

Ch.U.S 370

Université de Sherbrooke

**Association entre le génotype et l'excrétion du globotriaosylcéramide chez
les patients atteints de la maladie de Fabry
et la gestion de biobanques dans la recherche en génétique humaine**

par

Christiane Auray-Blais

Service de génétique, Département de Pédiatrie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé

En vue de l'obtention du grade de

Philosophiae doctor (Ph.D.) en radiobiologie

Mai 2007

“Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow. The important thing is not to stop questioning”.

Albert Einstein
(Prix Nobel de physique 1921)

“Il n’y a pas de véritable action sans volonté”.

Jean-Jacques Rousseau

À Jean-François, Jean-Christian et Catherine-Marie,

À Edna, ma mère et Sarto, mon père,

À Michel, Louise, Hélène, Paul et Paul-André

Table des matières

Liste des figures	iv
Liste des tableaux	vii
Liste des abréviations	viii
Résumé	x
Chapitre I - Introduction	1
I.1 Maladies de surcharge	1
I.1.1 Aspect général et historique	1
I.1.2 Classifications : traditionnelle et moléculaire	2
I.1.3 Présentation clinique	7
I.1.4 Lysosome	9
I.1.5 Troubles moléculaires des maladies de surcharge	11
I.2 Maladie de Fabry	13
I.2.1 Présentation générale	13
I.2.2 Hémizygotés et hétérozygotés	15
I.2.3 Incidence	16
I.2.4 Traitement	17
I.2.5 Voies biochimiques et l'étude de biomarqueurs	19
I.2.6 Génétique moléculaire	24
I.2.7 Mutations	25
I.3 Spectrométrie de masse	28
I.3.1 Historique	28
I.3.2 Principes de base, composantes d'un spectromètre de masse	30

I.3.3	Électronébulisation.....	31
I.3.4	Rapport masse/charge	35
I.3.5	Analyseurs de masse	36
I.3.6	Applications de la spectrométrie de masse en tandem.....	38
1.4	Problématique de la recherche impliquant des biobanques	42
I.4.1	Principes éthiques de la recherche avec l’humain.....	42
I.4.2	Biobanques : définition, importance en génétique	44
I.4.3	Gestion des échantillons faisant partie d’une biobanque	46
I.4.4	Aspect éducationnel à propos des biobanques	47
1.5	Projet de recherche : Objectifs de chaque chapitre	48
I.5.1	Chapitre II – Premier article.....	48
I.5.2	Chapitre III – Deuxième article.....	49
I.5.3	Chapitre IV – Troisième article.....	49
I.5.4	Chapitre V – Quatrième article	50
I.5.5	Chapitre VI – Cinquième article	51
	Chapitre II - Premier Article	53
	Development of a filter paper method potentially applicable to mass and high-risk urinary screenings for Fabry disease	53
	Chapitre III - Deuxième Article	77
	Quebec Neonatal Mass Urinary Screening Programme: from micromolecules to macromolecules.....	77
	Chapitre IV - Troisième Article	99
	Urinary globotriaosylceramide excretion correlates with the genotype in children and adults with Fabry disease.....	99

Chapitre V - Quatrième Article	140
A biobank management model applicable to biomedical research.	140
Chapitre VI - Cinquième Article	173
Biobanking Primer: Down to basics.....	173
Chapitre VII - Discussion générale	179
Chapitre VIII - Conclusion	192
Références	195
Remerciements	216

Liste des figures

- Figure I.1 Aspects cliniques de la maladie de Fabry. a) et b) Angiokératomes; c) Hypertrophie ventriculaire; d) Opacité cornéenne (Photos Dr RJ Desnick). 8
- Figure I.2 Microphotographie électronique de lysosomes (www.jdaross.mcmail.com/lysosome.htm) 9
- Figure I.3 Représentation schématique des différentes voies du processus d'endocytose d'organites et de leurs interrelations dans une cellule non spécialisée. TR = récepteur transferrine; LDL = "low density lipoprotein"; lipides = •; RE = réticulum endoplasmique; M6P = mannose-6-phosphate (Adaptée de Platt et Walkley, 2004, p. 5). 11
- Figure I.4 Illustration schématique d'un neurone et des troubles moléculaires possibles menant à une maladie lysosomale dans le système endosome/lysosome. LE = late endosome (endosome tardif); LY = lysosome; EE = early endosome (endosome précoce); RE = recycling endosome (endosome de recyclage); LE-LY = compartiment « late endosome-lysosome » (endosome tardif-lysosome); ER = endoplasmic reticulum (réticulum endoplasmique); SB = storage bodies (substrat accumulé). (D'après Platt et Walkley, 2004, p. 101). 13
- Figure I.5 Représentation schématique du chromosome X humain en bandes G, situant à la position Xq22.1 le gène *GLA* pour la maladie de Fabry et les 7 exons du gène (Tse et al., 2003). 14
- Figure I.6 Présence de dépôts de glycosphingolipides, Gb₃, dans les cellules épithéliales rénales (partie A). Les flèches indiquent la présence de Gb₃. Le même patient

