenzer^{a,b}, 2011). Les manifestations cliniques associées aux MPSs sont caractérisées par un spectre d'apparition qui est variable. De fait, certains symptômes apparaîtront tôt chez le nouveau-né et ces atteintes seront généralement beaucoup plus sévères que chez les patients dont les symptômes apparaissent à un âge plus avancé. Cette variabilité dans la symptomatologie est due à l'hétérogénéité des mutations pouvant entraîner ce type de maladies. Certaines mutations feront en sorte que l'enzyme affectée aura une activité résiduelle alors que d'autres mutations plus sévères mènent à une absence d'activité enzymatique entraînant alors une apparition plus précoce et plus sévère des symptômes (Clarke, 2008). Au niveau de la transmission génétique, tous les types de MPSs sont transmis de manière autosomique récessive, à l'exception de la MPS de type II qui est liée à l'X (Muenzer, 2011^a).

1.2.1 Le catabolisme biochimique et les mécanismes cellulaires

Les protéoglycans sont des composés essentiels au bon fonctionnement des organismes vivants. Ceux-ci sont impliqués dans de nombreux processus très divers tels que la fibrillogénèse du collagène, la migration des axones dans le système nerveux central, la perméabilité sélective, le pontage entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette, la régulation de la biodisponibilité, de la stabilité et de l'activité des cytokines (Praillet *et al.*,

2012). Ces composés sont en réalité des chaînes linéaires de sucre composées notamment de *N*-acétylglucosamine, de *N*-acétylgalactosamine, d'acide glucuronique ainsi que d'acide iduronique liés à des protéines (Lindahl *et al.*, 2017). Lorsque clivés de la protéine, les chaînes de sucre, soit les GAGs, sont très hétérogènes et peuvent être divisées en cinq sous-classes : le dermatan sulfate, le chondroïtine sulfate, l'héparan sulfate, le kératan sulfate et l'hyaluronan. Il existe d'importantes variations entre les différentes molécules même au sein d'une même sous-classe (Brown *et al.*, 2010; Viola *et al.*, 2012). Ces molécules peuvent varier les unes des autres au niveau de la composition et de la longueur de la chaîne de sucre et du profil de sulfatation des sucres composant la chaîne. Au niveau du catabolisme de ces molécules qui se produit dans les lysosomes, ce sont 11 enzymes qui ont pour fonction de dégrader les différentes chaînes de sucre complexes en simples monosaccharides (Brown *et al.*, 2010). Dans le cas de l'héparan sulfate, l'une des deux molécules qui s'accumulent chez les individus touchés par la mucopolysaccharidose de type II, la chaîne de sucre est composée d' α -D-glucosamine et d'acide uronique (β -D-glucuronique ou d'acide α -L-iduronique) (Figure 1).

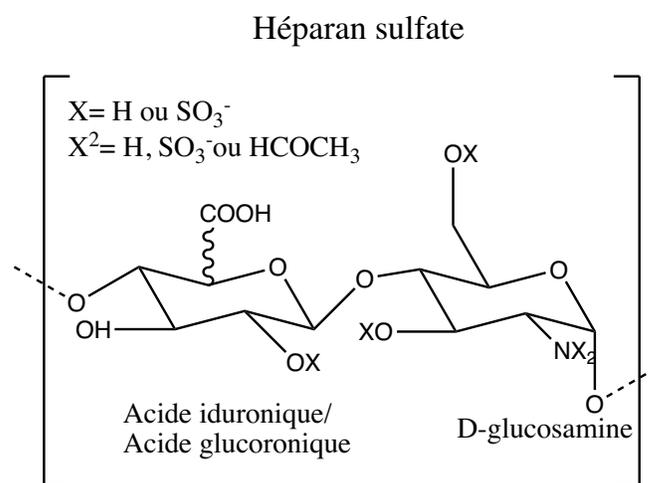


Figure 1. Structure chimique de la molécule d'héparan sulfate.

La première enzyme à intervenir dans le processus de dégradation de la molécule est l'iduronate-2-sulfatase (Kowalewski *et al.*, 2012). Cette enzyme a pour fonction de retirer un groupement sulfate (SO_3^-) et de le remplacer par un groupement hydroxyle au niveau de l'acide uronique à l'extrémité de la molécule. Cette substitution est essentielle pour la suite du catabolisme de la molécule. Ainsi, une mutation de cette enzyme fait en sorte que le

substrat ne pourra être reconnu par la seconde enzyme et mènera alors à l'accumulation du substrat au niveau du lysosome. Une déficience au niveau de cette enzyme est à la base de la mucopolysaccharidose de type II. La seconde enzyme à intervenir est l' α -L-iduronidase, une enzyme qui catalyse le clivage au niveau du lien glucidique entre l' α -D-glucosamine et l'acide uronique afin de retirer l'acide uronique de la chaîne de sucre. Un défaut au niveau de cette enzyme entraîne la mucopolysaccharidose de type I qui peut se classer en 3 sous-classes soit la maladie de Hurler (OMIM: 607014), Hurler/Sheie (OMIM: 607015) ou Sheie (OMIM: 607016). Ces noms désignent tous une même maladie, mais à des degrés différents de sévérité clinique. Suite à l'action de l' α -L-iduronidase, deux sulfatases, soit la N-sulfoglucosamine-3-O-sulfatase et la sulfamidase s'enchaînent dans le but de retirer les groupements sulfates présents au niveau de l' α -D-glucosamine. Dans le cas de la N-sulfoglucosamine 3-O-sulfatase, le groupement OSO_3^- sera remplacé par un groupement hydroxyle alors que la sulfamidase remplacera le groupement NHSO_3^- par un groupement NH_2 . Il est à noter que l'action de la N-sulfoglucosamine 3-O-sulfatase n'est pas requis en cas d'absence de groupement sulfate. Ensuite, entre en jeu la glucosamine acétyltransférase qui aura pour fonction de remplacer le groupement NH_2 fraîchement formé par un groupement NHAc . Cette action permettra alors à l' α -N-glucosaminidase de retirer une molécule d' α -D-glucosamine en raison d'un clivage au niveau du lien glucidique. Une déficience au niveau de l'une des 4 dernières enzymes, soit la N-sulfoglucosamine-3-O-sulfatase, la sulfamidase, la glucosamine acétyltransférase et l' α -N-acétyl glucosaminidase entraînera la mucopolysaccharidose de type III (III-D (OMIM:252940), III-A (OMIM: 252900), III-C (OMIM: 252930) et III-B (OMIM: 252920), respectivement). Suite au retrait de l' α -D-glucosamine, la molécule sera ensuite prise en charge par la glucuronate-2-sulfatase qui a pour fonction de remplacer un groupe OSO_3^- présent sur l'acide uronique par un groupement hydroxyle. Cette action permettra ensuite à la β -D-glucuronidase de retirer une molécule d'acide uronique de la chaîne de sucre grâce à un clivage au niveau de la liaison glucidique. Un défaut au niveau de la β -D-glucuronidase entraînera la MPS VII, également connue sous le nom de syndrome de Sly (OMIM: 253220). Suite au clivage au niveau du lien glucidique catalysé par la β -D-glucuronidase, deux sulfatases interviennent, soit la sulfamidase et la glucosamine 6-sulfatase, pour remplacer un groupe NHSO_3^- par un

groupement NH_2 et un groupement CH_2OSO_3 par un groupement CH_2OH . Le cycle se répète ainsi jusqu'à la dégradation complète de la molécule d'héparan sulfate (Kowalewski *et al.*, 2012).

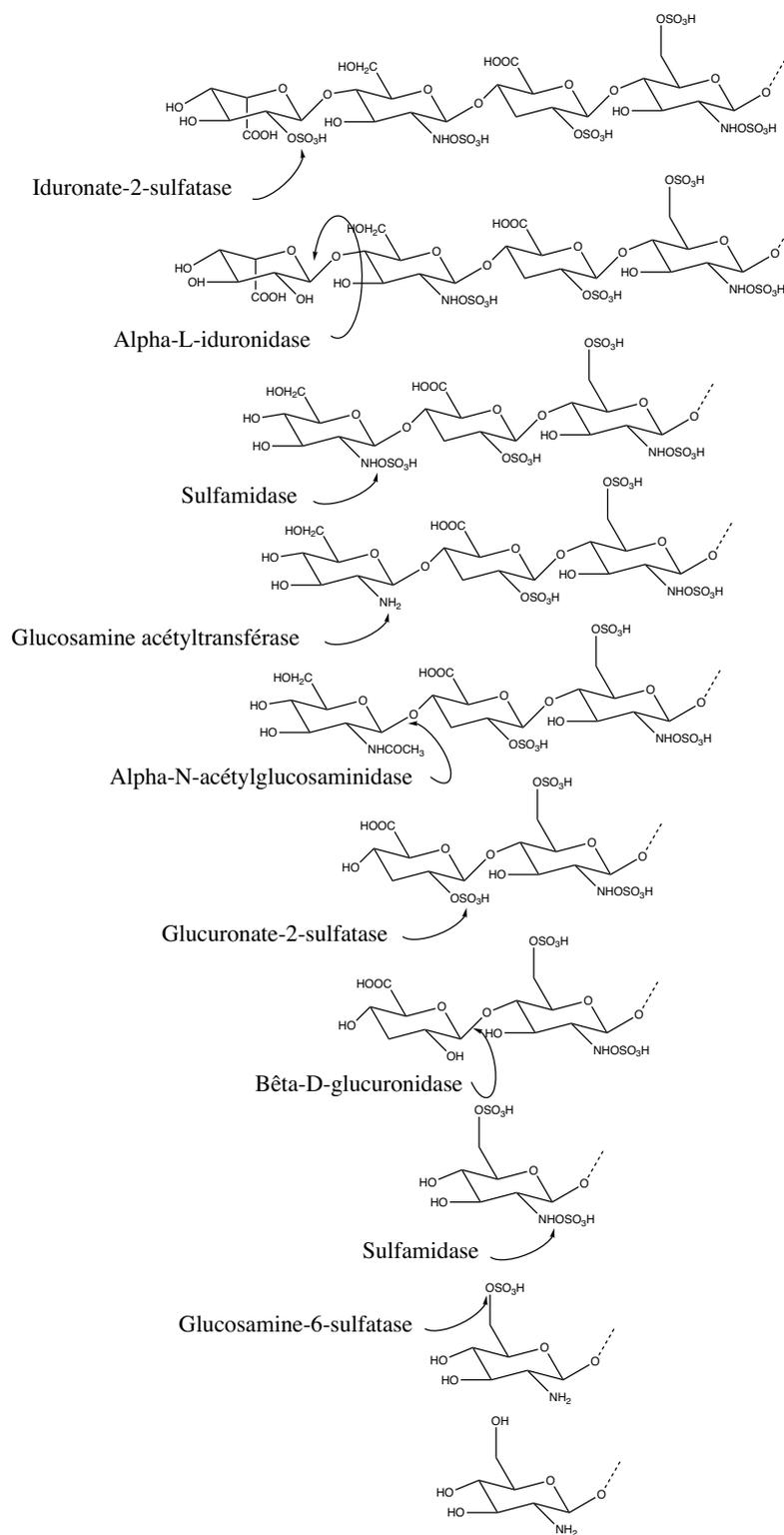


Figure 2. Catabolisme de l'héparan sulfate.

Le dermatan sulfate est composé de N-acétylgalactosamine et d'acide iduronique/d'acide glucoronique (Sugahara, 2003).

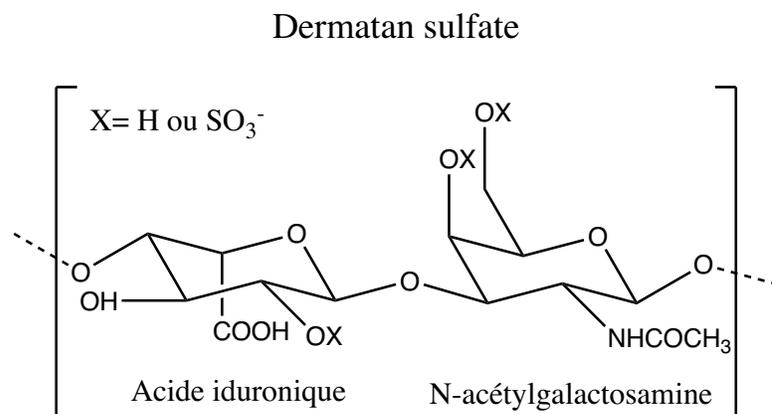


Figure 3. Structure chimique de la molécule de dermatan sulfate.

Le catabolisme du dermatan sulfate débute par l'intervention de l'iduronate-2-sulfatase suivi de l' α -L-iduronidase, soit les deux mêmes enzymes qui amorcent la dégradation de l'héparan sulfate. Comme lors du processus de dégradation de l'héparan sulfate, ces deux enzymes auront pour fonction respective de remplacer un groupement OSO_3H par un groupement hydroxyle au niveau de l'acide uronique, puis de retirer l'acide uronique suite à un clivage au niveau de la liaison glucidique entre l'acide uronique et le N-actylgalactosamine. Tel que ce qui a été observé pour le catabolisme de l'héparan sulfate, un défaut au niveau de ces deux enzymes entraîne la MPS II et la MPS I, deux maladies caractérisées par une accumulation d'héparan sulfate et de dermatan sulfate au niveau des lysosomes de divers tissus et liquides biologiques. Suite au retrait de l'acide uronique, intervient la N-acétylgalactosamine-4-sulfatase qui a pour fonction de remplacer le groupement OSO_3H au niveau du N-acétylgalactosamine par un groupement hydroxyle, puis la molécule N-acétylgalactosamine pourra être retirée de la chaîne de sucre suite à un clivage au niveau de la liaison glucidique catalysée par les β -hexosaminidase A, B, et S. Des défauts au niveau de la N-acétylgalactosamine-4-sulfatase et des β -hexosaminidase A, B, et S engendrent le syndrome de Maroteaux-Lamy (MPS VI; OMIM: 253200) ainsi que les maladies de Tay Sachs (OMIM: 272800) et Sandhoff (OMIM: 268800), respectivement. Finalement, comme lors du catabolisme de l'héparan sulfate, la dernière enzyme à intervenir est la β -D-glucuronidase

qui catalyse le retrait d'une molécule d'acide uronique de la chaîne de sucre grâce à un clivage au niveau de la liaison glucidique (Fenzl *et al.*, 2015).

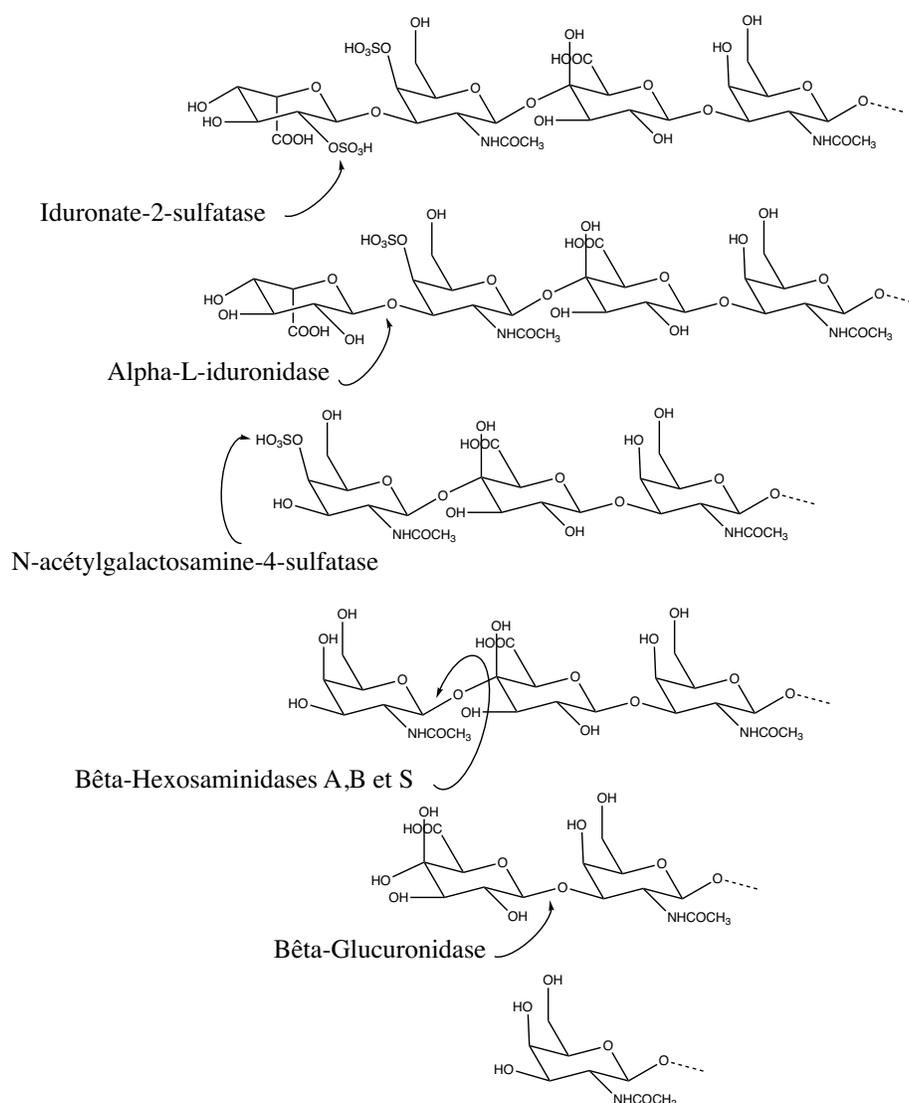


Figure 4. Catabolisme du dermatan sulfate.

1.2.2 Les manifestations cliniques

Tel que mentionné précédemment, les protéoglycans sont impliqués au niveau de plusieurs processus cellulaires et ce, dans un grand nombre de tissus et de liquides biologiques. Ainsi, un dérèglement au niveau du métabolisme des protéoglycans n'affectera pas seulement un seul tissu, mais il occasionnera plutôt une atteinte multisystémique. Tel que mentionné précédemment, un défaut au niveau du catabolisme des GAGs mène à sept types de

mucopolysaccharidoses causées par une déficience enzymatique différente (Coutinho, 2012). Une grande variabilité clinique et biochimique entre les différents types de mucopolysaccharidoses a été rapportée (Muhlebach *et al.*, 2011). Toutefois, des symptômes tels qu'un faciès atypique, une macroglossie, une perte de la vision ou de l'audition, une petite stature, des anomalies squelettiques, des raideurs au niveau des articulations, une mobilité réduite, une augmentation de la taille de certains organes, tels que le foie ou la rate de même que des problèmes respiratoires et/ou cardiaques sont tous des traits généralement observés chez les individus souffrant de mucopolysaccharidoses et ce, peu importe le type (Muhlebach *et al.*, 2011; Ashworth *et al.*, 2006; Rigante et Segni, 2002). Également, certains types de mucopolysaccharidoses, tels que la mucopolysaccharidose de type I (Hurler), type II (Hunter) et le type VII (Sly) peuvent entraîner d'importantes atteintes neurologiques. Il est également important de mentionner que les enfants naissent généralement sans signe apparent de la maladie. Ces derniers peuvent apparaître à court ou à moyen terme dépendamment du type de mucopolysaccharidoses, de même que de la sévérité de l'atteinte clinique (Muenzer, 2011^{a,b}).

1.2.3 La fréquence de différents types de mucopolysaccharidoses

Comme pour la plupart des maladies lysosomales, le pourcentage de distribution des différentes mucopolysaccharidoses est très variable. Lorsque nous nous intéressons uniquement aux MPSs aux États-Unis, la MPS III est la plus fréquente et représente 31.7% des cas. Cette dernière est suivie de la MPS I (28.3% des cas), MPS II (24.2%), MPS IV (7.5%) et des MPS VI et VII (4.2%) (Puckett *et al.*, 2017). Toutefois, en Chine, la MPS II est la MPS la plus fréquente avec plus de 47% des cas, alors que la MPS III est parmi les moins fréquentes avec seulement 3.7% des cas (Chen *et al.*, 2016). Ainsi, il est donc difficile de donner des chiffres exacts quant à la distribution des MPSs puisque chaque pays peut présenter un pourcentage différent de la distribution.

1.3 La mucopolysaccharidose de type II

1.3.1 Les caractéristiques de la mucopolysaccharidose de type II

Décrite en 1917 pour la première fois par Charles Hunter (Wraith *et al.*, 2008; Hunter 1917) la maladie de Hunter ou la mucopolysaccharidose de type II est l'une des rares maladies

lysosomales liée à l’X. De fait, cette maladie est causée par une mutation au niveau du gène *IDS* situé en position Xq28 et qui code pour l’enzyme iduronate-2-sulfatase. Cette mutation entraînera une déficience enzymatique menant à l’accumulation de l’héparan sulfate et du dermatan sulfate au niveau des lysosomes de nombreux tissus et liquides biologiques causant ainsi une atteinte progressive et multisystémique chez le patient atteint (Stapleton *et al.*, 2017).

1.3.2 Les manifestations cliniques de la MPS II

La MPS II est une maladie multisystémique qui touche principalement les personnes de sexe masculin. Généralement, les nouveau-nés touchés par cette maladie ne présentent pas de signes apparents de celle-ci à la naissance. C’est toutefois vers l’âge de 2 à 4 ans que les premiers signes et symptômes commencent à apparaître. Bien que les premiers symptômes qui se manifestent varient d’un cas à l’autre, de façon générale, les patients atteints de la MPS II présentent assez rapidement un faciès atypique avec les lèvres, paupières, narines, gencives et langue d’apparence plus épaisse (Tylki-Szymańska, 2014). Puis, avec la progression de la maladie, des atteintes respiratoires, cardiaques, squelettiques et dans certains cas, des atteintes neurologiques deviendront de plus en plus apparentes et graves.

1.3.2.1 Les anomalies respiratoires

Les infections telles que les rhinites amygdalites, les pharyngites otites de même que des obstructions et/ou congestions nasales sont assez fréquentes chez les patients atteints de la MPS II. Une respiration dite bruyante ainsi qu’une apnée du sommeil, causée par une obstruction des voies respiratoires suite à une macroglossie, une hypertrophie du pharyngé, un épaississement des cordes vocales ainsi que de l’enflement supraglottique sont régulièrement observés. De nombreuses interventions chirurgicales seront nécessaires pour dégager les voies respiratoires chez l’adolescent atteint de MPS II en raison des déformations trachéales progressives dues au dépôt des GAGs au niveau des tissus mous. L’insuffisance respiratoire est d’ailleurs l’une des causes principales de décès chez les patients MPS II avec près de 46% des mortalités (Ruttent *et al.*, 2016; Jones *et al.*, 2009; Leighton *et al.*, 2001).

1.3.2.2 Les anomalies gastro-intestinales

L'hépatosplénomégalie est un symptôme qui apparaît généralement très rapidement chez les patients atteints de la MPS II en raison du dépôt important de GAGs au niveau du foie. D'autres symptômes tels que des hernies ombilicales et inguinales sont généralement observables en raison de l'augmentation de la pression intra-abdominale causée par l'augmentation de la taille du foie (Stapleton *et al.*, 2017).

1.3.2.3 Les anomalies cardiaques

Alors que des anomalies cardiaques ont été observées dans la plupart des MPS, il semblerait que celles-ci surviennent de manière plus précoce chez les individus dont le catabolisme du dermatan sulfate est affecté (Kampmann *et al.*, 2016). Effectivement, le dermatan sulfate est un composé normalement présent au niveau du tissu des valves cardiaques. Il n'est donc pas surprenant que les individus ayant un défaut au niveau du catabolisme du dermatan sulfate présentent d'importantes atteintes cardiaques (Braunlin, 2011). Au niveau de la MPS II, près de 57% des patients ont des atteintes progressives des valves cardiaques (Wraith *et al.*, 2004). Des régurgitations valvulaires et des atteintes telles que des épaissements de la valve mitrale et parfois de la valve aortique sont observables. De plus, des maladies coronariennes causées par un rétrécissement ou un blocage au niveau des artères coronaires dû à la présence de GAGs au niveau des artères sont observables chez tous les patients atteints de mucopolysaccharidoses (Braunlin, 2011). Chez les patients souffrant de MPS, l'insuffisance cardiaque est la seconde cause de décès derrière l'insuffisance respiratoire (Lin *et al.*, 2016).

1.3.2.4 Les anomalies squelettiques

Les anomalies squelettiques sont très fréquentes chez les patients atteints de la maladie de Hunter. Des scoliose, des raideurs au niveau des articulations, des malformations au niveau de la colonne, des épaules, des coudes, des hanches, des genoux et des chevilles touchent régulièrement les patients atteints (Link *et al.*, 2010).

1.3.2.5 Les anomalies neurologiques

De nombreuses atteintes neurologiques telles qu'une hydrocéphalie, une compression de la moelle épinière ainsi que du nerf optique, une myélopathie cervicale, un déclin des capacités cognitives, d'importants retards de développement, des problèmes de comportement, des crises d'épilepsie, une perte au niveau de l'audition et des troubles du sommeil ainsi que le syndrome du canal carpien sont tous des symptômes fréquemment observés chez les patients atteints de la forme neuronopathique de la maladie, ce qui correspond à près de deux-tiers des patients atteints de la MPS II (Shapiro *et al.*, 2017; Amartino, 2015; Sawaf *et al.*, 2008).

1.3.2.6 Les anomalies orthodontiques

Les patients atteints de la MPS II présentent, dans certains cas, des anomalies au niveau de la dentition. Des anomalies au niveau des dents telles que la forme et le nombre de celles-ci sont parfois observées, en plus de plusieurs autres anomalies orthodontiques dont une hypoplasie au niveau de l'émail ainsi qu'un nombre important de caries. Également, les patients touchés par la MPS II sont plus à risque de développer des kystes ainsi que des abcès en raison du taux accru d'infections orales observées chez ceux-ci (Gajula *et al.*, 2012).

1.3.3 Dosages en laboratoire

Lorsqu'un clinicien rencontre un patient présentant des signes et symptômes pouvant s'apparenter à une mucopolysaccharidose de type II, ce dernier peut prescrire un prélèvement d'urine pour quantifier les glycosaminoglycans urinaires. Plusieurs méthodes permettent ces dosages. Il existe des tests colorimétriques qui peuvent être séparés en 2 groupes soit les tests semi-quantitatifs et les tests quantitatifs. Bien que les tests semi-quantitatifs de dépistage tels que le « Berry Spot Test » et le « Ames Spot Test » sont simples, rapides et peu dispendieux, ceux-ci sont généralement à éviter en raison du taux très élevé de faux-positifs et de faux-négatifs (Burton et Giugliani, 2012; Berry, 1987). Au niveau des tests quantitatifs, il y a le test de réaction des acides urinaires au carbazole, celui de turbidité au cétalpyridinium et le test le plus utilisé actuellement, soit celui au diméthylméthylène bleu (DMB). Bien que ceux-ci s'avèrent plus performants comparativement aux méthodes semi-quantitatives mentionnées précédemment, il reste néanmoins que ces méthodes colorimétriques/spectrophotométriques comportent de nombreuses failles. Par exemple, il est

connu que le test de réaction au carbazole possède une très faible sensibilité lorsqu'il y a une augmentation de kératan sulfate urinaire (Maladie de Morquio, OMIM: 253000). Comme pour le test de réaction au carbazole, le test de turbidité au cétalpyridinium engendre un important taux de faux-négatifs pour les patients atteints des maladies de Morquio et de Sanfilippo (Chih-Kuang *et al.*, 2002). Dans le cas du dosage au DMB, plusieurs études ont démontré les problèmes au niveau de la sensibilité, de la spécificité et de possibles contaminations associées à cette méthode (Zheng et Levenston, 2015; Auray-Blais *et al.*, 2016; Piraud *et al.*, 1993). De plus, le dosage vise les GAGs totaux, donc aucune mesure spécifique des GAGs individuels.

Plus récemment, de nouvelles méthodes de dosages des glycosaminoglycans urinaires utilisant la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) ont fait leur apparition. Ces méthodes permettent d'identifier spécifiquement et de quantifier chacun des GAGs présents en quelques minutes. De plus, lorsque comparée à la méthode au diméthylméthylène bleu, la méthode en spectrométrie de masse a démontré une sensibilité et une spécificité accrues. Une étude récente a d'ailleurs fait la comparaison entre la méthode au diméthylméthylène bleu et une méthode en spectrométrie de masse et a permis de conclure que la méthode au diméthylméthylène bleu mène à près de 30% de faux-négatifs alors que la méthode en spectrométrie de masse a correctement identifié l'ensemble des patients atteints des différents types de mucopolysaccharidoses (Auray-Blais *et al.*, 2016).

Suite à une augmentation de GAGs urinaires chez les patients, des analyses sanguines seront effectuées pour évaluer l'activité enzymatique qui génère le profil urinaire anormal de GAGs. Pour les patients atteints de la maladie de Hunter, une déficience en iduronate-2-sulfatase sera détectée lors des essais enzymatiques. Des analyses moléculaires subséquentes pourront être entreprises pour identifier la mutation. Un conseil génétique sera offert aux familles afin de répondre à leurs questions et pour apporter le support nécessaire en vue de la reproduction future, d'un diagnostic prénatal ou de la détection de porteurs (Burton et Giugliani., 2012).

1.3.4 La forme neuronopathique et la forme non-neuronopathique de la MPS II

Tel qu'abordé précédemment, la mucopolysaccharidose de type II se présente sous un vaste spectre clinique avec une forme neuronopathique et une forme non-neuronopathique. Dans les deux cas, l'enfant semble généralement d'apparence normale à la naissance. Toutefois,

chez les patients atteints de la forme neuronopathique, un retard de développement est généralement apparent vers l'âge de 18 à 24 mois. Par la suite, le développement cognitif de l'enfant est très lent, puis il atteint un plateau vers l'âge de 3 à 5 ans (Wraith *et al.*, 2008), ce qui constitue l'une des différences majeures entre les deux formes de la maladie. Les enfants atteints de la forme neuronopathique auront d'importantes atteintes neurologiques telles qu'un déclin des capacités cognitives, un retard de développement, des troubles du comportement, des crises d'épilepsie en plus des symptômes somatiques (atteintes cardiaques, respiratoires et squelettiques) (Shapiro *et al.*, 2017). Par ailleurs, les patients atteints de la forme non-neuronopathique (atténuée) n'auront que très peu ou pas d'atteinte neurologique. Ils conservent un niveau intellectuel normal ou très près, lorsque comparés à des individus sains. Actuellement, plus de 50% des patients atteints de la maladie de Hunter présentent une atteinte neurologique (Parini *et al.*, 2015; Martin *et al.*, 2008).