	11 mois après un traitement avec la thérapie d'enzyme de remplacement (partie B) (Thurberg et al., 2002).	15
Figure I.7	Structure chimique de la molécule de Gb ₃ , un glycosphingolipide.....	21
Figure I.8	Catabolisme lysosomal de certains glycosphingolipides. (Adapté de Platt et Walkley, 2004, p. 88).	23
Figure I.9	En (a) : structure du monomère α -GAL présentant les terminaisons N en bleu et C en rouge. Le domaine 1 contient le site actif au centre des brins β . Le domaine 2 contient les brins β antiparallèles, avec le ligand galactose en jaune. En (b) et (c) : deux représentations du dimère α -GAL, avec les mêmes identifications colorées que celles vues en (a), où les sites actifs sont séparés de 50 Å. En (d) : deux visualisations de la surface du α -GAL où les hydrates de carbone liés en N sont en vert. Les degrés de rotation des molécules sont aussi indiqués (Figure tirée de la publication de Garman et Garboczi, 2004).	25
Figure I.10	Mutations ponctuelles de la maladie de Fabry sur la protéine dimérique α -Gal. En rouge: mutations qui perturbent directement le site actif; en bleu: mutations au niveau des résidus enfouis dans le modèle; en vert: mutations qui n'entrent pas dans les deux catégories précédentes; en jaune: ligand galactose (Garman et Garboczi, 2004).	26
Figure I.11	Joseph John Thomson (1856-1940) a conçu le 1 ^{er} spectromètre de masse.	28
Figure I.12	Électronébulisation telle que rapportée par J. Zeleny en 1917.....	29
Figure I.13	Diagramme d'un spectromètre de masse. (Adapté de Kinter and Sherman, 2000).....	31
Figure I.14	Production de gouttelettes chargées à partir du capillaire.	32

Figure I.15	Formation du cône Taylor à partir de gouttelettes d'échantillon. (Adapté de P. Kebarle, 2000).....	33
Figure I.16	Modèle montrant la formation du cône Taylor lors de l'électronébulisation: a) modèle théorique; b) effet de la décharge de courant sur les gouttelettes; c) et d) formation du cône Taylor.....	34
Figure I.17	Spectre de masse d'une molécule de 8 000 Da.	36
Figure I.18	Sélection spécifique du rapport m/z de 100 dans le quadripôle.	37
Figure I.19	Coupe schématique d'un analyseur de masse, le quadripôle.	37
Figure I.20	Coupe schématique d'un spectromètre de masse en tandem présentant deux quadripôles séparés par un hexapôle.	38
Figure VII.1	Modèle interactionnel des différents intervenants impliqués dans la recherche en génétique utilisant des biobanques.....	191

Liste des tableaux

Tableau I.1	Classification traditionnelle des maladies de surcharge (Adaptée de Platt et Walkley, 2004, p. 35).	3
Tableau I.2	Classification des maladies de surcharge selon leur trouble moléculaire (Adaptée de Platt et Walkley, 2004, p. 41)	6
Tableau I.3	Variabilité de l'incidence de la maladie de Fabry à travers le monde.	17
Tableau I.4	Différents mécanismes d'ionisation moléculaire.	35
Tableau I.5	Quatre modes opérationnels d'un spectromètre de masse utilisant un triple quadripôle.	39
Tableau VII.1	Personnes d'une même famille ayant la mutation D136Y du gène <i>GLA</i> pour la maladie de Fabry.	186