Les enfants atteints de la forme neuronopathique de la MPS II ont une espérance de vie de 13,3 +/- 3,2 ans comparativement à 22,6 +/- 4.3 ans chez les patients atteints de la forme non-neuronopathique. Sur le plan moléculaire, plus de 500 mutations du gène *IDS* ont été décrites (Demydchuk *et al.*, 2017). Plusieurs équipes de recherche ont tenté de prédire le phénotype associé à la maladie suite à un diagnostic (Saito *et al.*, 2016; Froissart *et al.*, 2007). Au cours de ces études, il a été observé que les mutations dites plus sévères telles que de très larges délétions ainsi que des changements de cadre de lecture sont plus à risque de causer la forme neuronopathique, toutefois, la corrélation est loin d'être parfaite (Saito *et al.*, 2016). Effectivement, il existe plusieurs cas dans la littérature décrivant une même mutation qui cause deux phénotypes différents chez les patients (Froissart *et al.*, 2007). Bien qu'il soit actuellement impossible de prédire le phénotype d'un enfant atteint de la MPS II, certains groupes de recherche pensent que le meilleur outil pour tenter de prédire la sévérité de l'atteinte serait la mise en place d'une base de données qui tient compte de l'activité enzymatique, de la structure de l'iduronate-2-sulfatase ainsi que du type de mutations au niveau du gène *IDS* (Vollebregt *et al.*, 2017; Sukegawa-Hayasaka *et al.*, 2006).

1.3.5 Les traitements de la MPS II

1.3.5.1 Les traitements symptomatiques

Les traitements symptomatiques utilisés pour la mucopolysaccharidose de type II se révèlent d'une importance majeure pour les patients. De fait, pour les patients atteints de la MPS II qui souffrent de raideurs au niveau des articulations, les cliniciens prescriront des anti-inflammatoires ce qui aura pour effet de les soulager et d'améliorer leur qualité de vie (Stapleton *et al.*, 2017). Les chirurgies et les médicaments anti-inflammatoires sont fréquemment utilisés et, jusqu'à assez récemment, représentaient les principaux traitements pour la MPS II afin de soulager les atteintes respiratoires (trachéotomie, adénoïdectomie, amygdalectomie), les atteintes cardiaques (chirurgies valvulaires), les atteintes osseuses (chirurgies orthopédiques) et autres présentations cliniques telles que les hernies (Clarke, 2011; Valayannopoulos et Wijburg, 2011).

1.3.5.2 La transplantation de cellules souches

La première transplantation de cellules souches hématopoïétiques a eu lieu en 1982. C'est une thérapie qui vise à restaurer l'activité enzymatique de l'I2S à l'aide de cellules souches hématopoïétiques provenant d'un donneur sain. Bien qu'à l'époque, ce type de traitement était le seul qui s'attaquait directement à la source du problème et qui avait un certain succès, il s'avérait par ailleurs risqué en raison de complications pouvant survenir suite à l'incompatibilité entre le donneur et le receveur, ce qui occasionnait un taux élevé de mortalité. Toutefois, de grands progrès ont été réalisés dans ce domaine, si bien que le taux de mortalité suite à ce type d'intervention a chuté en-dessous de 5%. Malgré un certain succès en terme d'efficacité, relativement peu d'information concernant les effets à long terme de la transplantation de cellules souches hématopoïétiques n'est disponible à ce jour (Guffon *et al.*, 2009; Barth *et al.*, 2017).

1.3.5.3 La thérapie génique

La thérapie génique est une option qui pourrait potentiellement guérir les patients. De fait, en corrigeant le gène IDS muté, il pourrait être possible de restaurer l'enzyme à un niveau fonctionnel. Contrairement à la thérapie par transplantation de cellules souches hématopoïétiques, la thérapie génique utilise les cellules du patient. Celles-ci sont prélevées, corrigées ex vivo à l'aide d'un vecteur, puis réinjectées au patient. Également, contrairement à la thérapie enzymatique de remplacement, qui constitue actuellement le traitement pour la MPS II, la thérapie génique pourrait s'avérer un traitement efficace pour traiter les atteintes neurologiques observées chez les patients atteints de la forme neuronopathique. La thérapie génique pourrait donc potentiellement devenir un traitement de choix pour tous les patients atteints de la maladie de Hunter. Il est toutefois important de mentionner que ce traitement est encore au stade de développement et il pourrait s'écouler plusieurs années avant que celui-ci soit utilisé pour traiter des patients (Stapleton *et al.*, 2017).

1.3.5.4 La thérapie de réduction de substrat

La thérapie de réduction de substrat est également une avenue envisagée au niveau du traitement de la mucopolysaccharidose de type II. Cette thérapie vise à réduire la synthèse des GAGs, impliquant une moins grande accumulation de ceux-ci au niveau du lysosome et une réduction des manifestations cliniques. La médication Genisteine (Biofarm International, Ltd; Poznan, Pologne) est une isoflavone agissant comme inhibiteur des récepteurs de croissance épithéliale EGFR ou/et ErB1. Ainsi, une inhibition du facteur de croissance EGF entraîne une diminution de la synthèse des GAGs (Piotrowska *et al.*, 2006). De plus, des études préliminaires ont révélé que la Genisteine est en mesure de traverser la barrière hématoencéphalique chez la souris MPS II. Toutefois, ce traitement est encore à l'étude et il n'est pas encore possible de confirmer ou d'infirmier s'il est efficace pour tous les patients atteints de la maladie (Kim *et al.*, 2013; Frisco *et al.*, 2010).

1.4 La thérapie enzymatique de remplacement

Approuvée en 2006 par la FDA (Raluy-Callado *et al.*, 2013; U.S Food & Drug Administration, 2006), la thérapie enzymatique de remplacement (TER) s'avère être actuellement le traitement de choix disponible pour les individus atteints de la

mucopolysaccharidose de type II (Whiteman et Kimura, 2017). Bien que cette thérapie s'avère inefficace pour la forme neuronopathique de la maladie, les effets bénéfiques de ce type de traitement pour les symptômes somatiques sont bien documentés (Muenzer et al., 2017; Parini *et al.*, 2015; Puiu *et al.*, 2013). Une procédure pour l'infusion intrathécale de l'enzyme est toujours à l'étude afin de traiter la forme neuronopathique de la maladie. L'enzyme pourrait ainsi atteindre le cerveau et donc agir sur ce dernier afin d'altérer les atteintes neurologiques en plus des atteintes somatiques (Whiteman et Kimura, 2017).

1.4.1 Le concept de la thérapie enzymatique de remplacement

L'idursulfase (Elaprase[®], Shire, Lexington, MA, USA) une enzyme analogue à l'iduronate-2-sulfatase, est produite dans des cellules de lignée de fibrosarcome humain (HT-1080). L'enzyme, composée de 525 acides aminés et ayant une masse de 76 kDa est, une fois administrée au patient par infusion, liée par les récepteurs mannose-6-phosphate localisés sur les membranes des cellules. L'enzyme pénètre ensuite dans la cellule avec le récepteur via une endocytose, puis est acheminée au lysosome. Une fois arrivée à destination, le pH acide des endosomes dissocie l'enzyme du récepteur mannose-6-phosphate, puis l'idursulfase pourra alors dégrader les GAGs (héparan sulfate et dermatan sulfate dans les cas de MPS II) accumulés au niveau du lysosome. Ceci aura pour effet d'altérer la progression naturelle de la maladie (Whiteman et Kimura, 2017).

1.4.2 La procédure médicale d'administration

La thérapie enzymatique de remplacement consiste en une infusion intraveineuse hebdomadaire de l'idursulfase à une quantité de 0,5 mg d'enzyme par kg de poids du patient. Les infusions se font généralement en milieu hospitalier, toutefois, de plus en plus d'établissements offrent la possibilité d'effectuer la TER à la maison (Muenzer^{b,c} *et al.*, 2011). Il existe actuellement plusieurs débats quant à l'âge auquel les patients atteints de la maladie de Hunter devraient commencer la thérapie enzymatique de remplacement. Celle-ci est recommandée par le fabricant pour les patients âgés de 5 ans et plus (Elaprase, Shire Guidelines for Weight-Based Dosing and Infusion, 2016.). Un manque d'information sur les effets de la TER pour le groupe des 0 à 5 ans serait la raison de cette recommandation. Toutefois, des études plus récentes tendent à démontrer que non seulement la TER ne pose pas de problématique majeure pour ce groupe d'âge, mais il serait avantageux de débuter la

thérapie aussitôt que possible pour retarder et même prévenir l'apparition de certains symptômes somatiques (González-Gutiérrez-Solana et al., 2018; Grant et al., 2018; Parini *et al.*, 2015; Puiu *et al.*, 2013; Tajima *et al.*, 2013; Muenzer^a *et al.*, 2011).

1.4.3 Études sur l'efficacité

L'infusion intraveineuse de l'idursulfase comme traitement pour la maladie de Hunter s'avère inefficace pour les patients présentant des symptômes neurologiques puisque l'enzyme ne parvient pas à franchir la barrière hématoencéphalique et donc n'atteint pas le cerveau (Silva *et al.*, 2011). Cependant, au niveau des symptômes somatiques, c'est-à-dire tous les symptômes sauf les symptômes neurologiques, la TER s'avère efficace. Pour suivre l'amélioration de la condition du patient, deux paramètres sont évalués, soit le test de marche de 6 minutes, qui mesure la distance parcourue par le patient en 6 minutes, ainsi que la capacité vitale maximale qui est en fait un test de capacité pulmonaire (Lampe *et al.*, 2014). Dans le cas des patients pouvant bénéficier de la TER, il est possible d'observer des améliorations pour ces deux paramètres. Effectivement, après 1 an de traitement, les patients améliorent la distance parcourue au test de marche de 36 mètres ainsi qu'une amélioration de 2,7% de la capacité vitale maximale après un an de traitement (Muenzer *et al.*, 2006). Au niveau des différents symptômes somatiques, une étude a démontré une amélioration de plusieurs symptômes attribués aux patients MPS II. Les symptômes comprenaient notamment des atteintes squelettiques, la mobilité des joints, la taille du foie et de la rate, les infections respiratoires, des atteintes cardiaques, ainsi que le nombre d'hospitalisations (Lampe *et al.*, 2014). Cette étude visait 22 patients atteints de mucopolysaccharidose de type II qui avaient reçu la TER pour une durée de 2 ans. Les chercheurs rapportent que sur les 7 paramètres évalués (test de marche de 6-min, index de masse ventriculaire gauche, capacité vitale forcée absolue, volume expiratoire forcé, taille du foie et taille de la rate), un patient a eu une amélioration pour les 7 paramètres; 17/22 patients ont eu une amélioration au niveau de 5 ou 6 paramètres et 4 ont eu une amélioration pour 4 paramètres. C'est donc dire que pour les individus ayant participé à cette étude de 2 ans, les perspectives semblent bonnes. Par ailleurs, les différentes réponses à la TER observées lors de cette étude montrent une variabilité de ladite réponse pour chaque patient, tel que déjà constaté par d'autres chercheurs (Muenzer *et al.*, 2017).

1.5 Les biomarqueurs

1.5.1 La définition d'un biomarqueur

Un marqueur biologique ou biomarqueur est un indicateur d'un processus, d'un événement ou d'une condition cellulaire, moléculaire ou biochimique pouvant être mesuré avec précision et reproductibilité (Strimbu et Tavel, 2010). Ces composés peuvent être utilisés pour évaluer un processus biologique ou pathologique, des réponses pharmacologiques et thérapeutiques (Biomarkers Definitions Working Group, 2001). En génétique biochimique, les biomarqueurs ont une importance capitale pour le diagnostic de différentes maladies. Ces derniers servent à identifier les patients atteints d'une maladie qui, lorsque traitée trop tardivement, peut entraîner de graves dommages irréversibles. Le dépistage néonatal est un exemple où la quantification de biomarqueurs permet de détecter des anomalies du métabolisme avant même la présentation des premiers symptômes cliniques (Burton *et al.*, 2017; Tomatsu *et al.*, 2014). Dans le cas des maladies lysosomales qui se présentent souvent sous forme d'un spectre clinique varié, la quantification de biomarqueurs aide à confirmer un diagnostic qui peut parfois être difficile à poser en raison de la grande hétérogénéité des présentations cliniques associées aux maladies. Le dosage des biomarqueurs permet également d'évaluer la réponse d'un patient face à un traitement et de s'assurer que le traitement proposé est adéquat (Strimbu et Tavel, 2010). Également, dans certains cas, le dosage des biomarqueurs permet d'évaluer la sévérité et la progression de la maladie. Ce type de données permettra donc d'établir un plan de traitement adéquat pour la situation en cause et d'éviter de soumettre les patients à des traitements qui ne sont pas optimaux (Sigal *et al.*, 2017). Bref, les biomarqueurs sont des outils de dépistage, de diagnostic, de pronostic, de monitoring et de suivi essentiels pour la prise en charge des patients.

1.5.2 Les caractéristiques d'un biomarqueur idéal

Il est possible qu'il existe plusieurs biomarqueurs pour une même maladie. Ainsi, afin d'établir le « biomarqueur idéal », certaines caractéristiques ont été proposées telles une quantification rapide, fiable et peu dispendieuse de celui-ci, une matrice facilement accessible, qu'il soit augmenté à un stade précoce de la maladie sans chevauchement avec une population dite saine et qu'il corrèle avec la sévérité et la progression de ladite maladie,

tout en diminuant avec le traitement prodigué (Robb *et al.*, 2016; Strimbu et Tavel, 2010 ; Cox, 2006).

1.5.3 Les biomarqueurs de la mucopolysaccharidose de type II

Le déficit de l'iduronate-2-sulfatase, première enzyme impliquée dans le catabolisme de l'héparan sulfate et du dermatan sulfate, mène à leur accumulation au niveau de nombreux tissus et liquides biologiques des patients MPS II atteints (Muenzer^a, 2011). Ces deux biomarqueurs sont donc utilisés pour le diagnostic ainsi que le suivi des patients traités. Dans de nombreux laboratoires, l'héparan sulfate et le dermatan sulfate sont dosés dans l'urine par la méthode spectrophométrique au DMB (González-Gutiérrez-Solana *et al.*, 2018), dont les problématiques ont été décrites précédemment.

1.6 Présentation du projet de recherche

1.6.1 Problématique et hypothèse

Plus de 100 ans après la première description de la MPS II, il reste encore beaucoup à comprendre sur la physiopathologie et le traitement de celle-ci. Récemment, une étude portant sur la distribution des biomarqueurs de la maladie de Fabry a révélé une distribution très inégale de glycosphingolipides dans les différents tissus de souris Fabry (souris Non-Obese Diabetic Severe Combined Immuno Deficiency ; NOD SCID Fabry) (Provençal *et al.*, 2016). Il est donc fort probable que ce phénomène soit également présent pour d'autres types de maladies lysosomales.

Une étude publiée en 2007 par Garcia^a *et al.*, sur les essais pré-cliniques de la TER présente une quantification de GAGs dans certains tissus de souris MPS II et la distribution de l'enzyme au niveau desdits tissus. Le volet de l'étude portant sur la distribution des GAGs dans différents tissus a révélé une accumulation de ceux-ci qui est variable d'un tissu à l'autre. Les niveaux les plus importants de GAGs ont été mesurés au niveau du foie (145 µg/mg de protéines) alors que les niveaux les plus faibles ont été observés au niveau du cœur (60 µg/mg de protéines). Les autres tissus étudiés, soit le rein, le poumon ainsi que la rate présentaient tous d'importantes concentrations de GAGs variant entre 70 et 90 µg/mg de protéines. Aussi, la distribution de l'enzyme idursulfase au niveau des tissus de différents

organes est particulièrement hétérogène. Effectivement, 2 heures après l'infusion, plus de 33% de la dose administrée était encore présente au niveau du foie, alors que moins de 1% de la dose se retrouvait au niveau du cœur, des reins et des poumons, soit tous les tissus touchés par la maladie de Hunter. Alors que près de 10% de la dose infusée était détectable au niveau du foie 24 heures après le traitement, moins de 0,1% de la dose infusée a pu être décelée au niveau du cœur, des reins et des poumons (Garcia^a *et al.*, 2007). Face à ces résultats, il est permis de s'interroger sur les effets de la TER quant à la quantification des biomarqueurs de ces tissus lorsqu'ils sont considérés individuellement. Cependant, aucune étude quantitative précise du dermatan sulfate et de l'héparan sulfate n'a, jusqu'à ce jour, été en mesure de démontrer leur distribution au niveau des différents organes et liquides biologiques pour la mucopolysaccharidose de type II.

De fait, une limitation majeure de l'étude de Garcia^a *et al.*, concerne la méthode DMB utilisée pour la quantification des GAGs qui est controversée et qui peut mener à des résultats biaisés dus à de nombreux problèmes de sensibilité, spécificité et justesse (Auray-Blais *et al.*, 2016; Piraud *et al.*, 1993). De plus, aucune quantification individuelle absolue de l'héparan sulfate et du dermatan sulfate n'a été faite.

Il est donc fort probable que la constatation observée chez les souris Fabry dans l'étude mentionnée antérieurement, soit une distribution variable des biomarqueurs dans les différents tissus et liquides biologiques, soit également présente chez les souris MPS II. Nous pensons également que le rapport d'excrétion d'héparan sulfate/dermatan sulfate varie d'une matrice à l'autre. Finalement, nous croyons que la TER a un effet variable d'un tissu ou liquide biologique à l'autre chez les souris MPS II traitées.

1.6.2 Les objectifs du projet de recherche

L'objectif principal de ce projet de recherche consiste à étudier la distribution des glycosaminoglycans, plus précisément l'héparan sulfate et le dermatan sulfate, dans différents tissus et liquides biologiques avant et après le traitement par la TER chez différents groupes de souris MPS II et contrôles. Plus précisément, nous souhaitons doser l'héparan sulfate et le dermatan sulfate au niveau du foie, du cœur, du cerveau, des reins, de la rate, des poumons, du petit intestin, de l'urine et du plasma chez des souris MPS II traitées pendant 8 et 16 semaines, non traitées pendant 8 semaines, ainsi que des souris contrôles suivies durant

8 et 16 semaines. Cet objectif principal comporte aussi trois sous-objectifs qui consistent notamment à: 1) optimiser l'extraction des glycosaminoglycans provenant des différents tissus et liquides biologiques de souris; 2) développer, optimiser et valider une méthode d'analyse des glycosaminoglycans par spectrométrie de masse en tandem; et 3) déterminer le profil d'accumulation des glycosaminoglycans chez les souris contrôles ainsi que chez les souris MPS II traitées et non traitées par TER.

1.6.3 Les visées du projet de recherche

Ce projet de recherche translationnel permettra de mieux comprendre le catabolisme des GAGs et ce, dans les différents tissus et liquides biologiques. Il permettra donc de mieux comprendre la biochimie sous-jacente de la mucopolysaccharidose de type II. Ainsi, il sera possible de cibler les tissus et liquides biologiques plus affectés en évaluant, précisément, à l'aide d'une méthode de quantification absolue en spectrométrie de masse en tandem, la concentration d'héparan sulfate et de dermatan sulfate dans les différentes matrices considérées dans le cadre de ce projet de recherche. Les différents dosages chez les souris traitées et les souris non traitées permettront également de comprendre les effets réels de la TER, ce qui pourra contribuer éventuellement à élaborer un traitement plus personnalisé et plus efficace pour les patients atteints.

1.7 Les modèles animaux

À ce jour, il existe 2 modèles animaux pour la mucopolysaccharidose de type II. En 1998, un chien, plus précisément un labrador, a été diagnostiqué avec la mucopolysaccharidose de type II. Ce chien présentait des symptômes tels que des traits faciaux atypiques, une perte progressive de coordination et de la vue, ainsi qu'une intolérance à l'exercice. Des analyses urinaires ont été en mesure de déceler une augmentation d'héparan sulfate et de dermatan sulfate puis, une analyse enzymatique a confirmé le diagnostic de MPS II. Il est à noter que ce chien n'a pas été produit par génie génétique dans le but d'étudier la maladie, mais il s'agit plutôt d'une mutation ponctuelle survenue de manière naturelle (Wilkerson *et al*, 1998). Toutefois, dans le cadre d'un projet de recherche comme celui envisagé pour mes études graduées, il est préférable d'utiliser un modèle animal autre que le chien en raison du cycle de vie qui est plus long ainsi que des coûts et du temps requis pour la gestion de cet animal. Ainsi, pour ces mêmes raisons, un modèle murin de souris a été développé en 1999 par

Muenzer et Fu (Muenzer et Fu, 1999). Globalement, l'exon 4 et une section de l'exon 5 ont été retirés par recombinaison homologue avec un vecteur portant un gène de résistance à la néomycine dans le but d'inactiver le gène IDS codant pour l'iduronate-2-sulfatase. Les souris résultantes de cette modification génétique ont ensuite été croisées avec des souris de la lignée C57BL/6 (Garcia^b *et al.*, 2007). Contrairement aux humains atteints de la MPS II qui semblent sains à la naissance, le modèle murin MPS II peut être distingué des souris saines par des manifestations cliniques typiques. De fait, les signes et les symptômes développés par ce modèle murin sont très semblables à ceux observés chez les humains, c'est-à-dire qu'il y a présence d'atteintes squelettiques, respiratoires, cardiaques, gastro-intestinales et neurologiques. C'est vers l'âge de 10 semaines qu'apparaissent les premiers symptômes marqués de la maladie tels que des déformations au niveau des pattes ou des anomalies au niveau de la peau. Ces signes et symptômes deviendront de plus en plus importants avec le temps. Les concentrations de GAGs au niveau des différents tissus et liquides biologiques montrent des augmentations marquées qui sont observables à 4 semaines dans l'urine et à 7 semaines dans le foie. L'espérance de vie de ce modèle animal est considérablement réduite lorsque comparée à des souris saines (70 semaines comparativement à 120 semaines) (Garcia^b *et al.*, 2007). Ce modèle animal est actuellement le plus utilisé pour les recherches sur la MPS II et les traitements qui s'y rattachent (Garcia^a *et al.*, 2007; Muenzer *et al.*, 2002). Ainsi, dans le cadre de ce projet de recherche, ce sont ces souris MPS II qui ont été sélectionnées comme modèle animal.

1.7.1 Les traitements du modèle animal pour ce projet

Dans le cadre de ce projet de maîtrise, le modèle murin de la MPS II, développé par l'équipe du professeur Muenzer (Muenzer et Fu, 1999), a été utilisé. Au total, 40 souris B6N.Cg-Ids^{tm1Muen}/J (MPSII-KO; JAX inventaire# 0024744) ont été achetées, hébergées et traitées à Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, É-U). Les souris étaient au nombre de 4 par cage et ces dernières ont été conservées à $22 \pm 4^\circ\text{C}$ avec une humidité relative de $50 \pm 15\%$. Les souris ont été exposées 12 heures par jour à la lumière et avaient accès à l'eau (pH de 2,5 à 3,0) ainsi qu'à de la nourriture (moulée pour rongeurs) de façon permanente. À l'âge de 9 semaines, les souris ont été séparées en 5 groupes distincts, soit des souris MPS II traitées (n = 8), MPS II non-traitées (n = 8) et contrôles (n = 8). Ces 3 groupes ont été étudiés pour une période de 8 semaines. Les deux derniers groupes étaient composés de souris MPS II traitées

(n = 8) et contrôles (n = 8) étudiés pour une période étendue de 16 semaines. L'objectif d'avoir des souris traitées pour une période prolongée était d'évaluer si la TER avait d'autres bénéfices lorsqu'utilisée pour une période prolongée. Ainsi, à partir de 10 semaines, toutes les souris du groupe MPS II traitées ont reçu la TER à une dose de 0,5mg d'idursulfase/kg de poids/semaine pour une durée de 8 ou de 16 semaines, selon le groupe. Suite au dernier traitement, toutes les souris soumises à l'étude de 8 ou 16 semaines ont été mises à jeun pendant la nuit, puis euthanasiées au CO₂ le lendemain. Les organes, soit le foie, le cerveau, le cœur, la rate, les reins, les poumons ainsi que le petit intestin ont ensuite été prélevés, pesés puis congelés. Des échantillons d'urine furent prélevés pour toutes les souris, 5 jours avant et 5 jours après la thérapie enzymatique, alors que les échantillons de sang furent prélevés et centrifugés pour obtenir du plasma une fois par semaine, soit au 5^{ième} jour après la TER. Une fois tous les échantillons prélevés, ceux-ci ont été préparés et expédiés sur glace sèche à partir des laboratoires Jackson vers notre laboratoire à l'Université de Sherbrooke pour l'analyse des biomarqueurs.

1.8 L'extraction des glycosaminoglycans

Les tissus, préalablement pesés à Jackson Laboratories, furent homogénéisés à l'aide d'un homogénéisateur à billes de céramique, soit l'Omni Bead Ruptor 12 (Omni International, Kennesaw, Georgie, É-U) qui est représenté à la Figure 5. Cet appareil permet notamment, un broyage rapide et contrôlé en termes de durée et d'intensité offrant une homogénéisation uniforme et constante. Également, il n'y a pas de chaleur dégagée lors de l'homogénéisation ce qui évite une altération possible du niveau des concentrations de biomarqueurs à l'étude. Ainsi, pour l'étape d'homogénéisation, 25 mg de tissus ont été ajoutés à un tube vissable en plastique, de même que 5 billes de céramique de 2.8 mm, ainsi que 400 µL de méthanol. Les échantillons furent homogénéisés pendant 45 secondes à haute vitesse par l'Omni Bead Ruptor. Suite à la première homogénéisation, le volume fut complété à l'aide de méthanol de manière à obtenir un homogénat d'une concentration finale de 25 mg de tissu/mL de méthanol. Puis, une seconde homogénéisation fut réalisée par l'Omni Bead Ruptor à basse vitesse pendant 45 secondes.

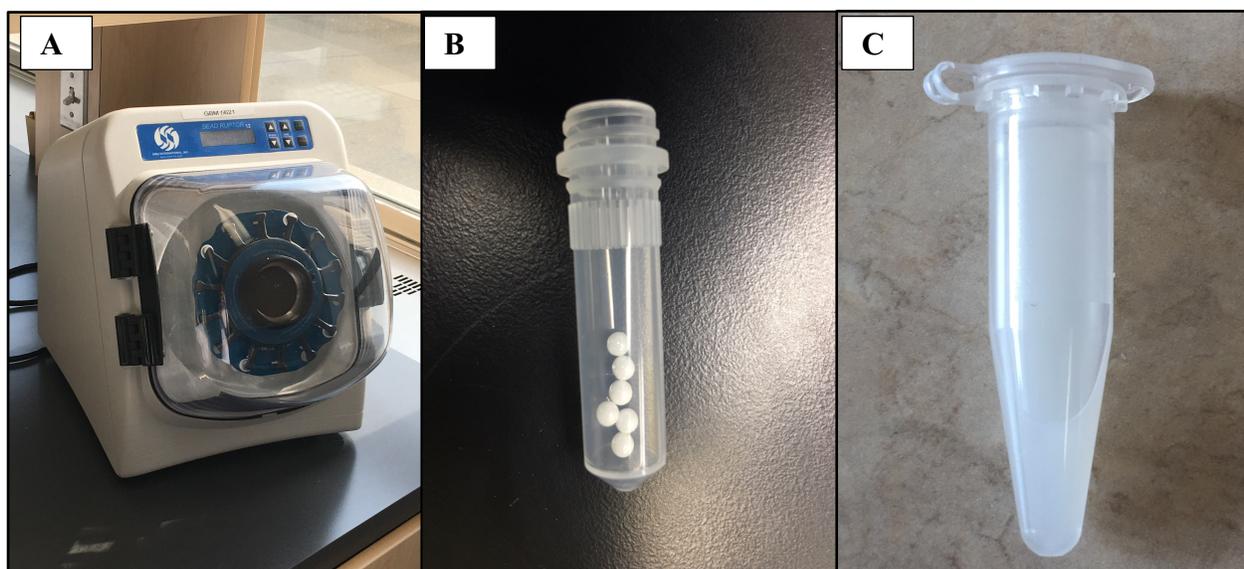


Figure 5. Homogénéisation des tissus: A) Homogénéisateur à billes de céramique Omni Bead Ruptor (Omni International™); B) Billes de céramique utilisée pour broyer le tissu dans un tube approprié à l’homogénéisation; C) Homogénat d’intestin (25 mg/mL)

Lors de l’étape de l’optimisation de la solution d’homogénéisation, des échantillons de foie de souris contrôle fortifiés avec 80 μg de standard de HS et DS ont été homogénéisés dans différents solvants, puis analysés par la méthode de quantification de l’HS et du DS développée dans le cadre de ce projet de recherche. Nos résultats ont démontré que la solution d’homogénéisation peut grandement influencer la précision de la méthode (Tableau 3). En présence même d’une très petite quantité d’eau, une réaction d’hydrolyse se produit en parallèle lors de la réaction de méthanolyse, ce qui a pour effet de réduire les disaccharides dérivés produits lors de la méthanolyse. Ainsi, malgré l’obtention d’une réponse potentiellement plus élevée pour les échantillons homogénéisés dans l’eau soit 0,7 et 59,96 pour l’héparan sulfate et le dermatan sulfate respectivement, nous avons dû opter pour le MeOH comme solution d’homogénéisation malgré une réponse plus faible (0,44 pour le HS et 54,79 pour le DS) dans le but d’obtenir un haut niveau de précision et de reproductibilité fiables et robustes. Effectivement, bien que les réponses mesurées pour les échantillons homogénéisés dans l’eau avaient une réponse plus élevée, ceux-ci présentaient une variation standard relative de près de 10% pour les deux biomarqueurs quantifiés, alors que les

échantillons homogénéisés dans le MeOH présentaient une variation standard relative de 1,17% et de 1,50% pour l'HS et le DS, respectivement.

Tableau 3 Optimisation de la solution d'homogénéisation des tissus. La réponse mesurée correspond au rapport de l'aire sous la courbe mesurée pour l'analyte sur l'aire sous la courbe mesurée du standard interne.

Solution d'homogénéisation	Réponse	
	Héparan Sulfate	Dermatan Sulfate
Méthanol (MeOH)	0,3328 +/- 1,17%	54,79 +/- 1,50%
Eau	0,4746 +/- 9,16%	59,96 +/- 9,92%
MeOH/Eau (50:50)	0,3439 +/- 6,98%	57,77 +/- 0,39%

1.9 La méthanolyse

Pour ce qui est des effets et de la pertinence de la méthanolyse, il est important de comprendre que les glycosaminoglycans sont des molécules chimiquement hétérogènes pouvant varier notamment au niveau de la longueur de la chaîne de sucre et du profil de sulfatation. Pour certaines méthodes de dosage de GAGs totaux, cette hétérogénéité ne pose aucun problème alors que pour d'autres méthodes de dosage de biomarqueurs individuels plus spécifiques, telles que la spectrométrie de masse, cette hétérogénéité peut influencer les résultats. Dans le cas du dosage des GAGs par spectrométrie de masse, il est essentiel d'avoir une uniformité au niveau des molécules à doser. Effectivement, la spectrométrie de masse se base sur des rapports de masse sur charge (m/z) pour identifier et quantifier des molécules. Une variation au niveau du profil de sulfatation ainsi qu'une variation au niveau de la longueur de la chaîne de sucre qui compose le HS et le DS altèrent le rapport m/z ce qui peut ultimement affecter les quantifications par le MS/MS.

Ainsi, pour doser les glycosaminoglycans par spectrométrie de masse, il existe deux solutions possibles afin d'uniformiser les molécules à quantifier, soit la digestion enzymatique et la digestion chimique. Dans les deux cas, l'objectif est le même, soit de produire des disaccharides qui peuvent être quantifiés par spectrométrie de masse à partir de molécules

complexes que sont les GAGs. Chacune de ces méthodes possède des avantages et des désavantages. Dans le cas de la digestion enzymatique, l'utilisation d'enzymes entraîne des coûts supplémentaires et les réactions sont souvent très longues. Par ailleurs, suite à la digestion enzymatique, les disaccharides produits conservent les modifications initialement présentes sur la chaîne complexe de sucre (Volpi et Linhardt, 2010). Ainsi, ce type de procédure peut être très avantageux dans le cas d'études visant l'analyse de différents isoformes présents dans un échantillon. Toutefois, dans le cas qui nous concerne et qui vise à doser l'héparan sulfate (et le dermatan sulfate) en tant qu'un seul et unique biomarqueur, la digestion enzymatique n'est pas appropriée car elle réduit considérablement la sensibilité des analyses en raison des différents composés produits lors de la réaction.

Dans le cas de la digestion chimique des GAGs, ce procédé est plus rapide, simple, moins coûteux et plus sensible. Toutefois, ce type de procédure est incompatible avec les études visant à évaluer les différents isoformes d'un composé présents dans l'échantillon. L'un des produits pouvant être utilisé pour la digestion chimique des chaînes de sucres complexes que sont les GAGs est le MeOH/HCl 3 N qui clivera, lors d'une réaction de méthanolyse, les chaînes complexes de sucre au niveau des liens glucidiques pour produire de plus petits disaccharides. Également, lors de cette réaction, tous les groupements sulfates présents sur les disaccharides seront remplacés par des groupements hydroxyles (Auray-Blais *et al.*, 2012). La Figure 6 montre le principe de la méthanolyse sur l'héparan sulfate et le dermatan sulfate et leurs standards deutérés respectifs.

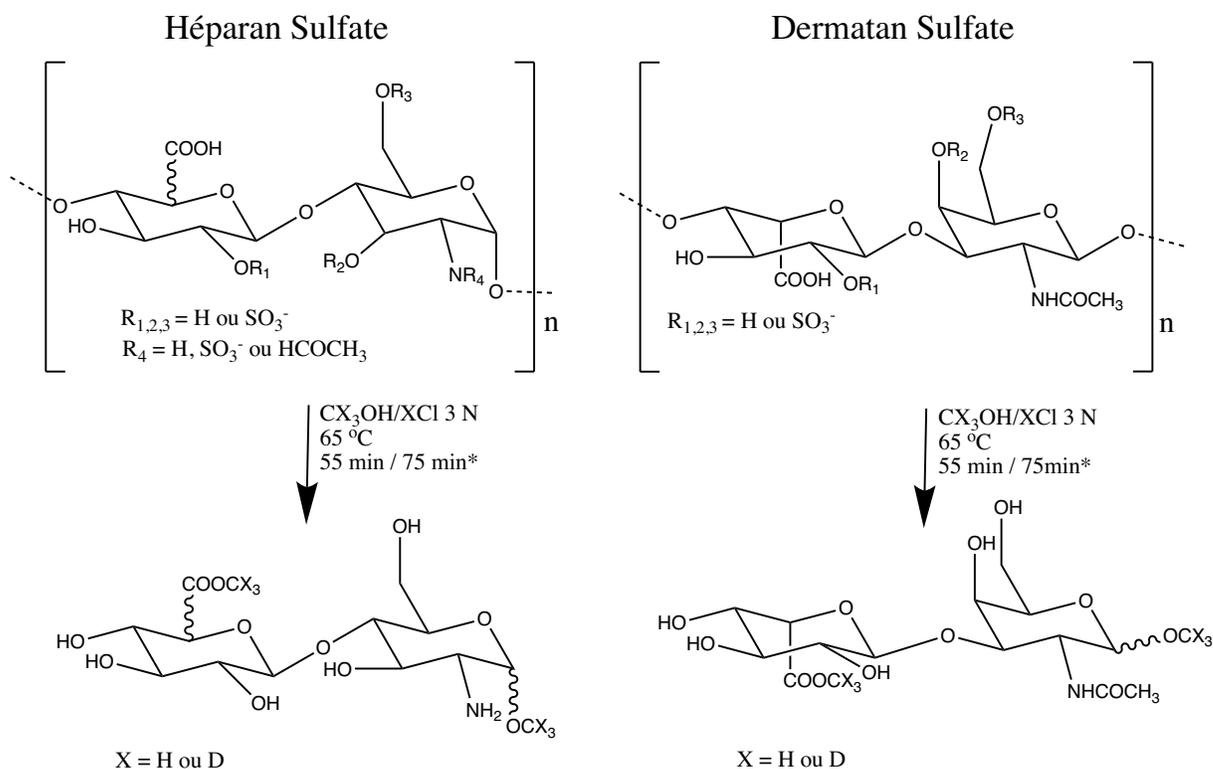


Figure 6. Effets de la méthanolyse sur l'héparan sulfate et le dermatan sulfate. *Correspond à une réaction de deutériométhanolysé utilisée pour la synthèse des standards internes deutérés de HS et de DS.

Nous avons aussi évalué la durée d'incubation optimale pour la méthanolyse (Figure 7). Neuf échantillons de standard du HS et de DS à une concentration 60 µg/mL ont été préparés et analysés de façon identique, sauf au niveau de l'étape de la méthanolyse où chacun des échantillons a été incubé pour une durée différente allant de 35 minutes à 120 minutes à 65°C. Suite à l'analyse des résultats obtenus, il a été possible de constater, à un certain point, une chute du signal mesuré pour le dermatan sulfate, causé par la dégradation des disaccharides en monosaccharides alors que ce phénomène n'est pas présent pour l'héparan sulfate. Nos résultats montrent que l'incubation optimale pour le dermatan sulfate est de 55 min alors que la réaction de dégradation de l'héparan sulfate perdure même après 120 minutes d'incubation. Effectivement, une étude de Trim *et al.*, a révélé que même après 24 heures d'incubation, la réaction de la méthanolyse n'est pas tout à fait complète pour l'héparan sulfate (Trim *et al.*, 2015). Ainsi, dans le cadre de notre étude, nous avons dû chercher un compromis et avons choisi une durée d'incubation de 55 minutes pour la méthanolyse, ce qui correspond à la

durée d'incubation optimale pour le dermatan sulfate. Par ailleurs, puisque les standards d'héparan sulfate et de dermatan sulfate utilisés pour produire la courbe standard lors des analyses sont également méthanolysés, il y a alors compensation de la réaction incomplète par le standard interne deutéré de l'héparan sulfate. Néanmoins, en raison de la grande sensibilité du spectromètre de masse utilisé, il est tout de même possible de quantifier de faibles niveaux d'héparan sulfate, même si la réponse est plus faible que celle du dermatan.

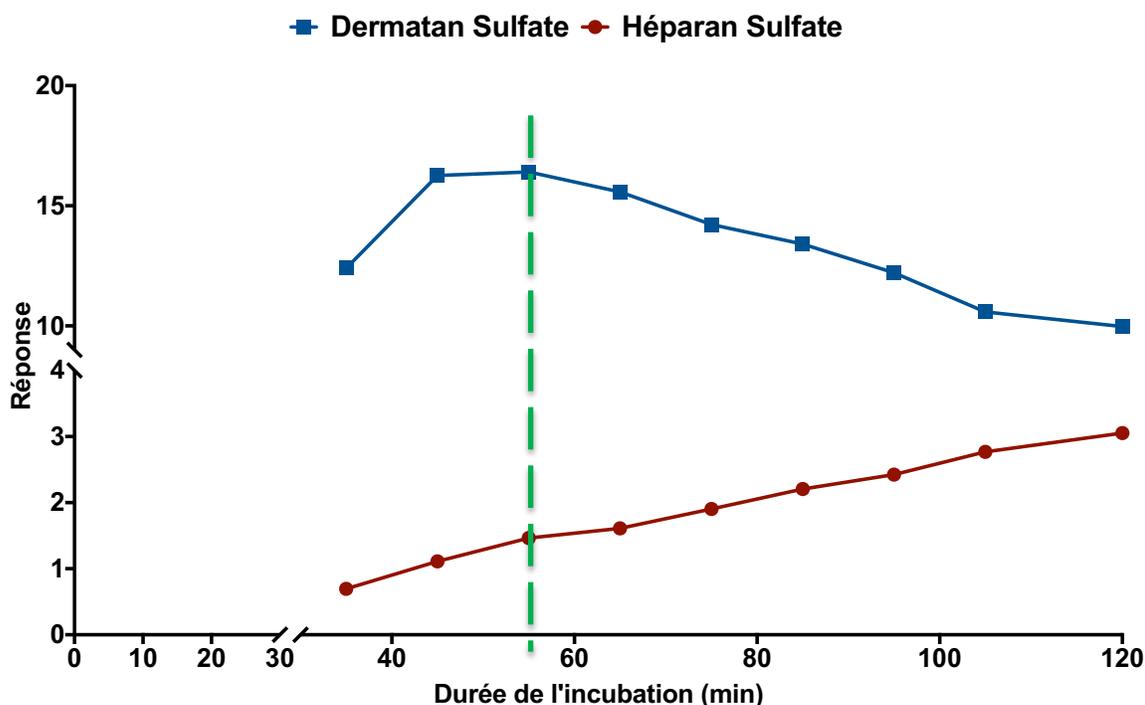


Figure 7. Cinétique de la réaction de la méthanolyse pour l'héparan sulfate et le dermatan sulfate. La réponse correspond au rapport entre l'aire sous la courbe mesurée pour l'analyte (héparan sulfate ou dermatan sulfate) et son standard interne (héparan sulfate et dermatan sulfate deutérés).

Ainsi, les biomarqueurs analysés par spectrométrie de masse pour la mucopolysaccharidose de type II dans le cadre de ce projet de recherche sont des disaccharides dérivés de chaînes complexes de sucre qui ont un m/z pour les ions précurseurs de 384.2 et 426.2 pour l'héparan sulfate et le dermatan sulfate, respectivement, alors que les molécules fragmentées (ions produits) suite au passage dans la cellule à collisions lors de l'analyse par le spectromètre de masse en tandem ont un m/z de 162.0 et 236.0 respectivement (Figure 8).

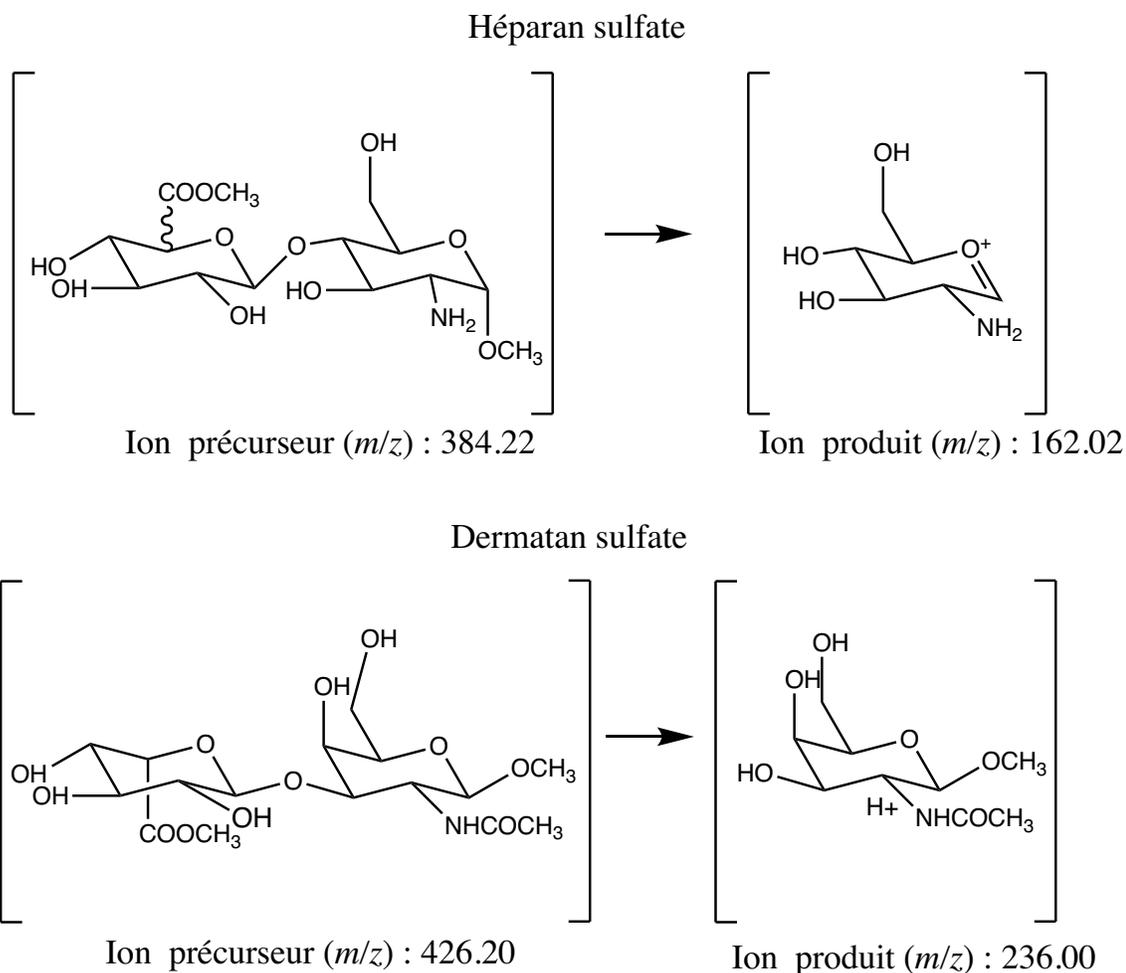


Figure 8. Ions précurseurs et ions produits pour l'héparan sulfate et le dermatan sulfate par spectrométrie de masse en tandem.

1.10 La chromatographie liquide

1.10.1 L'utilité de la chromatographie liquide

La chromatographie liquide est une méthode utilisée pour la séparation des différentes composantes contenues dans un échantillon en fonction de l'affinité de ces différentes composantes pour une phase mobile et une phase stationnaire. Lors de la chromatographie liquide, la phase mobile qui contient les différents composés présents dans l'échantillon traverse la phase stationnaire et, en fonction de l'affinité des différents composés pour la phase stationnaire, ceux-ci peuvent être adsorbés sur celle-ci. Cette technique permet donc de séparer un analyte précis des autres composés indésirables présents dans l'échantillon.

Ainsi, cette technique de séparation des composés de l'échantillon permet de purifier l'analyte à doser (Coskun, 2016).

1.10.2 Les principes de séparation

La colonne utilisée en chromatographie liquide est une colonne cylindrique tapissée de particules, généralement de silice poreuse, à laquelle sont liés différents groupements en fonction du type de chromatographie. Pendant celle-ci, une phase mobile entraîne l'échantillon et ses composantes à travers la phase stationnaire qui est composée de différents groupements (selon le type de chromatographie) liés à la silice poreuse. Les différentes composantes de l'échantillon vont donc se déplacer dans la colonne en fonction de leurs différentes propriétés physico-chimiques, telles que l'hydrophobicité, l'hydrophilicité, le pKa ainsi que la taille desdites composantes. Ils auront donc différents temps de rétention dans la colonne. Les ponts hydrogène, les interactions donneur-accepteur, les interactions ion-dipôle, dipôle-dipôle, dipôle-dipôle induit, dipôle temporaire-dipôles induits de même que les forces de Van der Waals et les interactions hydrophobes sont des types d'interactions qui peuvent influencer l'affinité que peut avoir un analyte pour une phase stationnaire en chromatographie liquide (Buszewski et Noga, 2011). L'affinité des composantes pour la phase stationnaire peut également varier en fonction de la structure moléculaire du soluté, la composition chimique de la phase stationnaire et de la phase mobile, la température et parfois la pression.

En plus des différentes propriétés chimiques affectant la séparation, certains paramètres physiques tels que le débit de la phase mobile et la longueur de la colonne de chromatographie peuvent influencer la séparation des composés (Dong, 2006). Effectivement, la rétention d'un composé peut être exprimée sous la formule mathématique $t_R = L/\mu_x$ où t_R représente le temps de rétention, L représente la longueur de la colonne et μ_x est le taux de migration de l'analyte dans la colonne. C'est donc dire que plus une colonne sera longue, plus les composés aux propriétés similaires seront bien séparés (Snyder *et al.*, 2010).

Dans le cadre de la présente étude, l'un des défis consistait à développer une chromatographie liquide afin de séparer les différents types de GAGs. Après plusieurs essais de colonnes différentes, nous avons choisi la colonne de chromatographie présentant une interaction

hydrophile à ultra performance CORTECS HILIC (Waters Corp.). Cette colonne a permis de séparer efficacement le dermatan sulfate du chondroïtine sulfate et de l'héparan sulfate, de même que leurs standards internes deutérés respectifs. Les deux phases mobiles étaient composées de 95:5 ACN:H₂O + 0,2% HCOOH + 10 mM CH₃COONH (phase A) et de 90:10 H₂O:ACN + 0,2% HCOOH + 10 mM CH₃COONH₄ (phase B) pour les phases organiques et aqueuses, respectivement. Ces modifications à la méthode du dosage des GAGs urinaires proposée par Auray-Blais *et al.*, qui utilisait une colonne chromatographique BEH Amide ainsi qu'une phase aqueuse et organique composées de 90:10 ACN:H₂O + 10 mM CH₃COONH₄ (phase A) et de 90:10 H₂O:ACN + 10 mM CH₃COONH₄ (phase B) (Auray-Blais *et al.*, 2016) ont permis d'augmenter le temps de rétention et offrir une meilleure séparation des molécules d'intérêt. De plus, nous analysons des composés protonés plutôt que des composés liés à des adduits sodiés, ce qui ultimement augmente le signal mesuré en spectrométrie de masse. Également, l'utilisation de la colonne CORTECS HILIC a permis de séparer une molécule interférente du standard interne deutéré d'héparan sulfate. Effectivement, cette molécule interférente est présente de manière endogène dans les tissus à différentes concentrations et possède les mêmes transitions de rapport *m/z* que le standard interne deutéré d'héparan sulfate. L'analyse en spectrométrie de masse en tandem ne parvenait donc pas à différencier le standard interne deutéré d'héparan sulfate de l'interférent présent de manière endogène dans les tissus. De fait, avec la colonne BEH Amide les deux composés avaient le même temps de rétention en plus d'avoir les mêmes transitions, ce qui avait ultimement pour effet de faire varier la concentration du standard interne dans les différentes matrices et par le fait même, fausser les résultats. La Figure 9 est le résultat d'une analyse par spectrométrie de masse en temps de vol qui a permis de déceler l'interférent qui coélue avec le standard interne d'héparan sulfate suite à une séparation chromatographique avec la colonne BEH Amide. Dans le cadre de cette expérience, qui avait pour but d'identifier l'interférent à l'aide de la spectrométrie de masse en temps de vol (Q-TOF), un homogénat de foie à une concentration de 50 mg/mL a été préparé. L'utilisation d'un homogénat plus concentré qu'à l'habitude a permis d'augmenter le signal de l'interférent présent de façon endogène dans la matrice. Aucun autre paramètre touchant la préparation de l'échantillon n'a été modifié. En ce qui a trait à la méthode de quantification par UPLC-Q-TOF à l'aide du Synapt G1 (Waters Corp.), aucun paramètre n'a été modifié par rapport à la méthode développée sur le spectromètre de masse en tandem Xevo TQ-S micro. C'est donc dire que

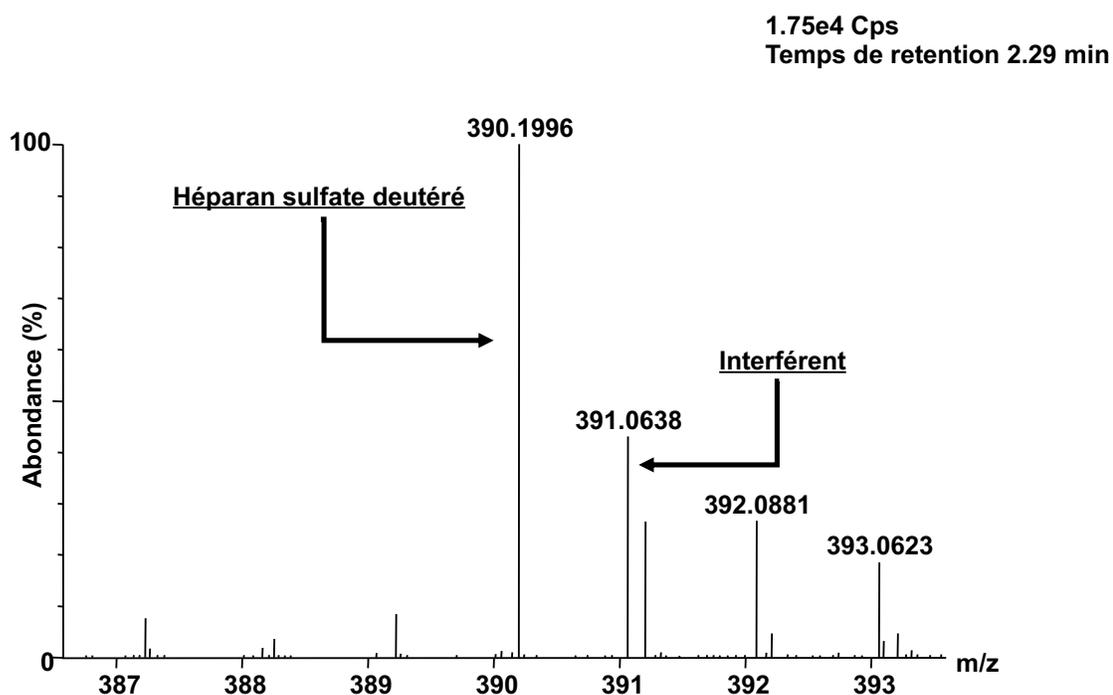
les mêmes paramètres UPLC avec la colonne BEH Amide (Tableau 4) et les mêmes paramètres MS/MS (Tableau 5) ont été utilisés sans optimisation subséquente en raison du changement de l'utilisation de l'appareil. L'analyse par Q-TOF a révélé que l'héparan sulfate de même que l'interférent avaient un ion précurseur similaire ainsi que le même temps de rétention (2.29 min) lorsqu'une colonne BEH Amide (Waters Corp.) était utilisée (Figure 9).

Tableau 4 Paramètres chromatographiques utilisés pour l'analyse d'un homogénat de foie par Q-TOF.

Paramètres	Description
Colonne	BEH Amide
Dimension de la colonne	2.1 x 50 mm
Taille des particules	1.7 μ m
Température	30°C
Solvant "weak wash"	90:10 ACN:H ₂ O + 0.2% acide formique
Solvant "strong wash"	50:50 MeOH:H ₂ O
Volume d'injection	4 μ L
Température de l'échantionneur	10°C
Phase mobile A	90:10 ACN:H ₂ O + 0.2% acide formique + 10 mM CH ₃ COONH ₄
Phase mobile B	10:90 ACN:H ₂ O + 0.2% acide formique + 10 mM CH ₃ COONH ₄
Débit	0.45 mL/min
Gradient (% phase mobile B)	0.00 → 1.00 min: 0% 1.00 → 3.00 min: 0-40% (gradient linéaire) 3.00 → 5.00 min: 60% 5.00 → 7.00 min: 0%

Tableau 5 Paramètres MS/MS utilisés pour l'analyse d'un homogénat de foie par Q-TOF.

Paramètre MS/MS	Description
Mode d'ionisation	Électronébulisation
Polarité	Positive
Voltage du capillaire	3.44 kV
Température de désolvatation	500°C
Débit du gaz de désolvatation	700 L/h
Débit du gaz du cône	150 L/h
Température de la source	120°C
Étendue de masses analysées	50 à 1000 Da
Fréquence de balayage	0.1 seconde
Mode de l'analyseur	Mode V

**Figure 9.** Spectre de masse obtenu à l'aide d'un quadripôle-temps de vol d'un homogénat de foie de souris afin d'identifier l'interférent présent dans la matrice de foie.

Le programme chromatographique optimisé pour la colonne CORTECS HILIC décrit au Tableau 6, parvient quant à lui à séparer ces deux composés, considérant que le spectromètre de masse ne pouvait faire une distinction entre eux puisqu'ils avaient des transitions similaires. Ceci a permis une amélioration de la justesse de la méthode d'analyse lors de la

quantification de l'héparan sulfate (Figure 10). Ainsi, puisque la concentration du standard interne est constante dans tous les échantillons et que celle-ci n'est pas affectée par un interférent (dont la concentration pouvait varier selon la matrice), les réponses mesurées dans une matrice donnée peuvent être comparées à celles mesurées dans une matrice totalement différente. La séparation de ces deux composantes a par la suite permis d'utiliser une courbe de calibration standard dans l'eau pour chacune des différentes matrices, plutôt que des courbes dans les matrices elles-mêmes.

Tableau 6 Paramètres chromatographiques utilisés pour l'analyse d'un homogénat de foie par UPLC-MS/MS (Xevo TQ-S micro, Waters Corp.)

Paramètres	Description
Colonne	CORTECS HILIC
Dimension de la colonne	2.1 x 50 mm
Taille des particules	1.7 μm
Température	30°C
Solvant "weak wash"	95:5 ACN:H ₂ O + 0.2% acide formique
Solvant "strong wash"	50:50 MeOH:H ₂ O
Volume d'injection	4 μL
Température de l'échantionneur	10°C
Phase mobile A	95:5 ACN:H ₂ O + 0.2% acide formique + 10 mM CH ₃ COONH ₄
Phase mobile B	10:90 ACN:H ₂ O + 0.2% acide formique + 10 mM CH ₃ COONH ₄
Débit	0.45 mL/min
Gradient (% phase mobile B)	0.00 → 1.00 min: 0% 1.00 → 3.00 min: 0-40% (gradient linéaire) 3.00 → 4.50 min: 70% 4.50 → 6.00 min: 0%

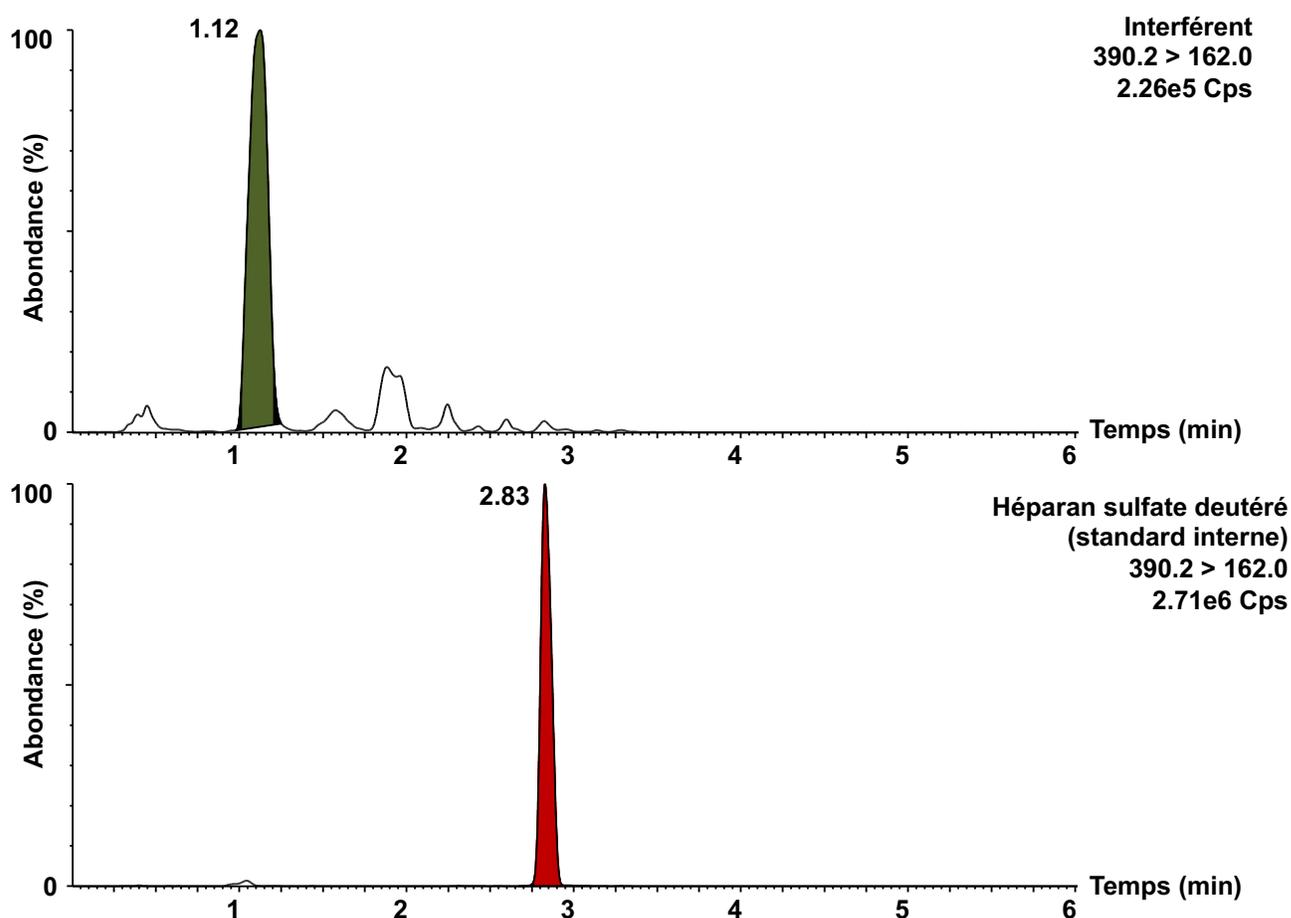


Figure 10. La colonne CORTECS HILIC permet de séparer l'interférent présent de manière endogène à différentes concentrations dans les tissus de souris du standard interne deutéré d'héparan sulfate.