Liste des abréviations

C.c.Q.	Code civil du Québec
CÉR	Comité d'éthique de la recherche sur l'humain
CDH	Digalactosylcéramide
CTH	Céramide trihexoside
Créat.	Créatinine
Da	Dalton
EE	"Early endosome" (endosome précoce)
ESI +	"Positive Electrospray Ionization" (ionisation par électronébulisation positive)
ESI -	"Negative Electrospray Ionization" (ionisation par électronébulisation négative)
kV	Kilovolts
α -gal	α -galactosidase A
Ga ₂	Galabiosylcéramide
Gb ₃ ou GL-3	Globotriaosylcéramide
GSL	Glycosphingolipides
HDL	"High density lipoprotein" (lipoprotéine de haute densité)
HPLC	"High performance liquid chromatography" (chromatographie liquide en haute pression)
LC-MS/MS	Chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem
LDL	"Low density lipoprotein" (lipoprotéine de faible densité)

LE	"Late endosome" (endosome tardif)
M6P	Mannose-6-phosphate
MRM	Multiple reaction monitoring (monitoring de réactions multiples)
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
m/z	Rapport masse sur la charge d'un ion
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
RE	"Recycling endosome" (endosome de recyclage)
TOF	Time-of-flight (temps de vol)
TR	Transferrine
TER	Thérapie d'enzyme de remplacement

Résumé

Les maladies de surcharge aussi appelées maladies lysosomales (ML) comprennent plus de 50 maladies métaboliques héréditaires différentes caractérisées par l'accumulation de macromolécules non métabolisées dans les lysosomes de différents tissus, organes et fluides biologiques. La thérapie enzymatique de remplacement, tout en offrant une amorce possible de solution, nécessite l'élaboration d'une procédure pour le suivi du traitement et de l'évolution de la maladie. La maladie de Fabry est une maladie métabolique héréditaire liée au chromosome X et est causée par un déficit de l'enzyme l' α -galactosidase A. Plus de 350 mutations ont été répertoriées chez les patients atteints. L'incidence de la maladie de Fabry est variable à travers le monde : entre 1:3 100 en Italie à 1:833 000 au Portugal, avec une moyenne évaluée à 1:40 000. Les hommes hémizygotés présentent une expression clinique très variable et sont souvent atteints plus sévèrement que les femmes hétérozygotes, qui peuvent aussi manifester des symptômes. Un biomarqueur est excrété de façon prédominante dans l'urine de ces patients, le globotriaosylcéramide (Gb₃), un glycosphingolipide qui provient des cellules épithéliales rénales. Plusieurs interrogations subsistent en ce qui a trait aux corrélations phénotype-génotype des adultes et des enfants atteints de la maladie de Fabry. Existe-t-il une corrélation entre l'excrétion urinaire du Gb₃ et les différents types de mutations des patients atteints? Existe-t-il une corrélation entre l'excrétion urinaire du Gb₃ et le sexe du patient ou l'âge de ce dernier? Quelle est la corrélation entre le niveau d'excrétion du Gb₃ et le traitement par thérapie enzymatique de remplacement? Comment peut-on instaurer une étude de faisabilité visant à évaluer

le Gb₃ urinaire dans une population donnée afin d'y établir l'incidence? De plus, ces questions soulèvent des problématiques d'ordre éthique. Comment assurer la protection de l'intégrité des sujets qui participent à un projet de recherche où des biobanques sont créées? Comment assurer le respect de la confidentialité des données et la protection des renseignements personnels des sujets participant à une étude avec une biobanque? Comment assurer la gestion des prélèvements biologiques et ce, pour une période de temps souvent indéfinie? Comment s'assurer du respect du consentement éclairé du sujet? Comment contacter le sujet participant, advenant une découverte d'utilité clinique majeure, tout en respectant la confidentialité? Comment assurer une participation informée des sujets participant à des projets de recherche avec des biobanques?

Afin de répondre aux premières interrogations, nous avons entrepris l'élaboration d'une méthode d'analyse du biomarqueur Gb₃ dans l'urine déposée sur papier filtre de patients hémizygotés et hétérozygotés atteints de la maladie de Fabry, en utilisant la spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie en phase liquide. Suite au développement et à la validation de cette méthodologie, nous l'avons raffinée et améliorée de façon à pouvoir analyser simultanément le Gb₃ et la créatinine (multiplex) à l'intérieur d'un temps plus court, soit en 2.6 minutes. Le dosage de la créatinine permet de normaliser les valeurs obtenues du Gb₃. Cette méthodologie répond à plusieurs impératifs cliniques : permettre un dépistage à haut risque de la maladie de Fabry et assurer le suivi et le monitoring des patients atteints qui sont sous thérapie enzymatique de remplacement. Nous répondons aussi à la question concernant l'étude de faisabilité d'analyse du Gb₃ sur l'ensemble d'une population donnée. Aussi, l'établissement

d'un diagnostic précoce avant l'apparition de troubles cliniques irréversibles est potentiellement important pour le patient et permet d'offrir un conseil génétique.