Des tests subséquents ont également été réalisés pour s'assurer qu'il n'y ait pas de contamination du pic de dermatan sulfate par le chondroïtine sulfate (Figure 11). Effectivement, le chondroïtine sulfate et le dermatan sulfate sont des molécules qui possèdent des propriétés physico-chimiques similaires. Notamment, suite à l'ionisation, les ions précurseurs de même que les ions produits ont les mêmes transitions pour les deux molécules. Il est donc très important de pouvoir différencier ces deux composantes lors de la chromatographie liquide afin d'éviter des surestimations (biais) lors de l'analyse des différents spécimens. Afin d'évaluer si le CS est séparé adéquatement du DS, un échantillon de foie ainsi qu'un standard pur de CS à une concentration de 300 mg/mL ont été préparés,

puis analysés à l'aide du Xevo TQ-S micro. Les paramètres chromatographiques sont décrits au Tableau 6.

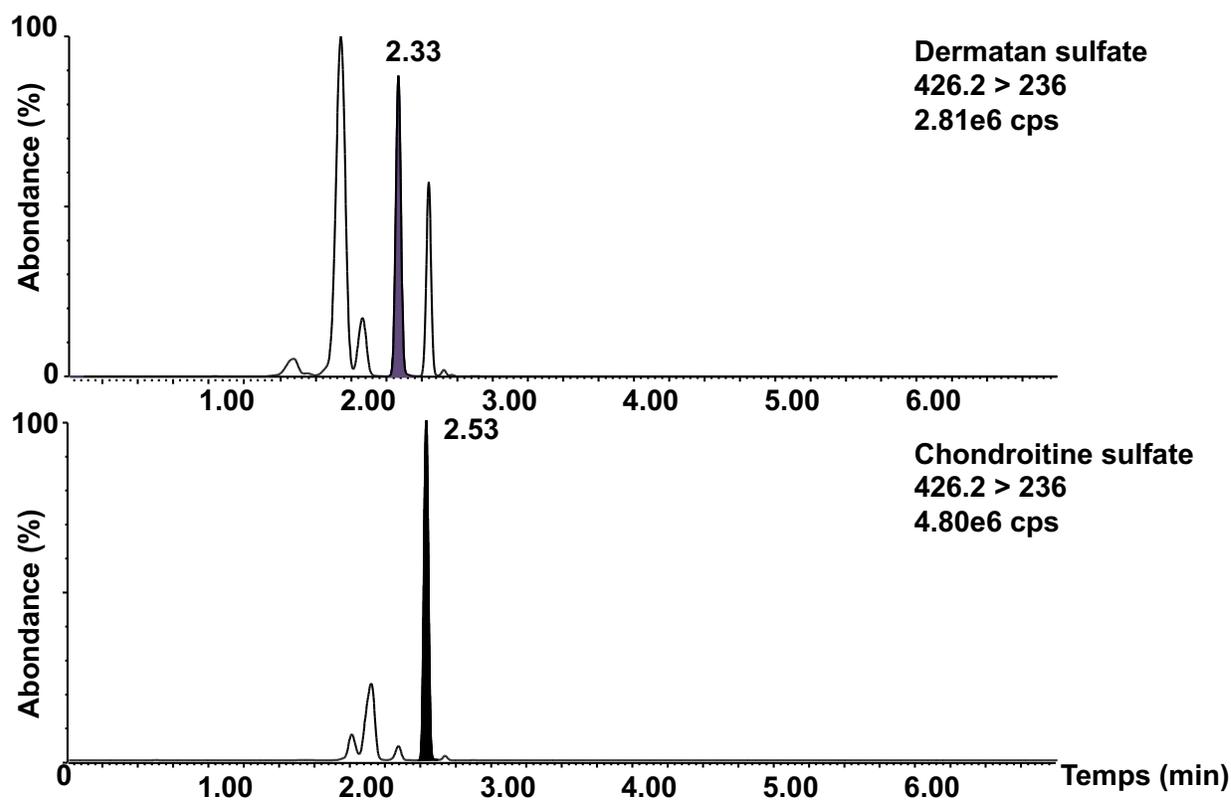


Figure 11. Séparation chromatographique de 6 μg de dermatan sulfate et de chondroïtine sulfate considérant que ces molécules ont des propriétés physico-chimiques similaires et possèdent les mêmes ions précurseurs et ions produits.

Ainsi, grâce à la méthode chromatographique optimisée qui a été mise au point (Figure 12) dont les paramètres sont mentionnés au Tableau 6, il est possible de cibler les différents analytes d'intérêt et de les quantifier de façon fiable et reproductible, d'une matrice à l'autre à l'aide d'une courbe standard dans l'eau.

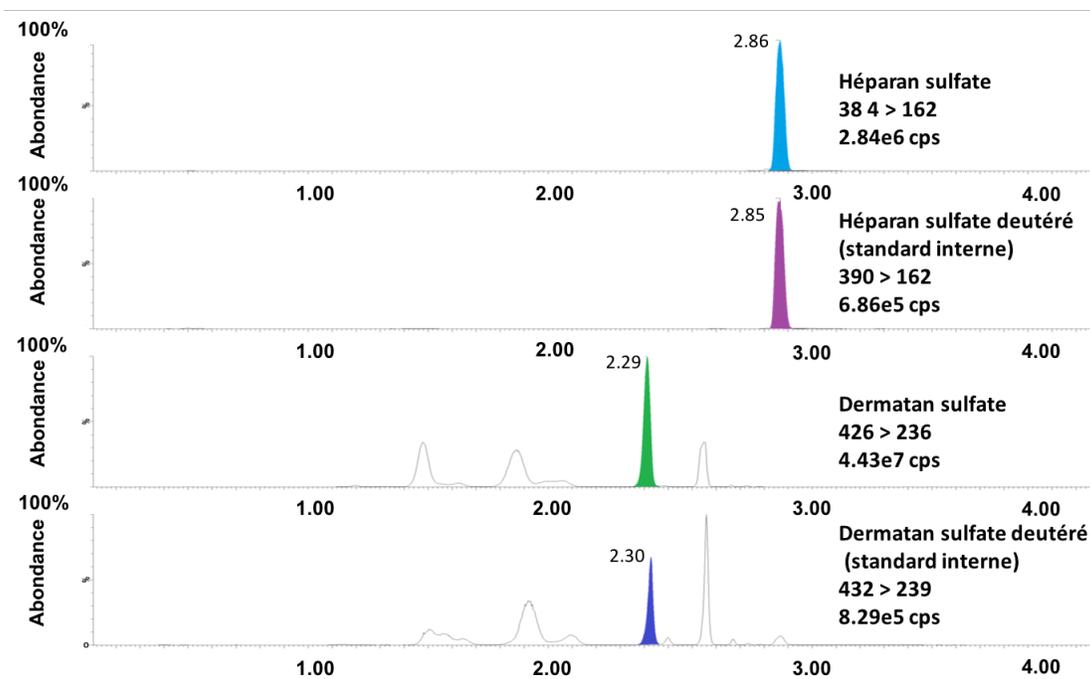


Figure 12. Séparation chromatographique de l'héparan sulfate, du dermatan sulfate ainsi que de leurs standards internes deutérés respectifs.

1.10.3 L'effet de matrice

L'un des problèmes majeurs auxquels les utilisateurs de la spectrométrie de masse en tandem doivent faire face est sans contredit l'effet de matrice (Ghosh *et al.*, 2012). L'effet de matrice est un phénomène faisant en sorte que le signal de l'analyte mesuré dans une solution standard diminue fortement lorsque le même analyte et dans les mêmes concentrations est mesuré dans une matrice complexe ce qui a donc pour effet de diminuer la justesse des analyses. Ces effets de matrices sont causés par des composés présents de manière endogène dans la matrice analysée qui co-éluent avec l'analyte et qui altèrent la chromatographie ainsi que l'ionisation de l'analyte (Panuwet *et al.*, 2015). Ainsi, la suppression ionique ou le rehaussement ionique sont deux éléments souvent observés dans les cas d'effet de matrice. Plusieurs éléments tels que le mode d'ionisation, la préparation de l'échantillon ainsi que la nature de la matrice peuvent jouer un rôle au niveau de l'ampleur de l'effet de matrice mesurée (Dams *et al.*, 2003). Il est donc important de considérer et d'évaluer l'impact que peut avoir l'effet de matrice lors des analyses dans le développement d'une méthode d'analyse. Il existe plusieurs méthodes pour évaluer l'effet de matrice telles l'infusion post-colonne ou la méthode de fortification.

La méthode de l'infusion post-colonne consiste à infuser un standard de la molécule à doser à l'aide d'une pompe auxiliaire et, en même temps, injecter des matrices contrôles. Puisque l'infusion est constante dans le temps, le signal devrait être également constant s'il n'y a pas d'effet de matrice. Lorsqu'une chute ou une hausse de signal est observée, il s'agit d'un indicatif de la présence d'un composé présent dans la matrice qui altère le signal du standard infusé. Si ce composé élue en même temps que l'analyte lors des analyses, ce composé sera à l'origine de l'effet de matrice (Eeckhaut *et al.*, 2009). Il est cependant à noter que dans le cadre de la présente étude, les deux biomarqueurs à doser sont également faiblement présents de manière endogène dans la matrice. Il est donc impossible d'évaluer l'effet de matrice avec précision, car les analytes présents de manière endogène contribuent à augmenter le signal lors de l'infusion.

La seconde méthode, soit la méthode de fortification, consiste à ajouter une concentration connue de standard dans différentes matrices, puis d'évaluer la variation de la réponse dans ces différentes matrices. Ainsi, contrairement à l'infusion post-colonne qui permet d'obtenir un résultat qualitatif sur la présence de l'effet de matrice, la méthode de fortification permet de connaître précisément le biais causé par l'effet de matrice (Eeckhaut *et al.*, 2009). Nous avons donc opté pour la méthode de fortification dans le cadre de cette étude. Ainsi, au début du projet, avant les différentes optimisations et ajustements des paramètres, les biais suivants ont été observés pour les différentes matrices (Tableau 7). Afin d'évaluer l'effet de matrice, des échantillons de chacun des différents tissus et liquides biologiques étudiés ont été fortifiés avec 4,8 µg/mg de standard d'HS et DS. Lors de l'étape de resuspension, aucun standard interne n'a été ajouté. Il a donc été possible d'estimer l'effet de matrice en mesurant le biais des différents échantillons, car l'effet de matrice n'était corrigé par les standards internes.

Tableau 7 Évaluation de l'effet de matrice dans différents tissus de souris avant l'optimisation de la méthodologie.

Matrice	Biais (%)	
	Héparan sulfate	Dermatan Sulfate
Foie	- 34,99	30,39
Cerveau	- 82,85	45,19
Cœur	- 43,78	44,44
Petit intestin	- 56,23	18,04
Reins	- 16,68	56,23
Poumons	- 32,62	72,99
Rate	- 87,46	13,28

Lorsqu'un effet de matrice majeur est observé au cours du développement d'une méthode d'analyse en spectrométrie de masse, plusieurs solutions existent afin de réduire au minimum cet effet de matrice. L'utilisation d'un standard interne approprié, des modifications au niveau de la chromatographie, des dilutions de l'échantillon, ainsi que l'ajout d'étapes de purification lors de la préparation de l'échantillon telle que l'extraction liquide-liquide, l'extraction en phase solide, la précipitation protéique sont des moyens utilisés pour réduire l'effet de matrice. (Boisvert, 2014)

Dans la présente étude, la préparation de l'échantillon n'implique aucune étape de purification autre que la filtration par filtre avec une seringue en teflon (PTFE; 13 mm de diamètre, pores de 0,22 μm , Fisherbrand, Hampton, NH, É-U). Seule la chromatographie liquide ainsi qu'un standard interne deutéré ont été utilisés pour corriger les effets de matrice de manière satisfaisante. Le standard interne consiste en une molécule, idéalement un standard lourd de l'analyte, ayant des propriétés physiques et chimiques semblables à ce dernier. Le standard interne aura notamment un recouvrement similaire lors du traitement des échantillons, une réponse semblable lors de l'ionisation ainsi que le même temps de rétention en chromatographie que celui de la molécule d'intérêt. Lors des différentes étapes de préparation des échantillons qui incluent parfois des dilutions, des extractions, des évaporations ainsi que des reconstitutions, des pertes peuvent survenir. Puisque l'analyte et

le standard interne ont des propriétés physico-chimiques très semblables, les pertes de l'analyte seront équivalentes aux pertes du standard interne donc, la réponse, c'est-à-dire le rapport entre l'aire sous la courbe mesurée pour l'analyte et l'aire sous la courbe mesurée pour le standard interne demeure le même (Tan *et al.*, 2012). Le standard interne corrige donc pour les différentes pertes à survenir lors de la préparation des échantillons. Également, lorsqu'un composé présent de manière endogène dans la matrice affecte l'ionisation de l'analyte, il affectera également l'ionisation du composé de manière similaire. Ainsi, encore une fois, la réponse demeurera la même. Le standard interne sert donc, en plus de corriger pour les différentes pertes à survenir lors de la préparation des échantillons, à corriger l'effet de matrice (Tan *et al.*, 2012). Les résultats obtenus par la correction de l'effet de matrice sont présentés dans le manuscrit soumis à *Bioanalysis* (Supplemental Figure 4).

1.11 La spectrométrie de masse

Au début du 20^e siècle, les notions sur lesquelles se base la spectrométrie de masse d'aujourd'hui étaient principalement utilisées pour mesurer la masse des atomes tel que décrit par les travaux de J.J Thomson en 1899 (Thomson, 1899). D'ailleurs, la spectrométrie de masse a grandement contribué à démontrer l'existence des isotopes (Aston, 1920). Dans les années 1940, ce sont majoritairement des chimistes oeuvrant dans le domaine du pétrole qui utilisaient la spectrométrie de masse dans le but de quantifier la formation de certains hydrocarbures lors de certains procédés (Griffiths, 2008). Ce n'est toutefois que dans les années '60 que la communauté scientifique comprit que la spectrométrie de masse ne s'applique pas uniquement à l'industrie du pétrole, mais bien qu'il s'agit d'une technologie qui peut être appliquée dans un grand nombre de domaines (Griffiths, 2008). Depuis, la spectrométrie de masse n'a cessé d'évoluer et de faire de plus en plus d'adeptes en vue de multiples applications.

1.11.1 Les principes de base

En spectrométrie de masse, peu importe la nature de l'appareillage utilisé, les principes de base demeurent les mêmes. Les objectifs sont de: 1) générer des ions à partir du composé à analyser; 2) séparer les ions générés en phase gazeuse en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z); et finalement: 3) détecter ces ions de manière quantitative ou qualitative. Tous les spectromètres de masse sont composés globalement des mêmes éléments. Ils consistent

en une source d'ions, un analyseur de masse, ainsi qu'un détecteur (Gross & Roepstorff, 2014) (Figure 13). Il est également à noter que d'autres éléments tels qu'un chromatographe en phase liquide ou gazeuse peut s'ajouter au spectromètre de masse dans le but de purifier l'échantillon et donc d'obtenir de meilleure performance en termes de sensibilité, spécificité et justesse.



Figure 13. Coupe schématique d'un spectromètre de masse (figure adaptée de Gross & Roepstorff, 2014).

Il existe plusieurs types de méthodes d'ionisation et plusieurs types d'appareils, chacun comportant son lot d'avantages et de désavantages en fonction des différents usages possibles et des différents composés à analyser. Effectivement, la spectrométrie de masse possède de nombreux domaines d'application tels que la clinique, l'environnement, le pharmaceutique, la médecine légale, la recherche et autres. Tous ces domaines possèdent leurs propres besoins (Seger, 2012). Ainsi, les composés à doser, le type d'analyses à faire ainsi que les différentes contraintes spécifiques auxquelles les champs variés d'application doivent faire face font en sorte que certains appareils sont mieux adaptés à exécuter la tâche désirée. Par exemple, dans un laboratoire de recherche qui s'intéresse à la découverte de nouveaux biomarqueurs, un spectromètre de masse en temps de vol est un incontournable en raison de sa précision au niveau des masses mesurées, sa rapidité d'acquisition et sa sensibilité lorsqu'utilisé sur une vaste étendue de masses. Toutefois, dans le domaine clinique, un spectromètre de masse en tandem est nettement plus avantageux puisque l'on cherche à doser un analyte précis dans une matrice complexe. Ainsi, les spectromètres de masse en tandem ont un plus faible coût et ils offrent une grande sensibilité et sélectivité permettant d'atteindre une limite de quantification la plus faible possible pour un analyte précis (Stewart *et al.*, 2015; Choi *et al.*, 2003). Également, selon l'analyte à doser, un spectromètre de masse couplé à la chromatographie liquide (LC-MS/MS) peut s'avérer plus approprié alors que pour d'autres analytes, d'autres systèmes peuvent offrir de meilleurs résultats. Dans le cas des composés

non volatils, polaires et thermolabiles par exemple, le LC-MS/MS s'avère une option de choix en raison de sa compatibilité avec l'électronébulisation alors que pour des composés de faible poids moléculaire, hydrophobes et thermostables, le spectromètre de masse couplé à la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS) peut fournir de meilleurs résultats (Nair et Clarke, 2017). Ainsi, il existe plusieurs types de systèmes, plusieurs modes d'ionisation et plusieurs analyseurs de masses, tous comportant des avantages et des désavantages en fonction du type d'analyse à faire et des composés à analyser.

1.11.2 Les caractéristiques du spectromètre de masse utilisé

Le Xevo TQ-S micro, un appareil de la compagnie Waters Corp., est le spectromètre de masse en tandem qui a principalement été utilisé dans le cadre de la présente étude.



Figure 14. Xevo TQ-S Micro, spectromètre de masse en tandem (à gauche) couplé à un système de chromatographie liquide à ultra haute performance Acuity I-Class (à droite) (Waters Corp.)

Ce dernier était couplé à un chromatographe à ultra haute performance (UPLC) de type Acquity I-Class (Waters). Les analytes d'intérêt, soit l'héparan sulfate et le dermatan sulfate, ont été ionisés par électronébulisation en mode positif et les analyses ont été faites en mode « monitoring de réactions multiples » (MRM) dans le but de s'assurer d'une spécificité et d'une sensibilité optimales lors des différentes analyses

1.11.2.1 Les caractéristiques du mode d'ionisation

L'électronébulisation est un mode d'ionisation douce, c'est-à-dire qui génère des ions ayant un nombre pair d'électrons et donc qui seront stables. Ce type d'ionisation est fréquemment utilisé et s'avère particulièrement efficace pour les composés non volatils et thermolabiles (Gross & Roepstorff, 2014). Dans ce mode d'ionisation, un champ électrique est appliqué à un capillaire contenant l'échantillon à analyser sous forme liquide, préalablement séparé par chromatographie liquide. Le champ électrique, pouvant être positif ou négatif, provoque une accumulation de charges à la surface du liquide. Sous l'effet des mouvements de ces charges ainsi qu'en raison de la tension de surface, la forme de ménisque normalement présente à l'extrémité du capillaire se déforme jusqu'à prendre la forme d'un cône (cône de Taylor). Lorsque les répulsions coulombiennes entre les mêmes charges dépassent la tension de surface du liquide, des gouttelettes chargées seront produites à partir du jet provenant de l'apex du cône de Taylor. Les gouttelettes chargées alors générées seront acheminées vers une chambre d'évaporation où elles seront soumises à de hautes températures ainsi qu'à des gaz de nébulisation, ce qui aura pour effet d'évaporer le solvant dans lequel se trouvent les ions, ce qui, ultimement, causera une augmentation de la densité des charges (Gross & Roepstorff, 2014).

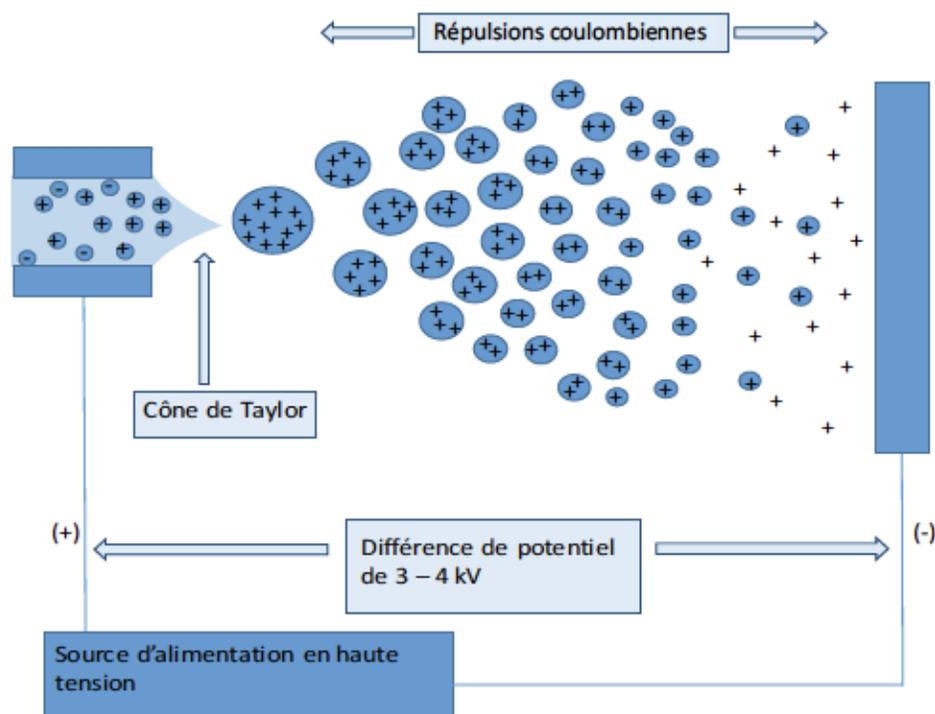


Figure 15. Principe de l'ionisation par électronébulisation positive (adaptée de Gross & Roepstorff, 2014).

Ainsi, la tension de surface du liquide, la permittivité du vide et le rayon du capillaire sont les composantes qui dictent l'intensité du champ électrique requis pour que l'électronébulisation ait lieu. L'impact de ces différentes composantes peut être décrit par la formule mathématique $E_0 \propto \sqrt{\frac{2\gamma \cos 49^\circ}{\epsilon_0 r_0}}$ où E_0 est le champ électrique requis pour le processus d'électronébulisation, γ représente la tension de surface du liquide, 49° est la moitié d'angle du cône de Taylor, ϵ_0 est la permittivité du vide et finalement, r_c représente rayon du capillaire (Gross & Roepstorff, 2014)

1.11.2.2 Les caractéristiques de l'analyseur de masses utilisé pour ce projet

L'analyseur utilisé dans le cadre de cette étude est le triple quadripôle, qui utilisé en tandem, comporte deux quadripôles séparés par un hexapôle (cellule de collisions). Tous ces éléments jouent un rôle majeur pour les analyses en mode MRM qui permet d'obtenir une grande sensibilité et spécificité. Chacun des deux quadripôles est constitué de 4 tiges pairées en parallèle, liées entre elles par un circuit électrique. Lorsqu'une radiofréquence ainsi qu'un

courant électrique sont appliqués aux tiges opposées, il se crée un champ électrique où seulement les ions ayant des rapports m/z sélectionnés auront une trajectoire dite stable lors de leur passage dans le quadripôle. Les ions non désirés, c'est-à-dire les ions ayant des rapports m/z différents des analytes auront une trajectoire instable et seront déviés hors du quadripôle. Ces ions donc ne parviendront pas au détecteur ou à la cellule de collisions. À l'opposé, les ions ayant une trajectoire stable, vont se rendre au détecteur afin d'être quantifiés ou bien à la cellule de collisions afin d'être fragmentés (Nair et Clarke, 2017) (Figure 16).

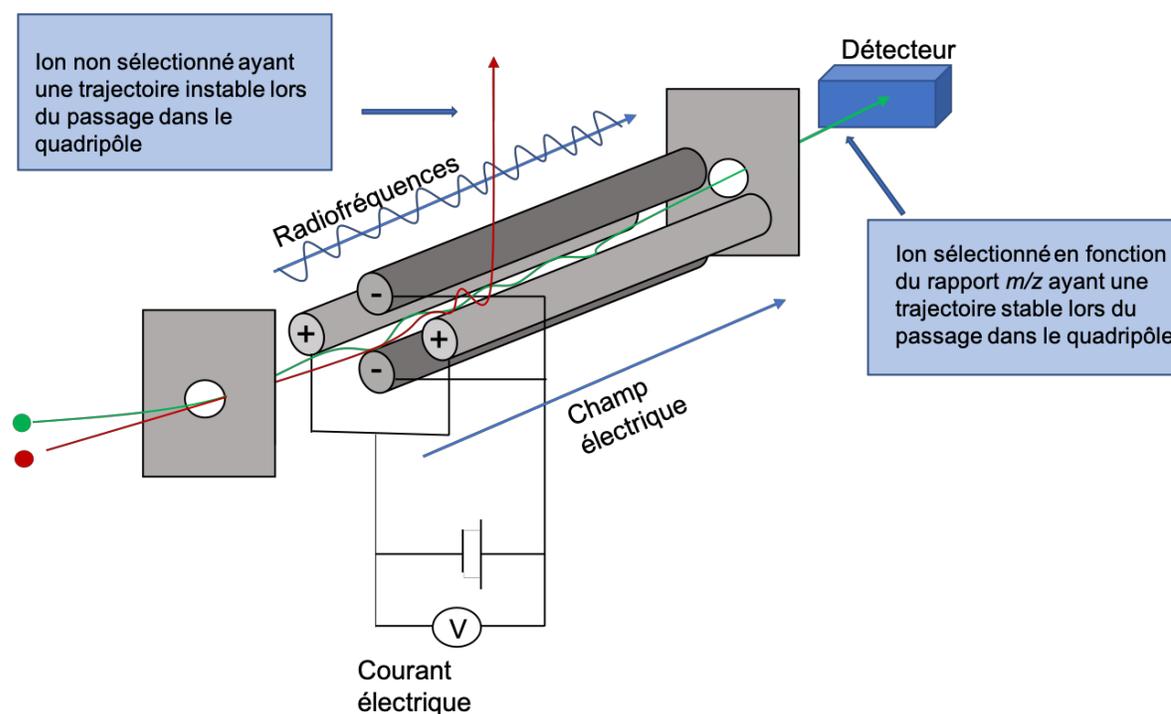


Figure 16. Coupe schématique d'un quadripôle.

Au niveau de la cellule de collisions, il s'agit d'un hexapôle dans lequel, sous l'influence d'un voltage, les ions sont accélérés et leur énergie cinétique est grandement augmentée. Ces ions entrent ensuite en collision avec des atomes de gaz inerte (souvent de l'argon ou de l'hélium) ce qui aura pour effet de transformer l'énergie cinétique en énergie interne au sein des ions. Cette énergie interne causera des bris au niveau des liaisons de la molécule ionisée et il y aura production de nombreux ions fragments. Les ions fragments de l'analyte seront alors filtrés par un second quadripôle fonctionnant exactement comme le premier, mais sélectionnant un ion produit plutôt qu'un ion précurseur. En spectrométrie de masse, les

matrices analysées sont souvent très complexes. Deux composés peuvent avoir un même rapport m/z , ce qui pourrait causer des problèmes de sélectivité et affecter la justesse des dosages. Les analyses en MRM où il y a une sélection d'un ion précurseur dans le premier quadripôle, une fragmentation de l'ion précurseur dans la cellule de collisions et une sélection d'un ion produit dans le second quadripôle, s'avère être un mode d'analyse de choix pour s'assurer d'une grande sensibilité, une grande sélectivité ainsi que robustesse lors des analyses de matrices complexes (Lindon *et al.*, 2010).

Il est toutefois important de mentionner que lors du développement d'une méthode, plusieurs autres modes d'analyses tels que le mode « enregistrement d'un seul ion (*single ion recording*) » et le mode « balayage d'ions produits » seront essentiels pour identifier l'analyte à doser et ses fragments. Effectivement, dans le mode « enregistrement d'un seul ion », seul le premier quadripôle est en fonction. La cellule de collisions ne fragmentera pas l'ion d'intérêt et bien sûr le second quadripôle ne pourra pas sélectionner un ion fragment. Il sera alors possible d'identifier le standard de la molécule d'intérêt dans une matrice exempte de contaminant. Dans le cas du mode « balayage d'ions produits », le premier quadripôle ainsi que la cellule de collisions seront en fonction alors que le second quadripôle effectuera un balayage des différents ions présents ce qui permettra d'identifier différents ions issus de la fragmentation de l'ion d'intérêt et donc sélectionner l'ion le plus approprié pour le dosage.

Rappelons que dans le cadre de l'analyse des échantillons de cette étude, nous avons travaillé en mode MRM et les ions sélectionnés pour la quantification des biomarqueurs avaient les transitions m/z : $426.2 > 236.2$ et $384.2 > 162.2$ pour le DS et l'HS, respectivement.

1.11.3 L'optimisation des paramètres

Tel que discuté dans les sections précédentes, nombreux sont les paramètres dont il faut tenir en ligne de compte lors du développement d'une méthode en spectrométrie de masse. Dans l'optique d'obtenir le meilleur signal ainsi que la plus haute sensibilité possible, différents paramètres au niveau de l'ionisation et de l'analyseur de masse doivent être optimisés. Effectivement, il est primordial d'optimiser certains paramètres tels que la température de désolvatation, le voltage du cône, le voltage du capillaire, l'énergie de la cellule à collisions ainsi que le voltage de la lentille de radiofréquence (RF). En optimisant les différents

paramètres pour chacune des molécules à analyser, nous nous assurons d'obtenir le meilleur signal possible et une sensibilité accrue.

Dans la présente étude, les paramètres relatifs à chacun des analytes ont été évalués à l'aide de standards du HS et du DS à une concentration de 300 mg/mL. Un échantillon a été préparé puis injecté à différentes conditions selon le paramètre à optimiser. Par exemple, dans le cas de l'optimisation du voltage de la cellule à collisions, le même échantillon a été injecté 13 fois avec des voltages de cellule à collisions variant entre 0 et 24 volts pour le HS et des voltages compris entre 0 et 18 volts pour le DS. Les autres paramètres MS/MS sont demeurés inchangés. La valeur optimale fut la valeur de voltage ayant généré l'aire sous la courbe la plus élevée pour l'analyte en question. Ainsi, lors de l'optimisation, il a été possible d'observer à quel point certains paramètres peuvent jouer un rôle important au niveau du signal mesuré. Les Figures 17 et 18 démontrent les différentes aires sous la courbe qui ont été mesurées lors de l'optimisation du voltage de la cellule à collisions ainsi que du voltage du cône. Nos essais démontrent que les voltages optimaux de la cellule à collisions ainsi que les voltages du cône sont de 14 volts et de 16 volts pour l'héparan sulfate et de 8 volts et 32 volts pour le dermatan sulfate, respectivement.

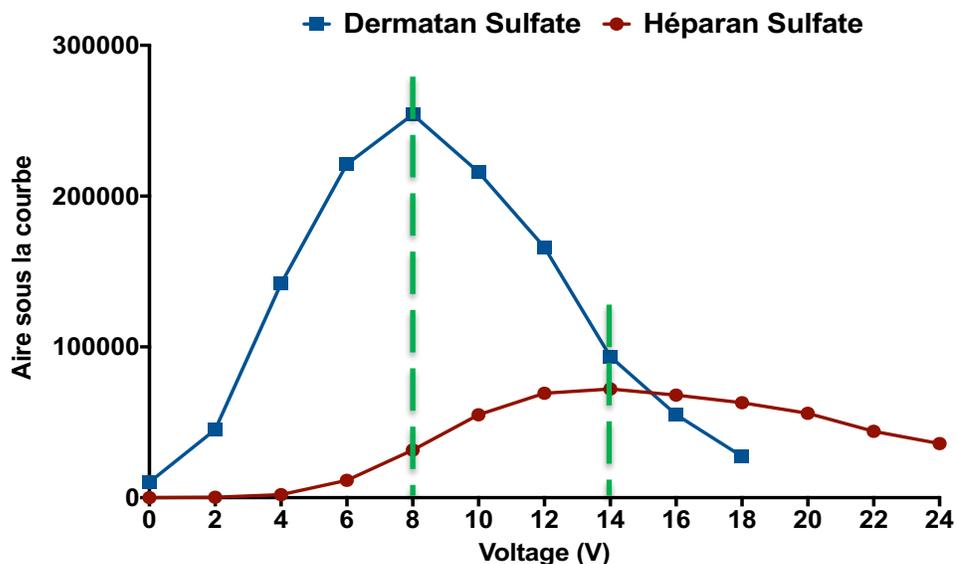


Figure 17. Optimisation des paramètres du voltage de la cellule à collisions pour l'HS et le DS. Les paramètres optimaux pour le voltage de collision sont de 14 et 8 volts pour l'HS et le DS, respectivement.

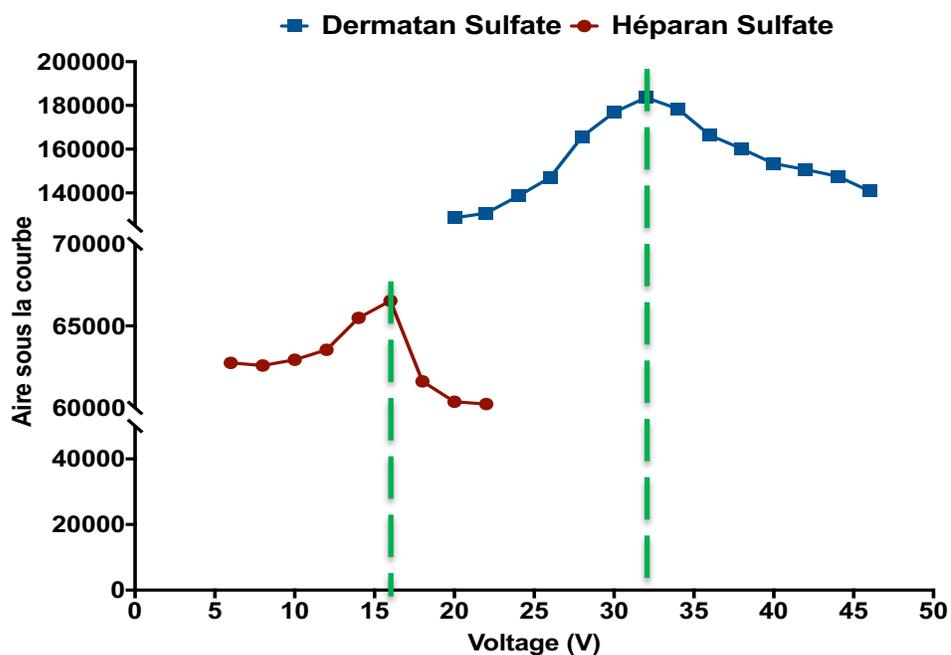


Figure 18. Optimisation des paramètres du voltage du cône pour l'HS et le DS. Les paramètres optimaux sont de 16 et 32 volts pour l'HS et le DS, respectivement.

1.12 La validation d'une méthode

La validation d'une méthode est une étape essentielle suite au développement d'une méthode analytique en spectrométrie de masse. Celle-ci sert à démontrer notamment que la méthode est robuste et fiable pour l'analyse de biomarqueurs en utilisant des spectromètres de masse de différentes compagnies, opérés par des professionnels expérimentés dans des laboratoires situés partout à travers le monde. La validation sert également à démontrer les limites de la méthode proposée. Il est donc essentiel qu'une validation soit faite avant d'utiliser ou de publier une méthodologie.

1.12.1 Les paramètres de validation

Dans le cadre de la validation d'une méthode analytique, les paramètres suivants sont évalués: la précision intra-jour et inter-jours, la linéarité, la limite de quantification, la limite de détection, la justesse, la robustesse, l'effet de matrice, l'adhésion au verre et au plastique ainsi que la stabilité (Tableau 8). Chacun de ces paramètres possède son propre barème à respecter. Pour tous ces paramètres, la méthode analytique développée dans le cadre de ce projet de recherche respecte le barème des normes de validation en vigueur (Araujo, 2009).

Tableau 8. Paramètres de validation de la méthode quantitative développée en spectrométrie de masse pour ce projet.

Paramètres	Critères
Précision intra-jour et inter-jours	Variation < 15%
Linéarité	$R^2 > 0,995$
Limite de détection	3 x signal / bruit
Limite de quantification	10 x signal / bruit
Justesse	Biais < 15%
Robustesse	Variation < 15% dans différentes matrices
Stabilité	Mêmes résultats lorsque l'échantillon est conservé à différentes températures (-80°C, -20°C, 4°C et TP pendant différentes durées (1 jour, 2 jours, 1 semaine, 4 semaines)
Adhésion au verre et au plastique	Variation < 15%

Premièrement, au niveau de la justesse et de la précision, les échantillons doivent avoir un coefficient de variation et un biais inférieur à 15%. Ainsi, à l'aide d'échantillons de contrôles de qualité, c'est-à-dire des échantillons fortifiés avec une concentration connue d'analyte, il est possible d'évaluer la justesse, et en comparant plusieurs répliqués d'échantillons préparés sur plusieurs jours, il est possible d'évaluer la précision de la méthode (précision intra-jour et inter-jours). Ainsi, pour évaluer ces paramètres, 3 échantillons de contrôles de qualité sont préparés en quintuplicata, puis analysés pour chacun des tissus et liquides biologiques et ce, à chaque jour, pour une durée de 5 jours.

Ensuite, au niveau de la linéarité, les différents points qui composent la courbe de calibration doivent varier à moins de 15% de la valeur attitrée. Également, la courbe doit avoir un coefficient de régression linéaire (r^2) supérieur à 0,995. Ces différents paramètres sont également évalués lors des analyses intra-jour et inter-jours.

Au niveau de la limite de quantification et de la limite de détection, qui correspondent à la plus faible quantité pouvant être quantifiée avec un niveau de précision et justesse adéquat et

la plus petite quantité pouvant être détectée sans nécessairement être quantifiable respectivement, sont évaluées à l'aide de formules mathématiques. La limite de détection et la limite de quantification correspondent à 3 et 10 fois l'écart-type d'un échantillon de faible concentration, respectivement injecté plusieurs fois. Il est à noter que dans le cadre de cette étude, les limites de quantification et de détection ont été établies pour chacun des différents tissus et liquides biologiques. Ces paramètres ont été évalués à l'aide d'échantillons de souris contrôles présentant de très faibles concentrations de HS et DS qui ont été injectés à répétition (10 injections du même échantillon).

Pour ce qui est de la robustesse, un même échantillon pour chacune des différentes matrices est analysé 10 fois. Il ne devrait pas y avoir de variation marquée (variation < 15%) entre les analyses provenant d'une même matrice.

Au niveau de l'adhésion au verre et au plastique, pour chaque matrice, un échantillon de contrôle de qualité est préparé en triplicata. Chaque échantillon est alors transféré 3 fois d'un tube de verre à l'autre et un aliquot de chacun est analysé. La réponse mesurée pour l'analyte ne devrait pas varier lors de ces transferts. La même procédure a permis de faire l'évaluation pour l'adhésion au plastique.

Finalement, au niveau de la stabilité, les échantillons doivent être conservés à plusieurs températures et ce, pour une durée allant de 24 heures à plus de 4 semaines. Pour toutes ces conditions, la concentration d'analyte mesuré ne devrait pas varier de plus de 15%.

ARTICLE 1

Quantitative Analysis of Heparan Sulfate and Dermatan Sulfate in MPS Type II Mouse Tissues Using UPLC-MS/MS

Auteurs de l'article: Iskren Menkovic, Pamela Lavoie, Michel Boutin, Christiane Auray-Blais

Statut de l'article: Soumis le 23 novembre 2018 dans le journal *Bioanalysis*.

Avant-propos:

Iskren Menkovic a fait le travail de laboratoire requis pour le développement et la validation de la méthode de quantification absolue de l'héparan sulfate et du dermatan sulfate décrite dans l'article ci-dessous sous les conseils et les recommandations de Pamela Lavoie, Michel Boutin et Christiane Auray-Blais. Il a également procédé à toutes les étapes nécessaires pour analyser les différents tissus et liquides biologiques de souris MPS II traitées, non traitées et contrôles. Il a fait l'interprétation de tous les résultats obtenus et il a réalisé les analyses statistiques ainsi que la préparation des résultats sous forme de figures et de tableaux. La rédaction de l'article a été faite par Iskren sous la supervision des co-auteurs.

Résumé:

La mucopolysaccharidose de type II (MPS II) est une maladie lysosomale liée à l'X qui survient suite à une mutation du gène *IDS* qui code pour l'iduronate-2-sulfatase, qui est la première enzyme impliquée dans le catabolisme de deux glycosaminoglycans soit l'héparan sulfate (HS) et le dermatan sulfate (DS). Ce défaut enzymatique engendre une accumulation de ces deux biomarqueurs au niveau du lysosome de nombreux tissus et liquides biologiques, ce qui ultimement entraînera de nombreuses manifestations cliniques telles que des atteintes respiratoires, des atteintes cardiaques, une dysostose multiple, une hépatosplénomégalie et, dans certains cas, des atteintes neurologiques. Actuellement, le seul traitement approuvé qui cible la MPS II spécifiquement est la thérapie enzymatique de remplacement (TER). Ce traitement consiste en une infusion hebdomadaire d'une enzyme analogue à l'iduronate-2-sulfatase qui aura pour effet de diminuer la concentration de HS et DS au niveau des lysosomes. Bien que ce traitement se soit avéré efficace pour de nombreux patients afin d'altérer la progression naturelle de la maladie, une étude préclinique sur la TER a révélé une distribution variée de l'enzyme au niveau de différents tissus. Ce profil de biodistribution entraîne un questionnement à savoir si la TER est réellement efficace pour réduire les biomarqueurs dans tous les tissus. À ce jour, aucune étude précise et fiable n'a été réalisée afin d'évaluer le profil de distribution de HS et DS au niveau des différents organes et liquides biologiques touchés par la MPS II et l'effet de la TER sur ces spécimens.

Ainsi, une méthode d'analyse en spectrométrie de masse (UPLC-MS/MS) permettant la quantification absolue de l'HS et du DS dans différents tissus et liquides biologiques a été développée et validée. L'étape de validation a révélé que la méthode de quantification atteint les critères fixés en termes de sensibilité, de justesse et de robustesse. L'analyse de spécimens chez les différentes cohortes de souris a révélé une distribution variable de l'HS et du DS dans les tissus et liquides biologiques étudiés. Dans l'ensemble des tissus et liquides biologiques, l'héparan sulfate s'est avéré être le biomarqueur présent en plus grande quantité. Les concentrations les plus élevées d'héparan sulfate ont été mesurées dans le foie, alors que les concentrations les plus importantes de dermatan sulfate ont été mesurées au niveau des poumons. L'analyse d'échantillons de souris MPS II traitées a révélé que la TER a permis de réduire de façon significative l'accumulation du HS et du DS dans tous les tissus et liquides

biologiques sauf au niveau du cerveau, où la TER n'a eu aucun impact. De plus, il a été observé que les effets de la TER sont variables d'un tissu à l'autre. Le foie s'est avéré être le tissu où la diminution de la concentration des biomarqueurs a été la plus importante alors que la diminution la moins importante par rapport aux souris non traitées a été observée au niveau du poumon. En conclusion, la méthodologie développée dans le cadre du présent projet serait adaptée pour évaluer l'efficacité de traitements futurs lors d'essais précliniques ainsi que pour le suivi des patients en vue d'une médecine personnalisée.

Quantitative Analysis of Heparan Sulfate and Dermatan Sulfate in MPS Type II Mouse Tissues Using UPLC-MS/MS

Iskren Menkovic^a, Pamela Lavoie^a, Michel Boutin^a, Christiane Auray-Blais^{a*}

^a *Division of Medical Genetics, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, 3001, 12th Avenue North, Sherbrooke, QC, Canada J1H 5N4*

****Corresponding author:***

Christiane Auray-Blais, Division of Medical Genetics, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, 3001, 12th Avenue North, Sherbrooke, QC, Canada J1H 5N4.

Tel.: +1 819 346 1110, ext. 14706; Fax: +1 819 564 5217.

E-mail: christiane.auray-blais@usherbrooke.ca

Abstract

Background: Mucopolysaccharidosis type II (MPS II) is a lysosomal storage disorder caused by deficiency of the iduronate-2-sulfatase enzyme leading to the accumulation of heparan sulfate (HS) and dermatan sulfate (DS) in organs and biological fluids. Enzyme replacement therapy is available for affected patients.

Results/Methodology: A 6-minute UPLC-MS/MS method was developed/validated for HS and DS quantification in mouse tissues and biological fluids with high accuracy and precision. In MPS II mice, HS was more abundant than DS. Eight-week ERT significantly reduced HS and DS levels in all matrices, except the brain. These reduced levels were maintained over a 16-week extended treatment period.

Conclusion: The devised method is sensitive, robust and useful for the evaluation of biomarker distribution in MPS II mice.

Defined key terms:

Hunter syndrome: Hunter syndrome (MPS II, OMIM 309900) is caused by mutations in the iduronate-2-sulfatase gene (*IDS*, OMIM 612222) on chromosome Xq28, leading to the impaired catabolism of heparan sulfate and dermatan sulfate.

Glycosaminoglycans: Glycosaminoglycan (GAGs) are long sugar chains with different sulfation patterns. GAGs are involved in several cell processes, such as cell growth and proliferation, and angiogenesis.

Keywords

Mucopolysaccharidosis type II (MPS II), Heparan sulfate, Dermatan sulfate, UPLC-MS/MS, Enzyme replacement therapy, Hunter syndrome.

Introduction

Mucopolysaccharidoses are a group of lysosomal storage disorders. There are 11 known lysosomal enzymatic deficiencies that can lead to 7 different types of mucopolysaccharidoses (MPSs) which are characterized by impairments in the catabolism of large polysaccharide chains called glycosaminoglycans (GAGs) [1-4]. Depending on the deficient enzyme, an accumulation of one or more GAGs, such as heparan sulfate (HS), dermatan sulfate (DS), chondroitin sulfate (CS), keratan sulfate (KS) and hyaluronan may be observed in the lysosomes. The substrate storage eventually leads to the typical clinical features observed in MPS patients [4-5].

Mucopolysaccharidosis type II (MPS II, or Hunter syndrome, OMIM no. 309900), is the only X-linked MPS. Various mutations in the *IDS* gene (Xq28) which encodes the iduronate-2-sulfatase enzyme (EC 3.1.6.13), the first lysosomal enzyme involved in the catabolic pathway of HS and DS [6-7] leads either to a non-neuronopathic form of the disease with somatic symptoms without primary brain involvement, or to a neuronopathic severe form of the disease characterized by prominent neurodegeneration. This latter form of the disease accounts for approximately two-thirds of the cases, with an earlier onset of somatic symptoms, as well as progressive brain impairments [8-9]. Somatic symptoms usually include coarse facial features, respiratory infections, cardiomyopathy, hepatosplenomegaly, joint stiffness, umbilical and inguinal hernias, and skeletal deformities, while neurological impairments may include hydrocephalus, in addition to progressive mental retardation [10]. The estimated incidence ranges from 1:100 000 to 1:170 000 [11-12].

Enzyme replacement therapy (ERT) (Elaprase[®], Shire, Lexington, MA, USA) has been approved for MPS II by the Food and Drug Administration (FDA) in 2006 [13]. Even though ERT does not cure the affected patients, it alters the natural progression of the disease. Studies describe a very rapid decrease in urinary GAGs and a steady but significant decrease of organomegaly over years of treatment [14-17]. It is, however, important to emphasize that the intravenous administration of ERT does not cross the blood-brain barrier and thus has limited to no impact on neurological symptoms [18-19]. Alternative procedures such as intrathecal administration of ERT are currently under investigation in hopes of improving or stabilizing symptoms associated with neurological impairments [20-21].

A study by Garcia *et al.* of a knock-out mouse model of MPS II revealed a heterogeneous tissue distribution of enzyme 2 hours and 24 hours post-infusion [22]. The study indicated that over 33% of the administered ERT dose is present in the liver 2 hours post-infusion while other tissues such as the kidneys, the heart, the lungs and the brain had less than 1% of the administered dose following the same 2-hour period. After 24-hour post-infusion, the latter tissues had each less than 0,1% of the initial dose administered, while close to 10% of the administered dose was still present in the liver. Nevertheless, even if the enzyme was present in lower concentrations, a variable reduction of GAG concentrations was observed in each tissue. Interestingly, the study also showed variability in the distribution of GAGs in different tissues studied. Unfortunately, the quantification of GAGs performed in this study involved the spectrophotometric dimethylmethylene blue (DMB) assay [23] which measures total GAG concentrations and does not distinguish individual levels of HS and DS. Over time, several studies have demonstrated the numerous pitfalls encountered with DMB quantification, such as blood and hemoglobin interferences or the formation of aggregates which could impact the physicochemical properties of GAGs [2, 23-24]. Furthermore, a comparison of a UPLC-MS/MS method with the DMB assay demonstrated that the latter led to 30% false-negative results, while the MS/MS method was successful in measuring an increased GAGs level in all cases, confirming the DMB assay's unreliability [2].

Other quantification methods, such as ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), allow an absolute quantification of each individual GAG [2, 25-31]. In some of these methods, a methanolysis reaction was performed to obtain smaller disaccharides which can be readily quantified by tandem mass spectrometry as previously shown [2,26].

A recent study on another lysosomal storage disorder showed that the relative distribution of glycosphingolipid isoforms and analogs of globotriaosylceramide (Gb₃) in Fabry disease mouse tissues was quite heterogeneous [32]. We anticipated that a similar phenomenon might be occurring with MPS II mouse tissues.

To our knowledge, there are no studies allowing the individual and absolute quantification of HS and DS in tissues of affected MPS II mice compared to ERT-treated, and control mice. The main objective of this research project was to evaluate the distribution of HS and DS in mouse tissues and biological fluids from 3 cohorts: MPS II ERT-treated, MPS II untreated and control mice. Secondary aims targeted: 1) the optimization of a GAG extraction procedure from each tissue and biological fluids; 2) the development, optimization and validation of a UPLC-MS/MS method for absolute quantification of HS and DS levels in all matrices; 3) the evaluation of an 8-week and 16-week ERT on GAG concentrations in different tissues and biological fluids.

Materials and methods

2.1 Ethics approval

This research project was approved by the Research Ethics Board at Jackson Laboratories who was involved in the animal breeding, housing, euthanasia and various sample collection.

2.2 Tissue samples and biological fluids

The idursulfase enzyme (Elaprase[®]) product for ERT was provided by Shire (Lexington, MA, USA) and sent to Jackson Laboratories for mouse treatment. Jackson Labs treated all mice with the ERT product provided by Shire and they harvested tissues and biological fluids. Processing of samples, extraction, methanolysis, as well as UPLC-MS/MS analysis and data interpretation were performed in our laboratory. The knock-out MPS II mice used for this study were previously described [34]. Briefly, exon 4 and part of exon 5 of the I2S locus were deleted via homologous recombination with a replacement vector containing neomycin-resistance gene, resulting in an IdS-KO mouse, which was bred to a C57BL/6 strain background.

Tissues, plasma and urine from 40 male mice were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) and separated into 5 groups according to their treatment status and duration: for the 8-week study, MPS II ERT-treated mice (n = 8), MPS II untreated mice (n = 8), control mice (n = 8); and for the 16-week extended study, MPS II ERT-treated mice (n = 7) and control mice (n = 8). Starting at 10 weeks of age, MPS II mice received an IV

injection of idursulfase (0.5 mg/kg/week). Ten-week-old control mice remained uninjected. Urine was collected daily for 5 days prior to the first injections, and for 5 days following each ERT. Considering the low volume of urine obtained per mouse, urine samples were pooled prior to analysis. Blood was collected and plasma separated one day before the first injection, and once per week for the duration of the study. Five days following the final ERT, mice were fasted overnight, then euthanized with CO₂. The following tissues were collected and frozen immediately: brain, liver, kidneys, heart, lungs, small intestine, and spleen.

2.3 Reagents

High-performance liquid chromatography (HPLC) grade methanol (MeOH) and LC-MS grade acetonitrile (ACN) were bought from EMD Chemicals Inc. (Darmstadt, Germany) while Optima® liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) grade water (H₂O) was purchased from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA). Dermatan sulfate (from porcine intestinal mucosa), chondroitin sulfate A (from bovine cartilage), and heparan sulfate (from bovine kidney) calibration standards were obtained from Sigma Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). Methanolic hydrochloric acid (HCl) 3 N was purchased from Oakwood Chemicals (Estill, SC, USA), methanol-D₄ 99.8% purity, and ammonium acetate 98% purity were purchased from Sigma Aldrich. Acetyl chloride was purchased from Fluka (Milwaukee, WI, USA). One mL disposable plastic syringes and Basix 13 mm, 0.2 µm pore size syringe filters were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

2.4 Preparation of standard solutions

2.4.1 Preparation of stock solutions

DS and HS standards were used and diluted in H₂O to make individual stock solutions at 10 mg/mL and 1 mg/mL. Standards were kept at 4°C and were stable for at least one year.

2.4.2 Standard curves and quality control working solutions

Eight standard solutions of DS and HS with concentrations at 0, 3.2, 8.0, 40, 80, 200, 400, and 800 µg/mL were prepared. Also, low, medium and high quality control (QC) solutions

at 60, 300 and 600 $\mu\text{g/mL}$, respectively, were prepared from stock solutions by dilution with H_2O . Both QC and standard solutions were kept at 4°C and stable were for at least 6 months.

2.4.3 Internal standard stock solutions

Deuterated internal standards (IS) of HS and DS were prepared in-house by deuteriomethanolysis of HS and DS commercial standards as previously described [29]. Briefly, a 2 M $\text{MeOH-D}_4\text{-DCI}$ solution was prepared by adding 80 μL of acetyl chloride dropwise to 500 μL of MeOH-D_4 on ice while stirring. 580 μL of this 2 M $\text{MeOH-D}_4\text{-DCI}$ solution was then added to 600 μg of HS or DS (60 μL of the stock solution at 10 mg/mL previously dried under a nitrogen flow). The sample was then vortexed for 30 seconds and incubated for 75 minutes at 65°C . Following the incubation, the sample was dried under a nitrogen flow and resuspended in 1 mL of H_2O .

2.4.4 Resuspension solution

The resuspension solution was prepared by mixing 9 mL of acetonitrile (ACN), 800 μL of H_2O , 150 μL of a 600 $\mu\text{g/mL}$ DS deuterated IS solution (prepared as described in 2.4.3) and 50 μL of a 600 $\mu\text{g/mL}$ HS deuterated IS solution (as described in 2.4.3).

2.5 Instrumentation and parameters

2.5.1 MS/MS parameters

The quantification of DS and HS disaccharides and their related IS was performed simultaneously (multiplex method) using a Xevo TQ-S Micro (Waters Corp., Milford, MA, USA) tandem mass spectrometer (MS/MS) combined to an Acquity I-Class (Waters) UPLC system. Analyses were done in positive electrospray ionization (ESI). Signals were acquired during a multiple reaction monitoring (MRM) experiment (Supplementary Table 1 and 2).

Supplementary Table 1

MS/MS parameters used for the quantification of DS, HS and their respective deuterated internal standards.

Parameters	Description
Ionization mode	ESI
Polarity	Positive
Acquisition mode	MRM
Capillary voltage	3.44 kV
Desolvation temperature	500 °C
Desolvation gas flow	700 L/h
Cone gas flow	150 L/h
Source temperature	120 °C
Span	0 Da

Supplementary Table 2

MS/MS transitions used for the quantification of DS, HS and their respective deuterated internal standards (IS).

Compounds	Transitions (<i>m/z</i>)	Dwell time (s)	Cone Voltage (V)	Collision energy (V)
DS	426.2 > 236.2	0.131	36	12
DS-D ₆ IS	432.2 > 239.2	0.131	36	12
HS	384.2 > 162.2	0.131	18	18
HS-D ₆ IS	390.2 > 162.2	0.131	18	18

2.5.2 UPLC parameters

The chromatographic separation of the different compounds was done using a CORTECS HILIC (Waters) UPLC column (2.1 x 50 mm, 1.7 µm particle size). The method runtime was 6 minutes with a gradient ranging between 0% and 70% of mobile phase B. Chromatographic parameters are shown in Table 1.

Table 1

UPLC Acquity I-Class chromatographic parameters.

Parameters	Description
Column	CORTECS HILIC
ID x Length	2.1 x 50 mm
Particle size	1.7 μm
Temperature	30°C
Weak Wash solvent	95:5 ACN:H ₂ O + 0.2% FA
Strong Wash solvent	50:50 MeOH:H ₂ O
Injection volume	4 μL
Injector	Flow through needle
Autosampler temperature	10°C
Mobile phase A	95:5 ACN:H ₂ O + 0.2% FA + 10 mM CH ₃ COONH ₄
Mobile phase B	10:90 ACN:H ₂ O + 0.2% FA + 10 mM CH ₃ COONH ₄
Flow rate	0.45 mL/min
Gradient (% mobile phase B)	0.00 → 1.00 min: 0% 1.00 → 3.00 min: 0-40% (Linear gradient) 3.00 → 4.50 min: 70% 4.50 → 6.00 min: 0%

2.5.3 Quantification parameters

Quantification of both biomarkers was done using an 8-point calibration curve. For tissues, the following calibration curve concentration were used: 0, 0.051, 0.128, 0.640, 1.28, 3.20, 6.40 and 12.80 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of tissues. For biological fluid samples the calibration curve points were: 0, 3.2, 8.0, 40, 80, 200, 400, and 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Calibration curves used for HS and DS quantification were prepared in H₂O. More accurate quantification results were obtained using a linear curve forced to the origin for HS and DS. Data were acquired over a 4-minute timeframe followed by a 2-minute solvent delay. Quantification was performed using the response factor. Data processing was achieved using TargetLynx[®] Application Manager, an option with MassLynx[™] (version 4.1 SCN810) Software (Waters). Creatinine was used to normalize mouse urine samples for comparison purposes. The analysis of creatinine was performed according to a previous study [33].