Des corrélations phénotype-génotype hautement significatives ont pu être établies avec les taux d'excrétion du Gb₃, à savoir que l'excrétion du Gb₃ urinaire est en corrélation directe avec les types de mutations à l'étude, le sexe du patient et le traitement. Par contre, il n'y a pas de corrélation significative entre l'âge du patient et l'excrétion du Gb₃. Nous avons pu constater que certaines mutations non-sens provoquent une excrétion plus forte du Gb₃ urinaire que d'autres types de mutations. Aussi, par les différences des moyennes des moindres carrés, nous avons trouvé une corrélation significative au niveau de l'excrétion urinaire du Gb₃ et des mutations faux-sens et non-sens, de même qu'au niveau des mutations non-sens et des mutations de jonctions d'épissage. Aucune différence significative n'a été relevée entre deux groupes de patients avec la même mutation faux-sens, l'un provenant d'une région de la Nouvelle-Écosse où il subsiste un effet fondateur et l'autre issu de plusieurs régions à travers le monde.

En réponse aux interrogations d'ordre éthique, nous avons élaboré un modèle de gestion des biobanques dans la recherche institutionnelle qui répond à toutes les questions soulevées précédemment et assure donc la protection du sujet participant et la confidentialité des informations génétiques correspondantes. Compte tenu de la complexité et des conséquences de tout projet de recherche impliquant des biobanques, nous avons élaboré un processus de formation continue sur le thème des bonnes pratiques éthiques applicables aux biobanques. Ce processus implique l'investigateur principal, le personnel de recherche, le comité

d'éthique et l'institution qui travaillent en synergie en vue d'assurer une participation informée du sujet.

Chapitre I - Introduction

I.1 Maladies de surcharge

I.1.1 Aspect général et historique

Les maladies de surcharge aussi appelées maladies lysosomales (ML) comprennent plus de 50 maladies métaboliques héréditaires différentes qui sont pour la plupart transmises selon un mode autosomique récessif. Seulement trois d'entre elles sont liées au chromosome X : la maladie de Fabry, la maladie de Hunter (ou mucopolysaccharidose de type II) et la maladie de Danon (Desnick et al., 2003). L'incidence de chacune des ML est faible, mais lorsque prise globalement, elle est élevée à 1:7 700 (Meikle et al., 1999). Ce chiffre sous-estime probablement la véritable incidence, l'expression clinique de ces maladies, dont la maladie de Fabry, étant variable.