2.6 Sample preparation

2.6.1 Tissue homogenization

Approximately one hundred milligrams of mouse tissue was cut using a razor blade, precisely weighed, and deposited into a 2 mL tube (Omni International, Kennesaw, GA, USA) with five ceramic beads (1.4 mm diameter, Omni International). Four hundred microliters (400 μ L) of MeOH were added and tissues were homogenized for 60 seconds using an Omni Bead Ruptor 12 (Omni International) at high intensity (5 m/s). MeOH was then added to the homogenate in order to obtain a concentration of 100 mg of tissue/mL. A second homogenization was performed for 60 seconds at low intensity (3 m/s). Finally, the homogenate was once again diluted using MeOH to obtain a final working homogenate solution of 25 mg/mL. Homogenates were stored at -20°C until use.

2.6.2 Sample processing

Fifty microliters of tissue homogenate, or 20 μ L of urine or plasma, or 20 μ L of the standard curve solutions, or 20 μ L of QC standards were processed similarly by their addition to disposable borosilicate glass culture tubes fitted with screw caps (16 \times 100 mm) followed by complete drying under a stream of nitrogen. Once completely dried, 500 μ L of a commercial MeOH-HCl 3 N solution was added. Samples were incubated at 65°C for 55 minutes [25] (Supplementary Figure 1). Following the incubation, samples were once again dried under a stream of nitrogen and resuspended using 200 μ L of the resuspension solution as previously described (section 2.4.4). Samples were vortexed and filtered using 1 mL disposable syringes and Basix syringe filters before transferring to UPLC vials.

2.7 Matrix effects

Matrix effects were evaluated in all tissues by spiking QC solutions (60, 300, and 600 μ g/mL) in tissues and biological fluids and verifying the accuracy (bias %). Endogenous levels of HS and DS were taken into account. Furthermore, in order to identify possible interference from CS, the analysis of a CS standard at different concentrations (60, 300, and 600 μ g/mL) was performed by MS/MS.

2.8 Method validation

Linearity was evaluated using an 8-point calibration curve. Intraday (5 replicates in a day) and interday (5 different days) accuracy (% bias) and precision (% relative standard deviation, RSD) were assessed using QC solutions at three levels of concentration: low (60 µg/mL), medium (300 µg/mL), and high (600 µg/mL) for HS and DS in all 9 matrices studied. Accuracy was measured by spiking HS and DS with the aforementioned concentrations in control mouse tissues and baseline levels were subtracted from the measured concentrations. All interday analyses for HS and DS included an 8-point standard curve, low, medium and high concentration quality controls prepared in triplicate (9 samples), control tissues (3 samples) and MPS II tissues (3 samples) while intraday samples were prepared in quintuplicate. Glass and plastic adsorption were assessed using MPS tissue samples transferred twice in a glass or plastic vial following the filtration step. For each matrix under study, control samples with low levels of HS and DS were used to establish the limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD) for both biomarkers (10 x, and 3x the standard deviation of a control sample injected 10 times, respectively). The freeze/thaw stability of biomarkers in tissue homogenates was assessed by comparing the measured concentration in MPS tissue samples before and after 3 freeze/thaw cycles. Finally, the stability of HS and DS homogenates was evaluated for 48 hours, one week and one month at -20°C, 4°C, and at room temperature.

2.9 Statistical analysis.

Statistical analyses were performed using IBM SPSS version 23. Considering the number of mice per group ($n = 7$ or $n = 8$) and the non-normal distribution of HS and DS within a group, the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U tests were performed to establish if the differences observed were statistically significant. The statistical significance was established at a p -value < 0.05 for all comparisons. Calculated p -values were corrected for multiple comparisons using Holm-Bonferroni procedure.

Results and Discussion

3.1 Method validation

The use of the CORTECS HILIC UPLC column allowed a good separation of the analytes under study based on hydrophilic interactions. Ion chromatograms of HS and DS and their respective deuterated IS are shown in Figure 1.

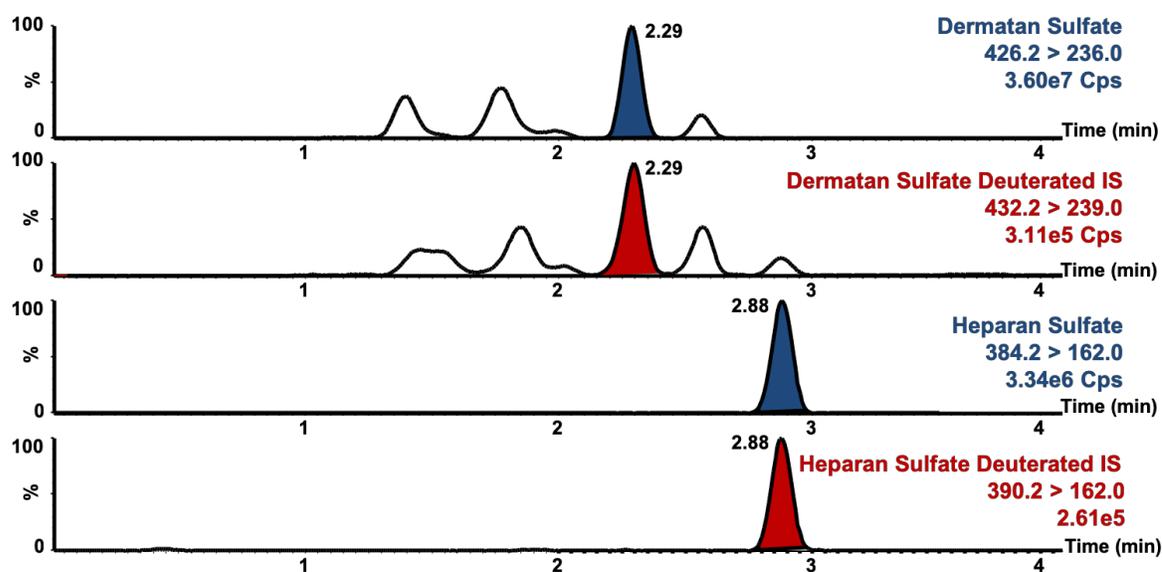
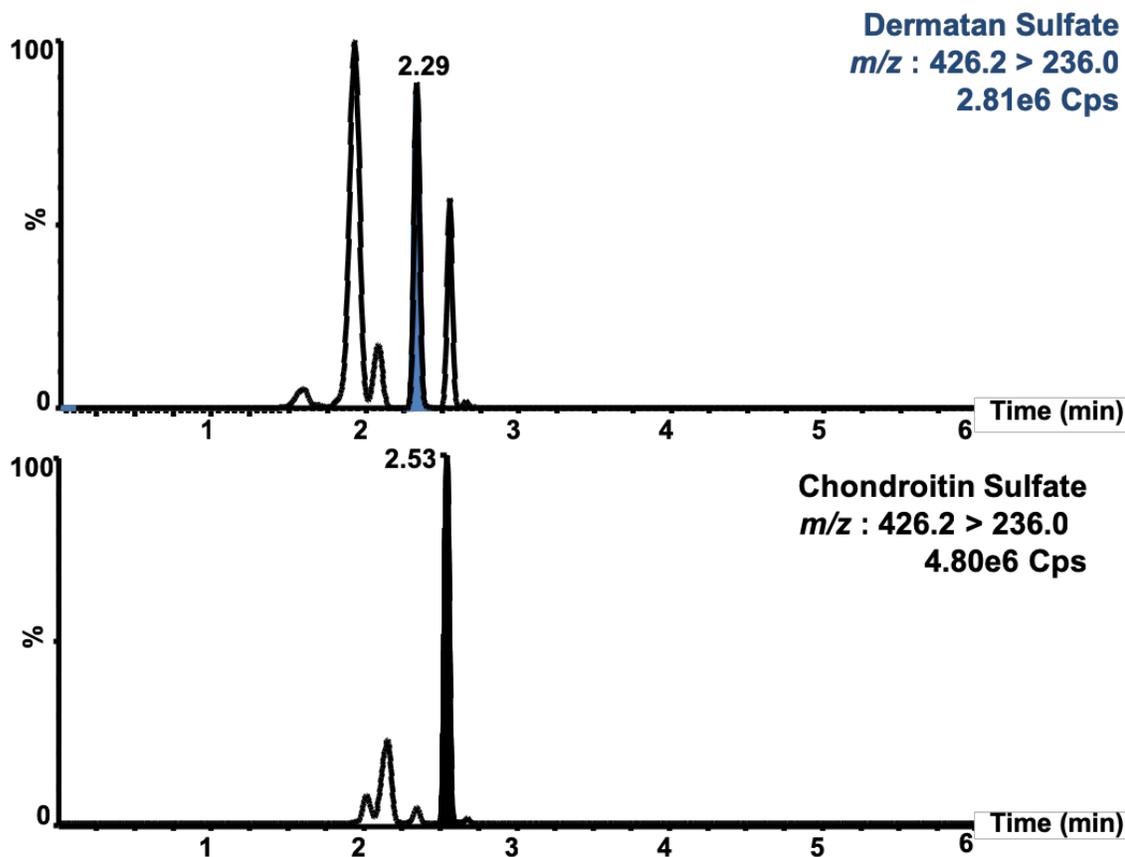


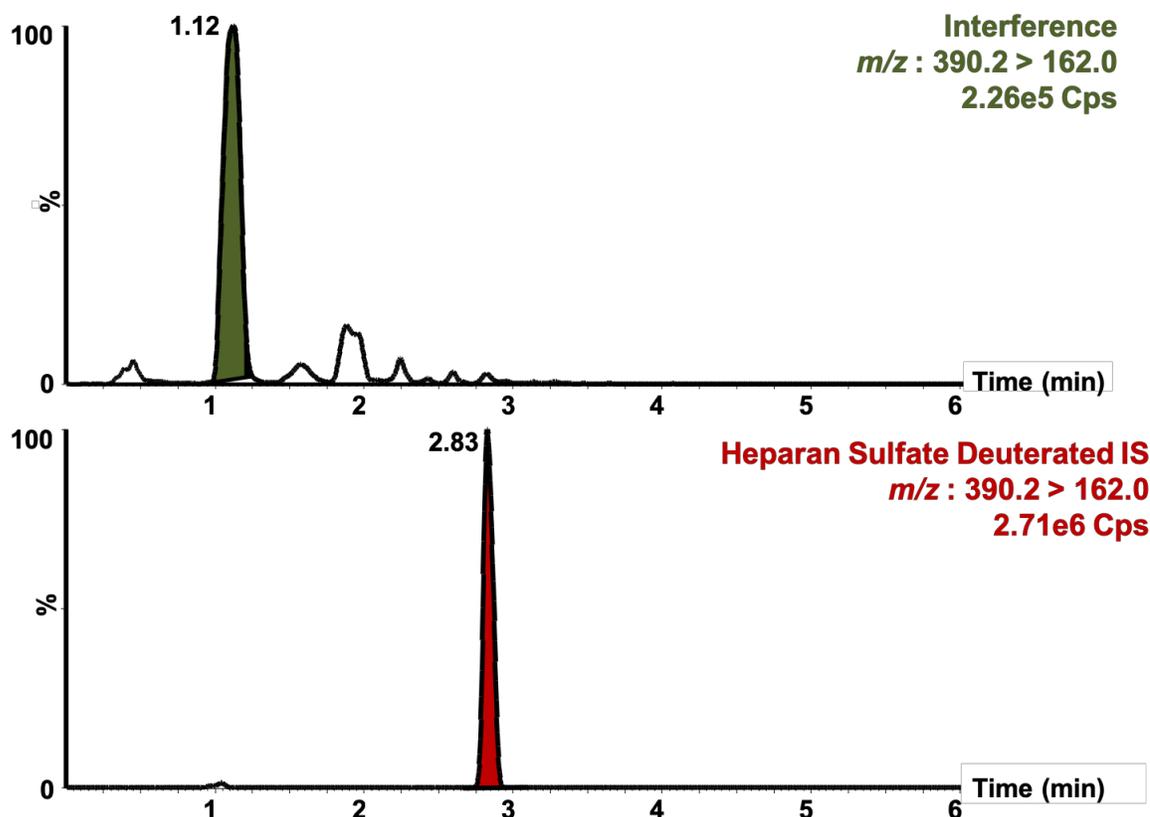
Fig. 1. Chromatographic separation of HS and DS standards (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and their deuterated counterparts (Deuterated HS at 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$; deuterated DS at 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Data acquisition was done from 0-4 min followed by a 2-min solvent delay. IS: Internal Standard; Cps: Counts per second.

The most abundant disaccharide ions for HS and DS were chosen for quantification. In order to confirm a possible interference from CS, the UPLC-MS/MS analysis of a CS standard at different concentrations (60, 300 and 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$) confirmed that the peak observed at 2.47 minutes was indeed CS (Supplementary Figure 2).



Supplementary Fig. 2. Chromatographic separation of DS and CS standards (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) over a 6-min method. Data acquisition was performed during the entire method. Cps: Counts per second.

Unlike other HILIC UPLC columns evaluated during the method development, the CORTECS column chosen for the chromatographic separations also allowed separation of interferences encountered for deuterated HS leading to higher precision and accuracy for the quantification (Supplementary Figure 3).



Supplementary Fig. 3. Chromatographic separation of deuterated HS (3 $\mu\text{g/mL}$) and an unknown interference found in samples. Data acquisition was done over the entire 6-min method. IS: Internal standard Cps: Counts per second.

The method validation was comprised of an intraday assay of 5 replicates in a day and 5 interday assays performed for each tissue ($n=7$), plasma and urine. The biases percentage (Bias %) and the relative standard deviation (RSD %) were less than 12 % for all 9 matrices for both intraday and interday assays (Supplementary Table 3). Standard curves had an average r^2 of 0.9989 ($n = 9$) for both HS and DS. Our data also showed that glass or plastic adsorption was not a factor influencing the methodology for both biomarkers (Bias < 5 %). Stability studies showed that once the sample is processed, HS and DS levels were stable at -20°C , 4°C and at room temperature (22°C) for 48 hours. Three freeze/thaw cycles had no impact on HS and DS quantification.

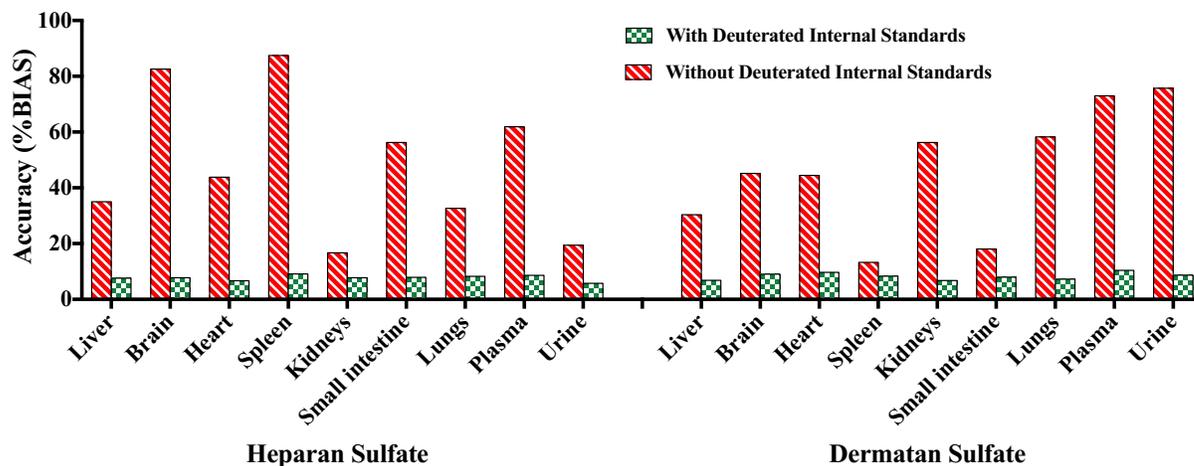
Supplementary Table 3

Validation parameters for HS and DS in mouse tissues, plasma and urine samples.

Heparan sulfate	LOD ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Precision (RSD%)		Accuracy (Bias%)	
			Intraday	Interday	Intraday	Interday
Liver	0.0041	0.0136	4.21	11.22	6.98	7.64
Brain	0.0092	0.0307	6.30	5.72	7.31	7.77
Heart	0.0090	0.0300	7.94	8.39	5.37	6.71
Spleen	0.0031	0.0104	3.75	8.13	5.14	9.13
Kidneys	0.0540	0.1799	3.21	7.74	4.87	7.78
Small intestine	0.0132	0.0439	6.25	8.27	9.45	7.93
Lungs	0.0083	0.0278	10.04	8.85	8.26	8.23
Plasma	0.5687*	1.8957*	3.22	6.81	11.96	8.61
Urine	0.0728*	0.2416*	1.73	6.59	3.54	5.79
Dermatan sulfate	LOD ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Precision (RSD%)		Accuracy (Bias%)	
			Intraday	Interday	Intraday	Interday
Liver	0.0100	0.0334	4.16	7.18	8.51	6.82
Brain	0.0093	0.0309	8.09	9.83	10.07	9.07
Heart	0.0543	0.1811	7.95	10.41	9.59	9.71
Spleen	0.0019	0.0064	7.41	8.37	7.10	8.33
Kidneys	0.0028	0.0093	2.83	7.76	2.69	6.78
Small intestine	0.0108	0.0360	5.55	10.05	5.72	7.97
Lungs	0.0209	0.0698	7.52	9.26	5.77	7.29
Plasma	0.3888*	1.8957*	2.23	11.82	7.25	10.44
Urine	0.1027*	0.3423*	3.60	11.20	9.26	8.70

*($\mu\text{g}/\text{mL}$)

As anticipated, matrix effects were different in each of the tissues or biological fluids studied. However, our results showed that deuterated IS for HS and DS played a major role in reducing matrix effects in order to achieve high accuracy with bias < 12% for all matrices (Supplementary Figure 4).



Supplementary Fig. 4. Method accuracy for HS and DS in different tissues and biological fluids. Matrix effects were assessed quantifying HS and DS with and without their deuterated counterparts in each matrix under investigation.

3.2 The quantification of heparan sulfate and dermatan sulfate in MPS II treated, untreated and control mice tissues

The concentrations of HS and DS in control, MPS II treated (8 weeks of treatment and 16 weeks of treatment) and untreated mouse tissues are shown in Figure 2.

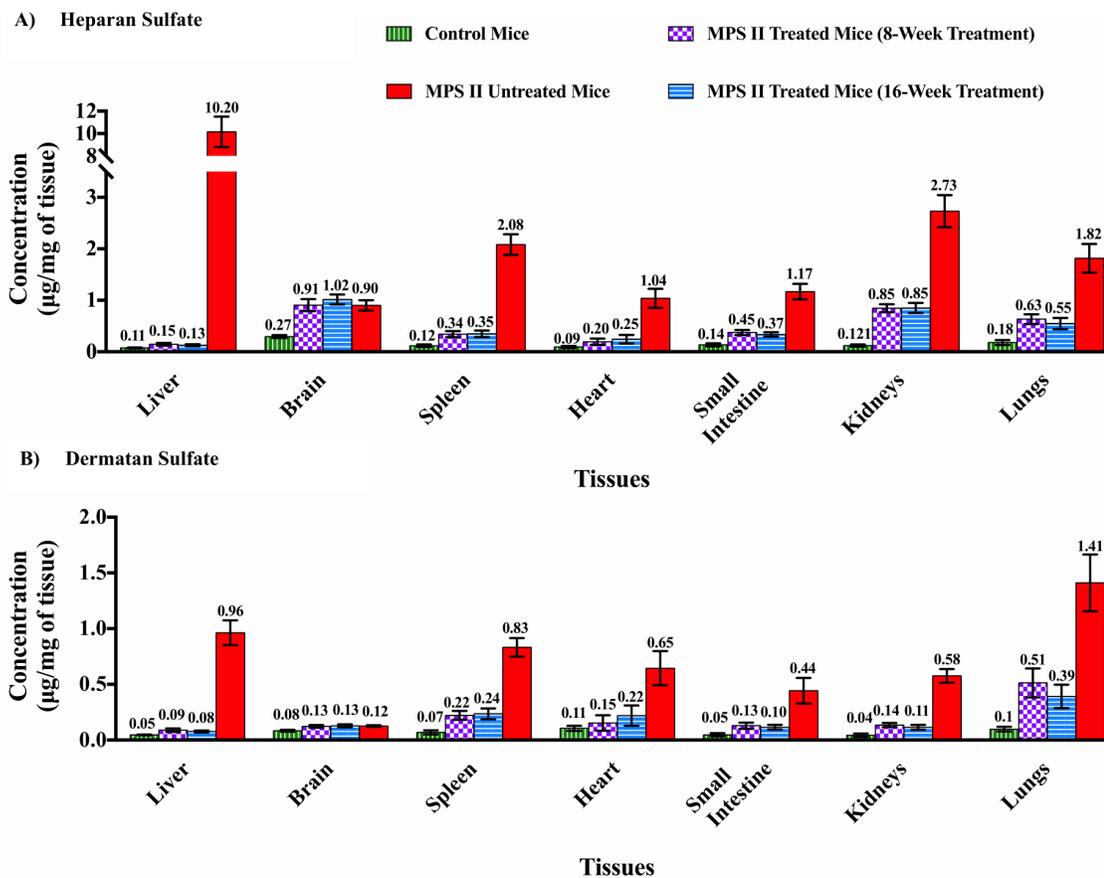


Fig. 2. Tissue concentrations of: A) heparan sulfate; and B) dermatan sulfate in MPS II 8-week treated ($n = 8$), MPS II 16-week treated ($n = 7$), untreated ($n = 8$) and control mice ($n = 8$) in the liver, the brain, the spleen, the heart, the small intestine, the kidneys and the lungs. Concentrations are expressed in micrograms (μg) of per milligram (mg) of tissues.

As anticipated and confirmed by the Kruskal-Wallis test, the analysis of the different groups of mouse tissues revealed significant differences ($p < 0.05$) in DS and HS concentrations. When compared to control mice ($n = 8$), the MPS II untreated mice ($n = 8$) showed various increased levels according to tissues: for HS, a 96.7-fold increase was measured in the liver, 22.6 fold in the kidneys, 17.7 fold in the spleen, 11.2 fold in the heart, 10.2 fold in the lungs, 8.6 fold in the small intestine, and 3.4 fold in the brain; for DS, 18.5-fold increase was detected in the liver, 14.4 fold in the lungs, 13.4 fold in the kidneys, 12.1 fold in the spleen, 6.1 fold in the heart, 2.7 fold in the small intestine, and 1.6 fold in the brain. In control mice, HS levels were higher than DS levels in all tissues, except for the heart tissues. Similarly, HS was more abundant than DS in all MPS II untreated mouse tissues, including the heart. Liver

tissues showed the highest concentrations of HS while lung tissues had the highest concentrations of DS. Interestingly, in control mice, the highest concentrations of HS were measured in the brain while in MPS II untreated mice, the brain had the smallest concentrations of HS amongst all tissues. This led us to believe that even a small increase in HS levels in the brain may lead to severe neurological impairments usually observed in MPS II patients with the neuronopathic form of the disease. As shown in Table 2, the HS/DS tissue ratios observed in control mice were mostly different from the HS/DS tissue ratios observed in untreated MPS II mice.

Table 2

Heparan sulfate/dermatan sulfate ratios in different mice cohorts according to each tissue.

Tissue	Heparan sulfate/dermatan sulfate ratios			
	Control Mice	MPS II Treated Mice (8-Weeks treatment)	MPS II Treated Mice (16-Weeks treatment)	MPS II Untreated Mice
Liver	2.0	1.6	1.6	10.5
Brain	3.4	7.2	7.9	7.3
Heart	0.9	1.3	1.1	1.6
Spleen	1.7	1.5	1.5	2.5
Small Intestine	2.9	2.9	3.3	2.6
Kidney	2.8	6.3	7.5	4.7
Lungs	1.8	1.2	1.4	1.3

The 8-week treated mice showed a significant decrease ($p < 0.05$) compared to untreated mice in both HS and DS in all tissues, except for the brain. As described in the literature [18-19] the ERT does not cross the blood-brain barrier, and therefore has no effect on GAGs in the brain. However, for other tissues, the accumulated HS and DS concentrations observed in MPS II untreated mice were significantly decreased (all $p < 0.05$) in MPS II ERT-treated mice (8-week treatment) in all tissues (Table 3).

Table 3

Treatment efficiency* (expressed in percentages) of heparan sulfate (HS) and dermatan sulfate (DS) levels observed in treated MPS II mouse tissues following an 8-week ERT.

ERT efficiency (%)	Liver	Heart	Spleen	Small Intestine	Kidneys	Brain	Lungs
Heparan sulfate	99.6	89.1	88.6	76.3	72.2	0	72.2
Dermatan sulfate	95.9	90.9	80.0	79.3	74.5	0	68.4

* Treatment efficiency: $\frac{[\text{biomarker}] \text{ in untreated mice} - [\text{biomarker}] \text{ in treated mice}}{[\text{biomarker}] \text{ in untreated} - [\text{biomarker}] \text{ in control mice}} \times 100$

The study by Garcia *et al.*, previously mentioned, which evaluated the effects of ERT on different mouse tissues, revealed a heterogeneous biodistribution of idursulfase following intravenous administration of the treatment. Their results showed that the liver had the highest level of enzyme present 2 hours post-infusion, followed by the spleen, the kidneys, the lungs, the heart and finally the brain [22]. The authors found that the heart accumulated the second smallest percentage of the administered dose following ERT infusion; it was also the second most responsive tissue to ERT showing a decrease of HS at 89.1% and DS at 90.9% in MPS II mice

In our study, residual DS levels measured in the heart of MPS II ERT-treated mice were found not to be significantly different ($p > 0.05$) from control mice DS levels by the Mann-Whitney U test. By contrast, while ERT significantly decreased GAG concentrations in most tissues, the residual HS and DS levels measured following an 8-week ERT were still significantly higher in MPS II ERT-treated mice compared to control mice. According to the results reported by Garcia *et al.* and apart from the heart, which had the second smallest percentage of the administered dose following ERT, there seems to be a correlation between idursulfase biodistribution following intravenous infusion observed by these authors and the HS and DS reduction levels in MPS II ERT-treated mice observed in our study.

Our results also show that for the 16-week ERT-treated MPS II mice ($n = 7$), HS and DS levels were further reduced in some tissues, such as the lungs, small intestine and liver, compared to the 8-week treatment levels, whereas only DS was further decreased in the kidneys. For other tissues, HS and DS levels remained stable following the 8-week treatment. Regarding the heart and the spleen, HS and DS levels were slightly increased after 16 weeks of treatment, while only HS levels were increased in the small intestine and the kidneys when compared to the 8-week ERT-treated mouse tissues. These latter results might lead us to

believe that there is a constant increase in HS and DS levels in tissues over the MPS II mouse lifespan. ERT was effective at decreasing HS and DS levels in most tissues following a relatively short period of time (8 weeks) and then maintaining those levels stable overtime for 16 weeks. However, HS and DS levels were still between 1.47 (observed in the liver) and 7-folds higher (measured in the lungs) according to various tissues following 8 and 16 weeks of ERT compared to HS and DS levels in control mice. The tissue distributions (%) of HS and DS in different mouse groups are shown in Figure 3.

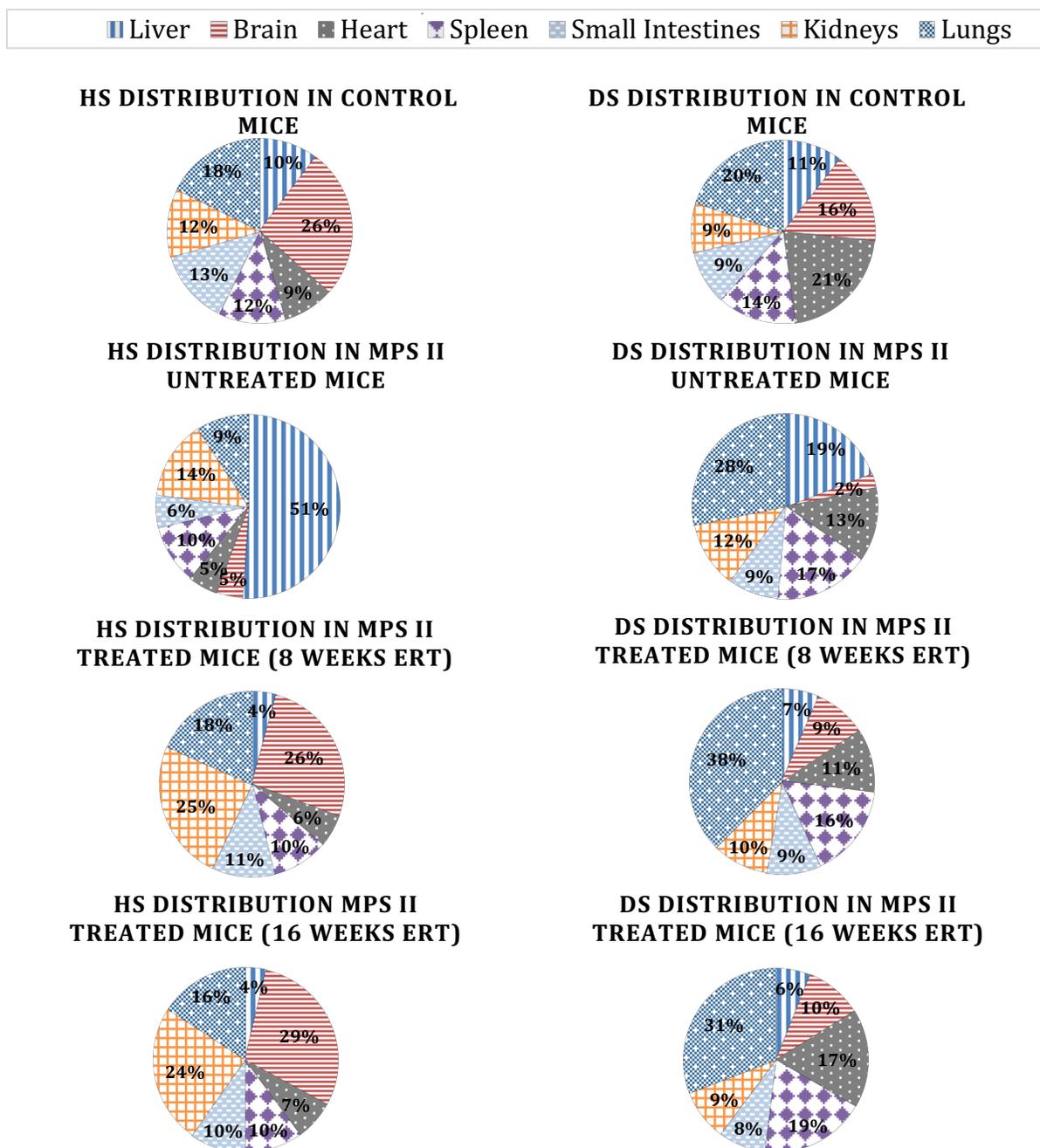


Fig. 3. Tissue distributions (%) of heparan sulfate and dermatan sulfate in control mice ($n = 8$), MPS II ERT-treated mice for 8 weeks ($n = 8$) and 16 weeks ($n = 7$), and MPS II untreated mice ($n = 8$).

Regarding total HS and DS distributions (total quantity of HS and DS, respectively, found in all organs studied), differences were observed among the different mice groups. Only 11.9% of total HS was present in the kidneys in control mice, but over 24% of total HS was located in the kidneys in MPS II ERT-treated mice. Conversely, less than 4.5% of total HS was present in the liver of MPS II ERT-treated mice while 10.3% was measured in the control mice. This latter difference might be explained by the fact that ERT is more effective in liver tissues than in any other tissues. Our results also show that less than a 3.5% difference in total HS distribution was observed for MPS II ERT-treated and control mice in the brain, the heart, the spleen, the small intestine and in the lungs. Due to the large concentration of HS in the liver (51%) in the MPS II untreated mice, the total distribution of HS in MPS II untreated mice shows a marked variation compared to the distribution observed in controls and MPS II ERT-treated mice. For DS, the percentages in the kidney and in the small intestine remain relatively stable for all 4 mouse groups. However, for other tissues such as the liver, the brain, the heart, the spleen and the lungs, the total DS distribution varies more than the total distribution of HS in the different groups studied.

3.3 Longitudinal variation of heparan sulfate and dermatan sulfate in plasma in MPS II treated, untreated and control mice

The longitudinal variation of HS and DS in plasma in control, MPS II treated for 16 weeks and untreated mice is shown in Figure 4.

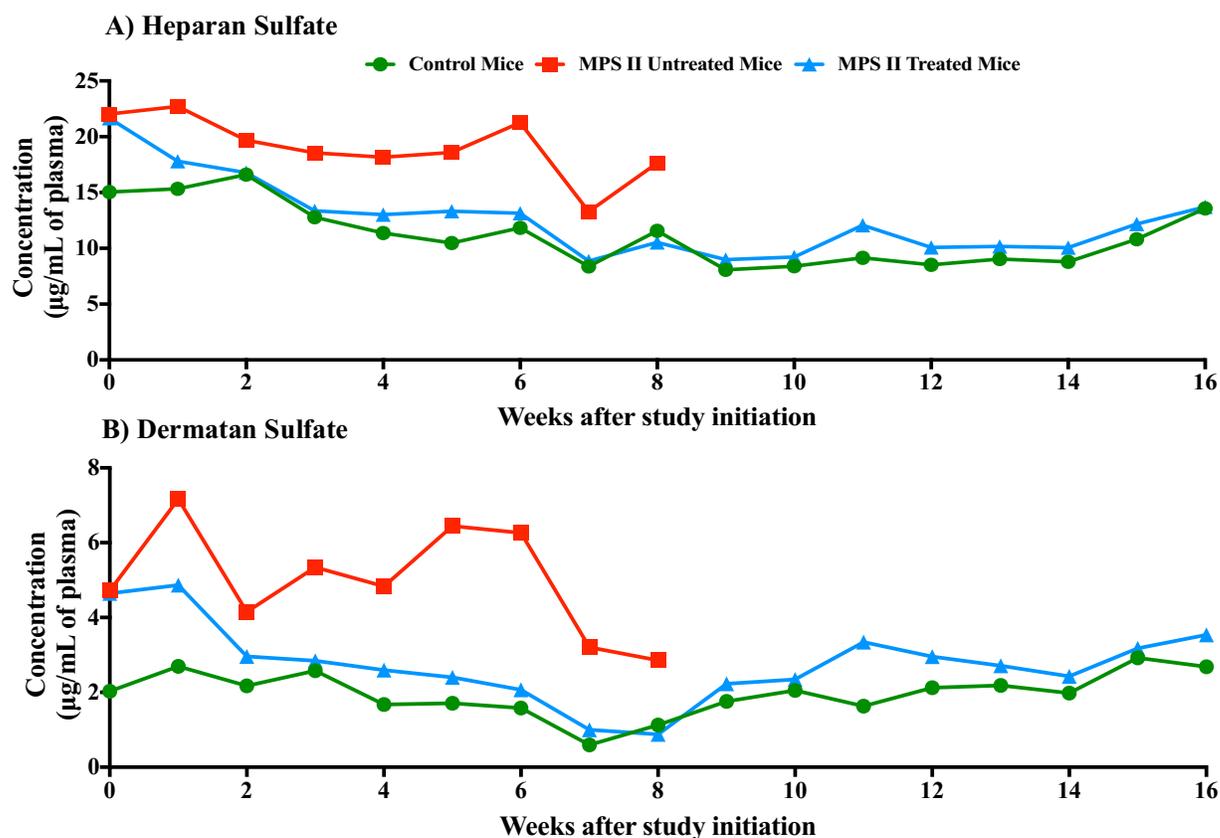


Fig. 4. Plasma longitudinal variation of: A) heparan sulfate; and B) dermatan sulfate in control mice ($n = 8$), MPS II treated ($n = 8$) and untreated mice ($n = 8$). Untreated MPS II mice were not part of the extended 16-week study.

Figure 4 indicates a variability in plasma over time in HS and DS levels in the control mice in the 8-week study with measured average group values ranging from 8.72 to 18.31 µg/mL. It should be emphasized that during the methanolysis step, all HS and DS disaccharides were derived and quantified by selecting the most abundant disaccharide peak. When comparing plasma in control mice to untreated MPS II mice, both HS and DS levels were increased in MPS II mice: HS levels were increased 1.4 times, while DS levels were increased 2.3 times at 9 weeks of age (prior to the initiation of therapy). Following 2 weeks of ERT, both HS and DS levels in plasma of MPS II mice were significantly decreased (both p values < 0.05) and remained very close to control levels for the remaining of the study. After the 8-week ERT HS and DS levels were found to be not significantly different ($p > 0.05$) in MPS II treated mice and control mice by the Mann-Whitney U test. These levels remained stable through

the 16-week study. It is noteworthy that HS and DS levels measured in plasma are very low in comparison to the HS and DS levels observed in urine. For the same volume of plasma and urine, HS and DS levels were 30-40 times higher in urine compared to plasma.

3.4 Longitudinal variation of dermatan sulfate and heparan sulfate in urine in MPS II treated, untreated and control mice

The urine longitudinal variation of HS and DS over an 8 and 16-week period is shown in Figure 5.

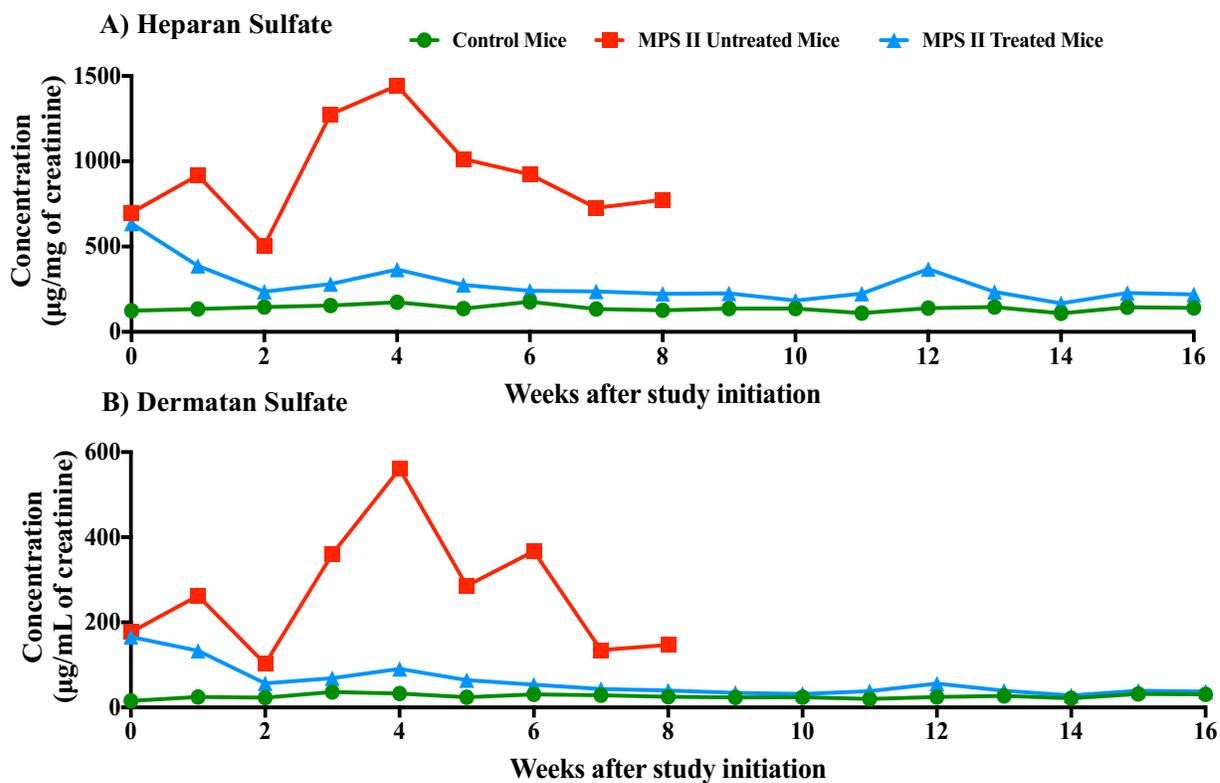


Fig. 5. Urine longitudinal variation of: A) heparan sulfate; and B) dermatan sulfate in control (n = 8), MPS II treated (n = 7) and untreated (n = 8) mice. Untreated MPS II mice were not studied in the extended 16-week study.

As expected, and confirmed by the Mann-Whitney U test, HS and DS levels in urine were significantly different ($p < 0.05$) in MPS II mice compared to control mice. Similar to most tissues and plasma, HS was more abundant than DS in both MPS II groups and control mice. Two weeks of treatment were sufficient to reduce HS and DS levels in MPS II treated mice

close to the concentrations measured in control mice. These levels were successfully maintained for both parts of the 8- and 16-week study. Major variations in HS and DS concentrations were observed overtime in MPS II untreated mice, whereas HS and DS levels in MPS II treated mice and control mice remained relatively constant for 16 weeks.

Conclusions

In this research study, a rapid, efficient and robust UPLC-MS/MS method, based on previously published work [2,26] was optimized, validated and applied for the absolute quantification of HS and DS in different mouse tissues, including the liver, brain, heart, kidneys, small intestine, lungs, spleen, and plasma and urine

Following the analysis of MPS II treated, untreated and control mouse tissues and biological fluids, we observed major variation in HS and DS levels in all matrices. HS was more abundant than DS in control and both MPS II mice groups in all matrices except for the control heart where DS concentrations were higher. The distribution of DS is variable in MPS II treated, untreated and control mice in most tissues except in the kidneys and small intestine.

After 8 weeks of ERT, the treated mice group showed a significant decrease in both HS and DS levels in most tissues and biological fluids with liver and heart being the most responsive tissues and the brain and lungs being the least responsive tissues to ERT. While a major decrease in GAGs was observed in most tissues, the residual levels of HS and DS are still significantly higher ($p < 0.05$) than control levels. Our results show that 16 weeks of treatment did not show further significant reduction in HS and DS in most tissues. However, the levels of HS and DS reached after 8 weeks of treatment remained stable until 16 weeks of treatment.

In plasma, HS and DS levels were, even in MPS II mouse groups, very low in comparison with the levels measured in urine and tissues. Significant differences were observed between MPS II untreated and treated mice for both analytes. Following 2 weeks of treatment, both HS and DS levels in MPS II mice were significantly reduced near control levels. These levels remained stable over the remainder of the study (16 weeks). Similar results were obtained for urine specimens.

In conclusion, we observed that ERT was efficient for lowering GAG levels in tissues and biological fluids of treated MPS II mice. However, residual levels of HS and DS following ERT were still observed in plasma and tissues, whereas urine levels after 16 weeks of ERT were similar to control levels.

Considering these mice results and if we extrapolate to humans, it seems that a urine specimen might be a more reliable matrix for detection, monitoring and follow-up for MPS II patients. Further investigations will be required to determine the influence of age at ERT initiation on remaining residual HS and DS levels following ERT. Alternative treatment such as intrathecal infusion of ERT for MPS II patients with the neuronopathic form of Hunter syndrome are currently under investigation [35]. The UPLC-MS/MS method developed for HS and DS quantification is reliable to compare the effectiveness of treatment in different mice organs.

Future perspectives

While enzyme replacement therapy remains the only approved treatment targeting MPS II specifically, several others are currently under investigation [36]. The UPLC-MS/MS method proposed in this paper was shown to be robust and will be useful in assessing the efficiency of new treatments such as gene therapy or chaperone therapy in animal models.

Executive summary

- **Background:**
 - The knowledge of the distribution of HS and DS in MPS II mouse tissues as well as the effects of ERT on each individual tissues and biological fluids are important elements to better understand the physiopathology of this disease.
- **Experimental:**
 - Tissues such as liver, brain, heart, lungs, spleen, small intestines and kidneys were homogenized and methanolized in order to quantify HS and DS in each individual tissue as well as in urine and plasma of MPS II treated, untreated and control mice.
- **Results:**
 - There is a variability in the distribution of HS and DS in different mouse tissues and biological fluids. HS was more abundant than DS in all matrices, with a major increase in untreated mouse liver. The highest levels of DS were measured in untreated mouse lungs. ERT was the most effective in reducing HS and DS in the liver, much less effective in the lungs and ineffective in reducing biomarker concentrations in the brain.
- **Conclusions**
 - A rapid, efficient and robust UPLC-MS/MS method was optimized and validated to study the distribution of HS and DS in different mouse tissues, including the liver, brain, heart, kidneys, small intestine, lungs, spleen, and plasma and urine. This method will be an interesting tool to evaluate the efficiency of new treatments on animal models.

Ethical conduct of research

This animal research project was approved by the Research Ethics Board at Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME).

References

- [1] Muenzer J. Overview of the Mucopolysaccharidoses. *Rheumatology*. 50(5), 4–12 (2011).
- [2] *Auray-Blais C, Lavoie P, Tomatsu S *et al.* UPLC-MS/MS detection of disaccharides derived from glycosaminoglycans as biomarkers of mucopolysaccharidoses. *Anal. Chim. Acta*. 936, 139-148 (2016).
- [3] Neufeld EU, Muenzer J, Scriver, CR, Beaudet AL. The metabolic & molecular bases of inherited disease: The mucopolysaccharidoses. New York: McGraw-Hill (2001).
- [4] Shah GS, Mahal T, Sharma S. Atypical clinical presentation of mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): A case report. *J. Med. Case Rep.* 26(4),154 (2010).
- [5] Muenzer J. The mucopolysaccharidoses: A heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. *J. Pediatr*, 144(5), S27-S34 (2004).
- [6] Kowalewski B, Lamanna, WC, Lawrence R *et al.* Arylsulfatase G inactivation causes loss of heparan sulfate 3-O-sulfatase activity and mucopolysaccharidosis in mice. *PNAS*, 109(26), 10310-10315 (2012).
- [7] Fenzl CR, Teramoto K, Moshirfar M. Ocular manifestations and management recommendations of lysosomal storage disorders I: mucopolysaccharidoses. *Clin. Ophthalmol*, 9, 1633-1644 (2015).
- [8] Giugliani R, Villarreal ML, Valdez CA *et al.* Guidelines for diagnosis and treatment of Hunter Syndrome for clinicians in Latin America. *Genet. Mol. Biol.* 37(2), 315-329 (2014).

- [9] Demydchuk, M., Hill, C., Zhou, A., *et al.* Insights into Hunter syndrome from the structure of iduronate-2- sulfatase. *Nat. Commun.*, 8, 15786 (2017).
- [10] Chen H. Atlas of Genetic Diagnosis and Counseling: Mucopolysaccharidosis II (Hunter Syndrome). Humana Press, 678-679. ISBN 1-58829-681-4 (2006).
- [11] Wraith JE, Scarpa M, Beck M, *et al.* Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): A clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy. *Eur. J. Pediatr.* 167(3), 267-277 (2007).
- [12] Raluy-Callado M, Chen W, Whiteman DA, Fang J, Wiklund I. The impact of Hunter syndrome (mucopolysaccharidosis type II) on health-related quality of life. *Orphanet J. Rare Dis.* 8(1), 101 (2013).
- [13] Whiteman DA, Kimura A. Development of idursulfase therapy for mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): The past, the present and the future. *Drug Des. Devel. Ther.* 11, 2467-2480 (2017).
- [14] Parini R, Rigoldi M, Tedesco, L *et al.* Enzymatic replacement therapy for Hunter disease: Up to 9 years experience with 17 patients. *Mol. Genet. Metab. Rep.* 3, 65-74 (2015).
- [15] Silva EM, Strufaldi MW, Andriolo RB, Silva LA. Enzyme replacement therapy with idursulfase for mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). *Cochrane Database Syst Rev*, 11, CD008185 (2011).
- [16] Lampe C, Bosserhoff A, Burton BK *et al.* Long-term experience with enzyme replacement therapy (ERT) in MPS II patients with a severe phenotype: An international case series. *J. Inherit. Metab. Dis.* 37(5), 823-829 (2014).

- [17] Tomanin R, Zanetti A, D'Avanzo, F *et al.* Clinical efficacy of Enzyme Replacement Therapy in paediatric Hunter patients, an independent study of 3.5 years. *Orphanet J. Rare Dis.* 9, 129 (2014).
- [18] Muenzer J, Bodamer O, Burton B, Clarke L, Frenking GS, Giugliani, R *et al.* The role of enzyme replacement therapy in severe Hunter syndrome—an expert panel consensus. *Eur. J. Pediatr.* 171(1), 181-188 (2012).
- [19] Guffon N, Heron B, Chabrol B, Feillet F, Montauban V, Valayannopoulos V. Diagnosis, quality of life, and treatment of patients with Hunter syndrome in the French healthcare system: A retrospective observational study. *Orphanet J. Rare Dis.* 10, 43 (2015).
- [20] Muenzer J, Hendriksz CJ, Fan Z, Vijayaraghavan S, Perry V, Santra S *et al.* A phase I/II study of intrathecal idursulfase-IT in children with severe mucopolysaccharidosis II. *Genet. Med.* 18(1), 73-81 (2015).
- [21] Chung JK, Brown E, Crooker B, Palmieri KJ, Mccauley, TG. Biodistribution of Idursulfase formulated for intrathecal use (Idursulfase-IT) in cynomolgus monkeys after intrathecal lumbar administration. *Plos One.* 11(10), (2016).
- [22] **Garcia AR, Dacosta, JM, Pan J, Muenzer J, Lamsa, JC. Preclinical dose ranging studies for enzyme replacement therapy with idursulfase in a knock-out mouse model of MPS II. *Mol. Genet. Metab.* 91(2), 183-190 (2007).
- [23] Piraud M, Maire I, Mathieu M. Pitfalls of screening for mucopolysaccharidosis by the dimethylmethylene blue test. *Clin. Chem.* 39(1), 163-164 (1993).
- [24] Tomatsu S, Shimada T, Mason RW *et al.* Establishment of glycosaminoglycan assays for mucopolysaccharidoses. *Metabolites.* 4(3), 655–679 (2014).

- [25]* Auray-Blais C, Bhérier P, Gagnon R *et al.* Efficient analysis of urinary glycosaminoglycans by LC-MS/MS in mucopolysaccharidoses type I, II and VI. *Mol. Genet. Metab.* 102(1), 49-56 (2011).
- [26] Zhang H, Young SP, Auray-Blais C, Orchard PJ, Tolar J, Millington DS. Analysis of glycosaminoglycans in cerebrospinal fluid from patients with mucopolysaccharidoses by isotope-dilution ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.* 57(7), 1005-1012 (2011).
- [27] Zhang H, Wood T, Young SP, Millington DS. A straightforward, quantitative ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for heparan sulfate, dermatan sulfate and chondroitin sulfate in urine: An improved clinical screening test for the mucopolysaccharidoses. *Mol. Genet. Metab.* 114(2), 123-128 (2015).
- [28] Khan SA, Mason RW, Giugliani, R *et al.* Glycosaminoglycans analysis in blood and urine of patients with mucopolysaccharidosis. *Mol. Genet. Metab.* 125(1-2), 44-52 (2018).
- [29] Zhang H, Young SP, Millington DS. Quantification of Glycosaminoglycans in Urine by Isotope-Dilution Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 76(1), 17.12.1-17.12.14 (2013).
- [30] Auray-Blais C, Lavoie P, Zhang H *et al.* An improved method for glycosaminoglycan analysis by LC-MS/MS of urine samples collected on filter paper. *Clin. Chim. Acta.* 413(7-8), 771-778 (2012).
- [31] Lavoie P, Auray-Blais C. Depolymerisation of GAGs by Methanolysis and Analysis by Tandem Mass Spectrometry, Chapter 30: in *Mucopolysaccharidoses Update* (2 volume set). ISBN: 978-1-53613-986-0

- [32] Provençal P, Boutin M, Dworski S, Au B, Medin JA, Auray-Blais C. Relative distribution of Gb3 isoforms/analogs in NOD/SCID/Fabry mice tissues determined by tandem mass spectrometry. *Bioanalysis*. 8(17), 1793-1807 (2016).
- [33] Auray-Blais C, Boutin, M, Gagnon R, Dupont FO, Lavoie P, Clarke JT. Urinary globotriaosylsphingosine-related biomarkers for Fabry disease targeted by metabolomics. *Anal. Chem.* 84(6), 2745-2753 (2012).
- [34] Garcia AR, Pan J, Lamsa, JC, Muenzer, J. The characterization of a murine model of mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *J. Inherit. Metab. Dis.* 30(6), 924-934 (2007).
- [35] Muenzer J, Hendriks, CJ., Fan, Z *et al.* A phase I/II study of intrathecal idursulfase-IT in children with severe mucopolysaccharidosis II. *Genet. Med.* 18(1), 73-81 (2015).
- [36] Fecarotta S, Gasperini S, Parenti G. New treatments for the mucopolysaccharidoses: From pathophysiology to therapy. *Ital J. Pediatr.* 44(S2), 124 (2018).

References of Interest:

2*: This publication describes the quantification of urine HS, DS and KS in MPS patients. Furthermore, the authors are using a UPLC-MS/MS technology similar to the one used in this paper.

22**: This research project evaluated the effects of ERT over time in different MPS II mouse tissues and biological fluids. Unfortunately, the authors used the DMB spectrophotometric method for GAGs quantification, a method which was previously described as unreliable.

25*: This paper proposed the use of the methanolysis instead of enzymatic digestion of GAGs in order to obtain disaccharides that can be quantified by UPLC-MS/MS.

Discussion

La spectrométrie de masse est une technologie analytique en plein essor de plus en plus présente dans différents domaines et utilisée pour divers types d'applications. En santé, la spectrométrie de masse peut être utilisée pour l'identification de nouveaux biomarqueurs et leur quantification dans le but de dépister des maladies rares, de confirmer un diagnostic ou un pronostic et d'assurer le suivi des patients en monitorant les effets d'un traitement à court, moyen ou long terme. Dans le cas de la MPS II plus précisément, les méthodes préalablement utilisées pour la quantification de deux biomarqueurs, soit l'héparan sulfate et le dermatan sulfate, comportaient de nombreuses failles pouvant mener non seulement à de faux positifs, mais également à de faux négatifs tel que révélé par Piraud *et al.*, en 1993, et confirmé par Auray-Blais *et al.*, en 2016. Évidemment, des données non fiables peuvent changer considérablement la prise en charge d'un patient. Dans le cas de méthodes faisant usage de la spectrométrie de masse en tandem, bien que celles-ci peuvent s'avérer initialement coûteuses en raison de l'investissement nécessaire lors de l'achat des appareils, le coût des analyses subséquentes est abordable dû à la robustesse et à la durabilité de l'équipement. La spectrométrie de masse en tandem offre également davantage de fiabilité, de robustesse, de sensibilité et de spécificité comparée aux techniques spectrophotométriques couramment utilisées.

Dans le cadre de la présente étude, l'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem a permis de développer une méthode analytique fiable et robuste permettant la quantification absolue du HS et du DS dans plusieurs tissus et liquides biologiques tels que le foie, le cerveau, le cœur, les reins, le petit intestin, les poumons, la rate, l'urine et le plasma. La méthode développée a été validée, puis utilisée afin d'établir le profil de distribution de ces deux biomarqueurs chez des souris MPS II traitées, non traitées et contrôles. Ces analyses ont permis de déterminer qu'effectivement, il existe une variabilité au niveau de la distribution de ces deux molécules dans les tissus et liquides biologiques à l'étude. L'héparan sulfate est nettement plus augmenté que le dermatan sulfate et ce, dans tous les tissus. Dans le foie particulièrement, la concentration d'héparan sulfate à 10 µg/mg de tissus surpasse de 4 fois la concentration mesurée au niveau du rein ce qui constitue la deuxième plus forte augmentation d'HS dans un tissu (2.73µg/mg). Au niveau du dermatan sulfate, la plus haute

concentration a été mesurée au niveau du poumon (1.41µg/mg de tissus). Ainsi, il est donc fort probable que le HS soit la molécule causant davantage de dommages chez les patients atteints de la MPS II. Ce type d'observations n'aurait pas été possible en utilisant des méthodes spectrophotométriques puisque celles-ci quantifient les glycosaminoglycans totaux et ne donnent donc pas d'information quant à l'augmentation de l'héparan sulfate ou du dermatan sulfate individuellement.

Également, dans le cadre du présent projet, il a été possible d'évaluer les effets du traitement sur les différents tissus et de constater que les biomarqueurs varient différemment suite au traitement. Par exemple, au niveau du foie, le traitement par TER a mené à une réduction de HS de 99%, alors qu'une réduction de 95% a été observée au niveau du dermatan sulfate. Par ailleurs, cette réduction a chuté à 72% et à 68% pour le HS et DS, respectivement, au niveau des poumons. Il semblerait donc qu'il existe un lien entre la distribution de l'enzyme suite à l'infusion de celle-ci et la réduction de HS et DS dans le tissu. Effectivement, suite à l'infusion, le tissu qui reçoit la plus grande dose d'enzyme est le foie, suivi de la rate, des reins, des poumons, du cœur et finalement du cerveau. (Garcia^a *et al.*, 2007). Il est à noter que l'enzyme n'a pas été dosée au niveau du petit intestin dans ladite étude. La diminution la plus importante de biomarqueurs est au niveau du foie, suivie du cœur, de la rate, des reins, du poumon et finalement le cerveau, où il n'y a pas de réduction au niveau de la concentration de l'HS et du DS. Mis à part le cœur, qui est le tissu après le cerveau où l'enzyme infusée s'accumule le moins, mais qui présente la seconde réduction la plus importante de biomarqueurs après le foie, il existe une corrélation entre la présence de l'enzyme infusée et le niveau de réduction desdits biomarqueurs. Également, il a été intéressant de constater que chez la souris, la réduction maximale des biomarqueurs survient assez rapidement. Effectivement, après 8 semaines de traitement pour les tissus et seulement 2 semaines de traitement pour l'urine et le plasma, la réduction des biomarqueurs a atteint son maximum. Les concentrations mesurées après 2 ou 8 semaines selon le type de matrices (liquides biologiques ou tissus) sont ensuite maintenues pour le reste de l'étude. Également, tel que décrit dans la littérature (Silva *et al.*, 2011), il a été observé que la TER ne parvient pas à réduire la concentration du HS et DS au niveau du cerveau. Au niveau des liquides biologiques, il a été noté que les concentrations pour les deux biomarqueurs sont très faibles au niveau du plasma alors qu'elles sont particulièrement élevées dans l'urine. Effectivement,

bien que les valeurs obtenues pour le HS et DS soient généralement normalisées par la créatinine pour l'urine et par le volume de plasma, il a été possible d'observer que pour un même volume, chez les souris MPS II non traitées, la concentration des biomarqueurs est de 30 à 40 fois plus élevée dans l'urine comparée au plasma. Bref, tel qu'anticipé initialement, il existe effectivement des différences significatives au niveau de la distribution du HS et du DS, non seulement d'un groupe de souris à l'autre, mais également d'un type de matrice à l'autre.

Conclusions

L'objectif principal de cette étude consistait à étudier la distribution du HS et DS dans les tissus et liquides biologiques de souris contrôles, MPS II traitées et non traitées. Ainsi, pour y parvenir, nous avons visé les sous-objectifs suivants: 1) Optimiser l'extraction du HS et DS dans les tissus et liquides biologiques tels que le foie, le cerveau, le cœur, les reins, le petit intestin, les poumons, la rate, l'urine et le plasma; 2) Développer, optimiser puis valider une méthode d'analyse en spectrométrie de masse en tandem afin de procéder à une quantification absolue du HS et DS; et 3) Établir un profil de distribution du HS et DS chez les souris MPS II traitées, non traitées et contrôles.

Ainsi, une méthode analytique permettant la quantification absolue de ces deux biomarqueurs a été développée et optimisée par UPLC-MS/MS. L'homogénéisation des tissus ainsi que la méthanolyse ont été développées et optimisées dans le but d'obtenir un signal maximal pour les molécules d'intérêt lors des analyses. La méthode a aussi été validée pour toutes les matrices à l'étude offrant un haut niveau de justesse (moins de 12% de biais) et de précision (moins de 12% de déviation standard relative), avec des limites de quantification et de détection moyennes de l'ordre du nanogramme/mg de tissus. Les analyses des différents tissus, du plasma et de l'urine ont révélé un profil de distribution de biomarqueurs significativement différent chez les différents groupes de souris. De façon générale, il a été observé que la concentration du HS est supérieure à la quantité du DS dans toutes les matrices étudiées. Les concentrations les plus élevées de HS ont été mesurées au niveau du foie alors que les plus hautes concentrations de DS ont été observées au niveau des poumons. La TER a permis de réduire de façon significative l'accumulation des deux biomarqueurs dans tous

les tissus sauf au niveau du cerveau, puisque l'enzyme infusée ne parvient pas à franchir la barrière hématoencéphalique.

Au niveau des liquides biologiques, de très faibles concentrations de HS et de DS ont été mesurées au niveau du plasma alors qu'au niveau de l'urine, les concentrations mesurées étaient très élevées. Deux semaines de TER ont été suffisantes pour réduire le niveau des deux biomarqueurs chez la souris MPS II à près du niveau des souris contrôles. Également, pour les deux matrices, la TER a réussi à maintenir les niveaux atteints après deux semaines pour le reste de l'étude de 8 ou 16 semaines.

Finalement, dans le cadre de perspectives futures, il serait intéressant d'évaluer s'il existe une corrélation entre l'âge de la souris et les effets de la TER. Par exemple, les niveaux de HS et DS atteints après 8 semaines chez une souris MPS II âgée de 9 semaines au début du traitement pourraient-ils être davantage réduits si le traitement avait été initié à 5 ou 6 semaines après la naissance? Et si le traitement avait été initié à 12 semaines, les concentrations résiduelles de HS et de DS observées chez les souris traitées seraient-elles plus élevées? Bref, le présent projet a permis de mieux comprendre la biochimie de la MPS II ainsi que des effets du seul traitement approuvé à ce jour, soit la TER, pour la MPS II. Cependant, il reste encore beaucoup à faire afin de fournir un meilleur support et une meilleure prise en charge pour les patients atteints de la MPS II dans le cadre d'une médecine personnalisée.

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier Christiane Auray-Blais, ma directrice de maîtrise, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser un projet fascinant dans son laboratoire en spectrométrie de masse. Merci de m'avoir si bien accueilli, d'avoir toujours été disponible et de m'avoir fait progresser tant sur le plan personnel que professionnel. Tu représentes tout ce qu'un étudiant rêve d'avoir comme directrice de recherche et même plus. Ton enthousiasme, ton dynamisme, ta joie, ta bonne humeur de même que ton professionnalisme ont fait en sorte qu'il a été un réel plaisir de pouvoir te côtoyer au cours des dernières années. Merci pour tout Christiane!

Je souhaite également remercier tous les membres du laboratoire, Michel Boutin, Tristan Martineau, Mona Abaoui, Amanda Toupin et une mention particulière à Pamela Lavoie qui m'a grandement aidé dans la réalisation de ce projet. Vous êtes tous des personnes extraordinaires qui avez contribué à rendre le temps passé en votre compagnie très agréable. Les échanges avec chacun d'entre vous m'ont permis de voir d'autres aspects non seulement de la science, mais également de la vie. Merci pour votre support et votre aide, je vous en suis grandement reconnaissant.

Finalement, je tiens à remercier la compagnie Shire International GmbH, à Zug, en Suisse (IIR-CAN-001340) qui a supporté financièrement ce projet de recherche, Waters Corp. pour le support technique en spectrométrie de masse, ainsi que Jackson Laboratories pour la logistique reliée aux souris. Ces supports financier, technique et animal ont permis la réalisation de ce projet.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Amartino, H. (2015). Hunter Syndrome (Mucopolysaccharidosis II) – The Signs and Symptoms a Neurologist Needs to Know. *European Neurological Review*, 10(01), 90.
- Appelqvist, H., Wäster, P., Kågedal, K., Öllinger, K. (2013). The lysosome: From waste bag to potential therapeutic target. *Journal of Molecular Cell Biology*, 5(4), 214-226.
- Araujo, P. (2009). Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B*, 877(23), 2224-2234.
- Ashworth, J. L., Biswas, S., Wraith, E., Lloyd, I. C. (2006). Mucopolysaccharidoses and the eye. *Surv Ophthalmol*, 51(1), 1-17.
- Aston, F.W. (1920). LIX. The mass-spectra of chemical elements. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 39:233
- Auray-Blais, C., Lavoie, P., Tomatsu, S., Valayannopoulos, V., Mitchell, J. J., Raiman, J., Beaudoin, M., Maranda, B., Clarke, J. T. (2016). UPLC-MS/MS detection of disaccharides derived from glycosaminoglycans as biomarkers of mucopolysaccharidoses. *Analytica Chimica Acta*, 936, 139-148.
- Auray-Blais, C., Lavoie, P., Zhang, H., Gagnon, R., Clarke, J. T., Maranda, B., Young, S. P., An, Y., Millington, D. S. (2012). An improved method for glycosaminoglycan analysis by LC-MS/MS of urine samples collected on filter paper. *Clinica Chimica Acta*, 413(7-8), 771-778.
- Barth, A. L., Magalhães, T. S., Reis, A. B., Oliveira, M. L., Scalco, F. B., Cavalcanti, N. C., Silva, D. S., Torres, D. A., Costa, A. A., Bonfim, C., Giugliani, R., Llerena, J. C., Horovitz, D. D. (2017). Early hematopoietic stem cell transplantation in a patient with severe mucopolysaccharidosis II: A 7 years follow-up. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 12, 62-68.
- Berry, H. K. (1987). Screening for mucopolysaccharide disorders with the berry spot test. *Clinical Biochemistry*, 20(5), 365-371.
- Biomarkers Definitions Working Group. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 69(3), 89-95.
- Boisvert G. (2014). Quelques techniques de préparation d'échantillons dans le domaine clinique et de recherche. *Waters Corp*.
- Braunlin, E. A., Harmatz, P. R., Scarpa, M., Furlanetto, B., Kampmann, C., Loehr, J. P., Ponder, K. P., Roberts, W. C., Rosenfeld, H. M., Giugliani, R. (2011). Cardiac disease in patients with mucopolysaccharidosis: presentation, diagnosis and management. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34(6), 1183-1197.

- Brown, J., Brown, J., Carroll, R., Tambe, N., Glass, C., Langford, K., Le, S., Victoroff, A., Wraith, J. E., Dickson, P., Bigger B. W, Crawford B. E., Crawford, B. (2010). Glycan-based biomarkers for the mucopolysaccharidoses. *Molecular Genetics and Metabolism*, 99(2).
- Burton, B. K., Charrow, J., Hoganson, G. E., Waggoner, D., Tinkle, B., Braddock, S. R Schneider, M., Grange, D. K., Nash, C., Shryock, H., Barnett, R., Shao, R., Basheeruddin, K., Dizikes, G. (2017). Newborn screening for lysosomal storage disorders in illinois: The initial 15-month experience. *The Journal of Pediatrics*, 190, 130-135.
- Burton, B. K., Giugliani, R. (2012). Diagnosing Hunter syndrome in pediatric practice: Practical considerations and common pitfalls. *European Journal of Pediatrics*, 171(4), 631-639
- Buszewski, B., Noga, S. (2011). Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(1), 231-247.
- Chen, X., Qiu, W., Ye, J., Han, L., Gu, X., Zhang, H. (2016). Demographic characteristics and distribution of lysosomal storage disorder subtypes in Eastern China. *Journal of Human Genetics*, 61(4), 345-349.
- Chih-Kuang, C., Shuan-Pei, L., Shyue-Jye, L., Tuen-Jen, W. (2002). MPS screening methods, the berry spot and acid turbidity tests, cause a high incidence of false-negative results in sanfilippo and morquio syndromes. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16(5), 253-258.
- Choi, B., Hercules, D. M., Zhang, T., Gusev, I. (2003). Comparison of quadrupole, time-of-flight, and fourier transform mass analyzers for LC-MS applications. *Current Trends in Mass Spectrometry*, 18(5S)
- Clarke, L. A. (2011). Pathogenesis of skeletal and connective tissue involvement in the mucopolysaccharidoses: glycosaminoglycan storage is merely the instigator. *Rheumatology*, 50(5), 13-18.
- Clarke, L. A. (2008). The mucopolysaccharidoses: a success of molecular medicine. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 10.
- Coskun, O. (2016). Separation Techniques: chromatography. *Northern Clinics of Istanbul*, 3(2): 156–160.
- Coutinho, M. F., Lacerda, L., Alves, S. (2012). Glycosaminoglycan Storage Disorders: A Review. *Biochemistry Research International*, 2012,1-16.
- Cox, T. M. (2006). Biomarkers in lysosomal storage diseases. Dans Mehta, A., Beck, M., Sunder-Plassmann, G., *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. Oxford PharmaGenesis, Oxford, Chapitre 9.

- Dams, R., Huestis, M. A., Lambert, W. E., & Murphy, C. M. (2003). Matrix effect in bioanalysis of illicit drugs with LC-MS/MS: Influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 14(11), 1290-1294.
- Demydchuk, M., Hill, C., Zhou, A., Bunkoczi, G., Stein, P., Marchesan, D., Deane, J. E., Read, R. (2017). Insights into Hunter syndrome from the structure of iduronate-2- sulfatase. *Nat Commun*, 8:15786.
- Dong, M. W. (2006). Modern HPLC for practicing scientists. Hoboken. *Wiley-Interscience*.
- Drug Approval Package. (2006). Retrouvé à partir de www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2006/125151s0000_ElapraseTOC.cfm
- Eeckhaut, A. V., Lanckmans, K., Sarre, S., Smolders, I., Michotte, Y. (2009). Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. *Journal of Chromatography B*, 877(23), 2198-2207.
- Fenzl, C., Teramoto, K., Moshirfar, M. (2015). Ocular manifestations and management recommendations of lysosomal storage disorders I: mucopolysaccharidoses. *Clinical Ophthalmology*, 1633.
- Friso, A., Tomanin, R., Salvalaio, M., Scarpa, M. (2010). Genistein reduces glycosaminoglycan levels in a mouse model of mucopolysaccharidosis type II. *British Journal of Pharmacology*, 159(5), 1082-1091.
- Froissart, R., Silva, I. M., Maire, I. (2007). Mucopolysaccharidosis type II: an update on mutation spectrum. *Acta Paediatrica*, 96, 71-77.
- Futerman, A. H., Meer, G. V. (2004). The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(7), 554-565.
- Gajula, P., Ramalingam, K., Bhadrashetty, D. (2012). A rare case of mucopolysaccharidosis: Hunter syndrome. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 3(1), 97.
- Garcia^a, A. R., Dacosta, J. M., Pan, J., Muenzer, J., Lamsa, J. C. (2007). Preclinical dose ranging studies for enzyme replacement therapy with idursulfase in a knock-out mouse model of MPS II. *Molecular Genetics and Metabolism*, 91(2), 183-190.
- Garcia^b, A. R., Pan, J., Lamsa, J. C., Muenzer, J. (2007). The characterization of a murine model of mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 30(6), 924-934.
- Ghosh, C., Shinde, C. P., Chakraborty, B. S. (2012). Influence of ionization source design on matrix effects during LC-ESI-MS/MS analysis. *Journal of Chromatography B*, 893-894, 193-200.

- González-Gutiérrez-Solana, L., Guillén-Navarro, E., Toro, M. D., Dalmau, J., González-Meneses, A., Couce, M. L. (2018). Diagnosis and follow-up of patients with Hunter syndrome in Spain. *Medicine*, 97(29).
- Grant, N., Bailey, L., Prada, C. (2018). Safety of enzyme replacement therapy to treat Hunter syndrome in children aged 5 years and under. *Molecular Genetics and Metabolism*, 123(2).
- Griffiths, J. (2008). A brief history of mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 80(15), 5678-5683.
- Gross, J. H., Roepstorff, P. (2014). Mass spectrometry: A textbook. Heidelberg: *Springer*, 21-66.
- Guffon, N., Bertrand, Y., Forest, I., Fouilhoux, A., Froissart, R. (2009). Bone marrow transplantation in children with Hunter syndrome: Outcome after 7 to 17 years. *The Journal of Pediatrics*, 154(5), 733-737.
- Hult, M., Darin, N., Döbeln, U. V., Månsson, J. (2014). Epidemiology of lysosomal storage diseases in Sweden. *Acta Paediatrica*, 103(12), 1258-1263.
- Hunter, C. (1917). A rare disease in two brothers. *Proc R Soc Med.*, 10, 104–116.
- Jones, S. A., Almássy, Z., Beck, M., Burt, K., Clarke, J. T., Giugliani, R., Hendriksz, C., Kroepfl, T., Lavery, L., Lin, S., Malm, G., Ramaswami, U., Tincheva, R., Wraith, J. E. (2009). Mortality and cause of death in mucopolysaccharidosis type II—a historical review based on data from the Hunter outcome survey (HOS). *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 32(4), 534-543.
- Kampmann, C., Abu-Tair, T., Gökce, S., Lampe, C., Reinke, J., Mengel, E., Hennermann, J. B Wiethoff, C. M. (2016). Heart and Cardiovascular Involvement in Patients with Mucopolysaccharidosis Type IVA (Morquio-A Syndrome). *Plos One*, 11(9).
- Kim, K. H., Dodsworth, C., Paras, A., Burton, B. K. (2013). High dose genistein aglycone therapy is safe in patients with mucopolysaccharidoses involving the central nervous system. *Molecular Genetics and Metabolism*, 109(4), 382-385.
- Kingma, S. D., Bodamer, O. A., Wijburg, F. A. (2015). Epidemiology and diagnosis of lysosomal storage disorders: Challenges of screening. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 29(2), 145-157.
- Kornfeld, S. (1989). The Biogenesis of Lysosomes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 5(1), 483-525.
- Kowalewski, B., Lamanna, W. C., Lawrence, R., Damme, M., Stroobants, S., Padva, M., Kalus, I., Frese, M. A., Lübke, T., Lüllmann-Rauch, R., D'Hooge, R., Esko, J. D., Dierks, T. (2012). Arylsulfatase G inactivation causes loss of heparan sulfate 3-O-sulfatase activity and mucopolysaccharidosis in mice. *PNAS*. 109(26):10310-5.

- Lampe, C., Bosserhoff, A., Burton, B. K., Giugliani, R., Souza, C. F., Bittar, C., Muschol, N., Olson, R., Mendelsohn, N. J. (2014). Long-term experience with enzyme replacement therapy (ERT) in MPS II patients with a severe phenotype: An international case series. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 37(5), 823-829.
- Leighton, S. E., Papsin, B., Vellodi, A., Dinwiddie, R., Lane, R. (2001). Disordered breathing during sleep in patients with mucopolysaccharidoses. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 58(2), 127-138.
- Lin, H. Y., Chuang, C. K., Huang, Y. H., Tu, R. Y., Lin, F., Lin, S. J., Chiu, P. C., Niu, D. M., Tsai, F. J., Hwu, W. L., Chien, Y. H., Lin, J. L., Chou, Y. Y., Tsai, W. H., Chang, T. M., Lin, S. P. (2016). Causes of death and clinical characteristics of 34 patients with Mucopolysaccharidosis II in Taiwan from 1995–2012. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 11(1).
- Lin, H. Y., Chong, K. W., Hsu, J. H., Yu, H. C., Shih, C. C., Huang, C. H., Lin, S. J., Chen, C. H., Chiang, C. C., Ho, H. J., Lee, P. C., Kao, C. H., Cheng, K. H., Hsueh, C., Niu, D. M. (2009). High incidence of the cardiac variant of Fabry disease revealed by newborn screening in the Taiwan Chinese population. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 2(5), 450-456.
- Lindahl, U., Couchman, J., Kimata, K., Esko, J. E. (2017). Essentials of Glycobiology 3rd Edition; Chapitre 17 : Proteoglycans and sulfated glycosaminoglycans. Cold Spring Harbor (NY): *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Lindon, J. C., Tranter, G. E., Koppenaal, D. W. (2010). Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry. *Amsterdam: Elsevier*.
- Link, B., Pinto, L. L., Giugliani, R., Wraith, J. E., Guffon, N., Eich, E., Beck, M. (2010). Orthopedic manifestations in patients with muco-polysaccharidosis type II (Hunter syndrome) enrolled in the Hunter outcome survey. *Orthopedic Reviews*, 2(2), 16.
- Luzio, J. P., Hackmann, Y., Dieckmann, N. M., Griffiths, G. M. (2014). The biogenesis of lysosomes and lysosome-related organelles. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(9).
- Martin, R., Beck, M., Eng, C., Giugliani, R., Harmatz, P., Munoz, V., Muenzer, J. (2008). Recognition and diagnosis of mucopolysaccharidosis II (Hunter Syndrome). *Pediatrics*, 121(2).
- Mehta, A. B., Beck, M., Sunder-Plassmann, G. (2006). Fabry disease: Perspectives from 5 years of FOS. *Oxford: PharmaGenesis*.
- Meikle, P. J., Hopwood, J. J., Clague, A. E., Carey, W. F. (1999). Prevalence of Lysosomal Storage Disorders. *JAMA*, 281(3), 249-54.

Mindell, J. A. (2012). Lysosomal Acidification Mechanisms. *Annual Review of Physiology*, 74(1), 69-86.

Muenzer, J., Giugliani, R., Scarpa, M., Tylki-Szymańska, A., Jegó, V., Beck, M. (2017). Clinical outcomes in idursulfase-treated patients with mucopolysaccharidosis type II: 3-year data from the hunter outcome survey (HOS). *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 12(1).

Muenzer^a, J. (2011). Overview of the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology*, 50(5), 4-12.

Muenzer^b, J., Bodamer, O., Burton, B., Clarke, L., Frenking, G. S., Giugliani, R., Jones, S., Rojas, M. V., Scarpa, M., Beck, M., Harmatz, P. (2011). The role of enzyme replacement therapy in severe Hunter syndrome—an expert panel consensus. *European Journal of Pediatrics*, 171(1), 181-188.

Muenzer^c, J., Beck, M., Giugliani, R., Suzuki, Y., Tylki-Szymanska, A., Valayannopoulos, V., Vellodi, A., Wraith, J. E. (2011). Idursulfase treatment of Hunter syndrome in children younger than 6 years: Results from the Hunter Outcome Survey. *Genetics in Medicine*, 13(2), 102-109.

Muenzer, J., Wraith, J. E., Beck, M., Giugliani, R., Harmatz, P., Eng, C. M., Vellodi, A., Martin, R., Ramaswami, U., Gucsavas-Calikoglu, M., Vijayaraghavan, S., Wendt, S., Puga, A., Ulbrich, B., Shinawi, M., Cleary, M., Piper, D., Conway, A., Kimura, A. (2006). A phase II/III clinical study of enzyme replacement therapy with idursulfase in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Genetics in Medicine*, 8(8), 465-473.

Muenzer, J., Lamsa, J., Garcia, A., Dacosta, J., Garcia, J., Treco, D. (2002). Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): A preliminary report. *Acta Paediatrica*, 91(11), 98-99.

Muenzer, J., Fu, H. (1999) Targeted disruption of the mouse iduronate sulfatase gene. *American Journal of Human Genetics*, 65(4), A427.

Muhlebach, M. S., Wooten, W., Muenzer, J. (2011). Respiratory manifestations in mucopolysaccharidoses. *Paediatric Respiratory Reviews*, 12(2), 133-138.

Nair, H., Clarke, W. (2017). Mass spectrometry for the clinical laboratory. *Elsevier* London: Academic Pr.

Neufeld, E. F. (1991). Lysosomal storage diseases. *Annual Review of Biochemistry*, 60(1), 257-280.

Neufeld E. U., Muenzer J. Scriver, C. R., Beaudet, A. L. (2001). The metabolic & molecular bases of inherited disease: The mucopolysaccharidoses. *New York: McGraw-Hill*. Chapitre 16.

Panuwet, P., Hunter, R. E., Dsouza, P. E., Chen, X., Radford, S. A., Cohen, J. R., Marder, M. E., Kartavenka, K., Ryan, P. B., Barr, D. B. (2015). Biological matrix effects in

quantitative tandem mass spectrometry-based analytical methods: advancing biomonitoring. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 46(2), 93-105.

Parini, R., Rigoldi, M., Tedesco, L., Boffi, L., Brambilla, A., Bertoletti, S., Boncimino, A., Del Longo, A., De Lorenzo, P., Gaini, R., Gallone, D., Gasperini, S., Giussani, C., Grimaldi, M., Grioni, D., Meregalli, P., Messinesi, G., Nichelli, F., Romagnoli, M., Russo, P., Sganzerla, E., Valsecchi, G. Biondi, A. (2015). Enzymatic replacement therapy for Hunter disease: Up to 9 years experience with 17 patients. *Molecular Genetics and Metabolism*, 3, 65-74.

Piotrowska, E., Jakóbkiewicz-Banecka, J., Barańska, S., Tylki-Szymańska, A., Czartoryska, B., Węgrzyn, A., Węgrzyn, G. (2006). Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis as a basis for gene expression-targeted isoflavone therapy for mucopolysaccharidoses. *European Journal of Human Genetics*, 14(7), 846-852.

Praillet, C., Grimaud, J.A., Lortat-Jacob, H. (2012). Les protéoglycanes. (I) Molécules aux multiples fonctions... futures molécules thérapeutiques ? *Médecine/Sciences*, 14, 412.

Piraud, M., Maire, I., Mathieu, M. (1993). Pitfalls of screening for mucopolysaccharidosis by the dimethylmethylene blue test. *Clin Chem*, 39(1),163-4.

Provençal, P., Boutin, M., Dworski, S., Au, B., Medin, J. A., Auray-Blais, C. (2016). Relative distribution of Gb3 isoforms/analogs in NOD/SCID/Fabry mice tissues determined by tandem mass spectrometry. *Bioanalysis*, 8(17), 1793-1807.

Puckett, Y., Bui, E., Zelicoff, A., Montano, A. (2017). Epidemiology of mucopolysaccharidoses (MPS) in the United States: Challenges and opportunities *Molecular Genetics and Metabolism*, 120, (1-2).

Puiu, M., Chirita-Emandi, A., Dumitriu, S., Arghirescu, S. (2013). Hunter syndrome follow-up after 1 year of enzyme-replacement therapy. *BMJ case reports*, 2013, bcr2012007644.

Raluy-Callado, M., Chen, W., Whiteman, D. A., Fang, J., Wiklund, I. (2013). The impact of Hunter syndrome (mucopolysaccharidosis type II) on health-related quality of life. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 8(1), 101.

Rigante, D., Segni, G. (2002). Cardiac structural involvement in mucopolysaccharidoses. *Cardiology*, 98,1-2.

Robb, M. A., McInnes, P. M., Califf, R. M. (2016). Biomarkers and Surrogate Endpoints. *JAMA*, 315(11), 1107-8.

Rutten, M., Ciet, P., Biggelaar, R. V., Oussoren, E., Langendonk, J. G., Ploeg, A. T., Langeveld, M. (2016). Severe tracheal and bronchial collapse in adults with type II mucopolysaccharidosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 11(1).

- Saftig, P., Klumperman, J. (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: Trafficking meets function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(9), 623-635.
- Saito, S., Ohno, K., Okuyama, T., Sakuraba, H. (2016). Structural Basis of Mucopolysaccharidosis Type II and Construction of a Database of Mutant Iduronate 2-Sulfatases. *Plos One*, 11(10).
- Sawaf, S. A., Mayatepek, E., Hoffmann, B. (2008). Neurological findings in Hunter disease: Pathology and possible therapeutic effects reviewed. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 31(4), 473-480.
- Seger, C. (2012). Usage and limitations of liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in clinical routine laboratories. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 162(21-22), 499-504.
- Shapiro, E. G., Jones, S. A., Escolar, M. L. (2017). Developmental and behavioral aspects of mucopolysaccharidoses with brain manifestations — Neurological signs and symptoms. *Molecular Genetics and Metabolism*, 122, 1-7.
- Sigal, G., Segal, M., Mathew, A., Jarlsberg, L., Wang, M., Barbero, S., Small, N., Haynesworth, K., Davis, J., Weiner, M., Whitworth, W., Jacobs, J., Schorey, J., Lewinsohn, D., Nahid, P. (2017). Biomarkers of Tuberculosis Severity and Treatment Effect: A Directed Screen of 70 Host Markers in a Randomized Clinical Trial. *EBioMedicine*, 25, 112-121.
- Silva, E. M., Silva, E. M., Strufaldi, M. W., Andriolo, R. B., Silva, L. A. (2011). Enzyme replacement therapy with idursulfase for mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 11, CD008185.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Dolan, J. W. (2010). Introduction to modern liquid chromatography. Oxford: *Wiley-Blackwell*.
- Solomon, M., Muro, S. (2017). Lysosomal enzyme replacement therapies: Historical development, clinical outcomes, and future perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 118, 109-134.
- Stapleton, M., Kubaski, F., Mason, R. W., Yabe, H., Suzuki, Y., Orii, K. E., Orii, T., Tomatsu, S. (2017). Presentation and treatments for mucopolysaccharidosis type II (MPS II; Hunter syndrome). *Expert Opinion on Orphan Drugs*, 5(4), 295-307.
- Staretz-Chacham, O., Lang, T. C., Lamarca, M. E., Krasnewich, D., Sidransky, E. (2009). Lysosomal Storage Disorders in the Newborn. *Pediatrics*, 123(4), 1191-1207.
- Stewart, D., Dhungana, S., Clark, R., Pathmasiri, W., Mcritchie, S., Sumner, S. (2015). Omics Technologies Used in Systems Biology. *Systems Biology in Toxicology and Environmental Health*, 57-83.

Strimbu, K., Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(6), 463-466.

Sugahara, K. (2003). Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Current Opinion in Structural Biology*, 13(5), 612-620.

Sukegawa-Hayasaka, K., Kato, Z., Nakamura, H., Tomatsu, S., Fukao, T., Kuwata, K., Orii T., Kondo, N. (2006). Effect of Hunter disease (mucopolysaccharidosis type II) mutations on molecular phenotypes of iduronate-2-sulfatase: Enzymatic activity, protein processing and structural analysis. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 29(6), 755-761.

Tajima, G., Sakura, N., Kosuga, M., Okuyama, T., Kobayashi, M. (2013). Effects of idursulfase enzyme replacement therapy for Mucopolysaccharidosis type II when started in early infancy: Comparison in two siblings. *Molecular Genetics and Metabolism*, 108(3), 172-177.

Tan, A., Boudreau, N., Lévesque, A. (2012). Internal Standards for Quantitative LC-MS Bioanalysis. *LC-MS in Drug Bioanalysis*, 1-32.

Thomson J.J (1899) LVIII. On the masses of the ions in gases at low pressures. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 48(295), 547-567.

Tomatsu, S., Shimada, T., Montaña, A. M., Mason, R. W. (2014). Newborn screening and diagnosis of mucopolysaccharidoses. *Molecular Genetics and Metabolism*, 111(2), 42-53.

Trim, P. J., Hopwood, J. J., Snel, M. F. (2015). Butanolysis derivatization: Improved sensitivity in LC-MS/MS quantitation of heparan sulfate in urine from mucopolysaccharidosis patients. *Analytical Chemistry*, 87(18), 9243-9250.

Tylki-Szymańska A. (2014). Mucopolysaccharidosis type II, Hunter's syndrome. *Pediatric Endocrinology Review*, 12(Suppl 1), 107-113.

Valayannopoulos V., Wijburg F. A. (2011). Therapy for the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology*, 50(Suppl 5), 49-59.

U.S Food & Drug Administration. (2006). Drug approval package: Elaprase (Indursulfase) Injection. www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2006/125151s0000_ElapraseTOC.cfm

Viola, M., Douglas, T. E., Alaniz, L., Bartolini, B. (2012). Glycosaminoglycans Metabolism. *Biochemistry Research International*, 2012, 245792.

Vollebregt, A. A., Hoogeveen-Westerveld, M., Kroos, M. A., Oussoren, E., Plug, I., Ruijter, G. J., Ploeg, A. T., Pijnappel, W. W. (2017). Genotype-phenotype relationship in mucopolysaccharidosis II: Predictive power of IDS variants for the neuronopathic phenotype. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 59(10), 1063-1070.

- Volpi, N., Linhardt, R. J. (2010). High-performance liquid chromatography-mass spectrometry for mapping and sequencing glycosaminoglycan-derived oligosaccharides. *Nature Protocols*, 5(6), 993-1004.
- Whiteman, D., Kimura, A. (2017). Development of idursulfase therapy for mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): the past, the present and the future. *Development and Therapy*, 11, 2467-2480.
- Wilkerson, M. J., Lewis, D. C., Marks, S. L., Prieur, D. J. (1998). Clinical and morphologic features of mucopolysaccharidosis type II in a dog: Naturally occurring model of Hunter syndrome. *Veterinary Pathology*, 35(3), 230-233.
- Winchester, B. (2012). Classification of Lysosomal Storage Diseases. *Lysosomal Storage Disorders*, 37-46.
- Wraith, J. E., Scarpa, M., Beck, M., Bodamer, O. A., Meirleir, L. D., Guffon, N., Lund, A. M., Malm, G., Ploeg, A. T., Zeman, J. (2008). Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): A clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy. *European Journal of Pediatrics*, 167(3), 267-277.
- Wraith, J. E., Clarke, L. A., Beck, M., Kolodny, E. H., Pastores, G. M., Muenzer, J., Rapoport, D. M., Berger, K. I., Swiedler, S. J., Kakkis, E. D., Braakman, T., Chadbourne, E., Walton-Bowen, K., Cox, G. F. (2004). Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, multinational study of recombinant human α -L-iduronidase (laronidase). *The Journal of Pediatrics*, 144(5), 581-588.
- Zheng, C., Levenston, M. (2015). Fact versus artifact: Avoiding erroneous estimates of sulfated glycosaminoglycan content using the dimethylmethylene blue colorimetric assay for tissue-engineered constructs. *European Cells and Materials*, 29, 224-236