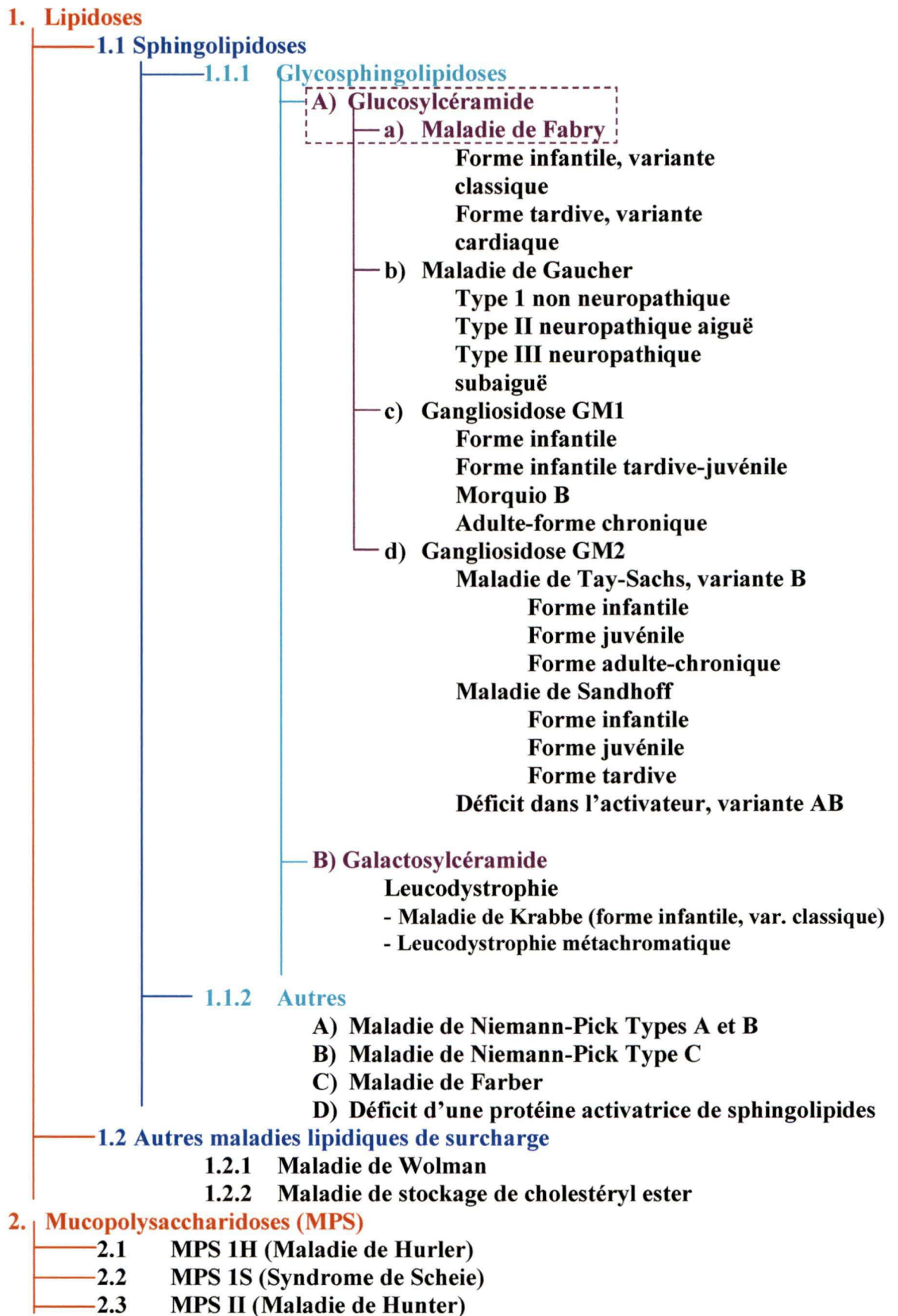
La description de patients présentant des symptômes cliniques de maladies de surcharge remonte aux années 1820 (Stengel, 1826). Mais ce n'est que vers la fin du 19^e siècle et le début du 20^e siècle qu'il fut possible, grâce à une accumulation d'évidences cliniques et pathologiques, de reconnaître l'existence d'un groupe individuel de maladies, telles les maladies de Gaucher, de Niemann-Pick et de Tay-Sachs (Platt et Walkley, 2004). En fait, Tay rapporta la caractéristique ophtalmologique particulière de la tache rouge cerise ("cherry red spot") chez un patient (Tay, 1881), tandis que Sachs publia une description plus raffinée de la présentation clinique d'un patient aveugle et souffrant de retard mental (Sachs, 1903). Plusieurs caractéristiques typiques de la plupart des ML se précisaient : une situation clinique normale en bas âge et une évolution vers des changements pathologiques au niveau du cerveau et de certains organes au fil du temps. Christian

de Duve, récipiendaire du Prix Nobel de Médecine en 1974, a été le premier à attribuer et à publier le mot « lysosome », qui provient du grec et qui signifie « corpuscule digestif » (de Duve 1955, 2005). Une recherche importante en 1963 a permis de découvrir qu'un déficit enzymatique en α -glucosidase acide était à l'origine de la glycogénose de type II (Hers, 1963), ce qui illustre le rôle pathogénique des déficits enzymatiques pour l'ensemble des maladies de surcharge.

I.1.2 Classifications : traditionnelle et moléculaire

Deux classifications intéressantes (Platt et Walkley, 2004) permettent de mieux comprendre les maladies de surcharge : la première, dite traditionnelle, est basée sur l'accumulation de métabolites de nature diverse dans les lysosomes; selon cette classification, nous obtenons 7 classes différentes : les lipidoses, les mucopolysaccharidoses, les glycogénoses, les mucolipidoses, les glycoprotéinoses, les céroïdes lipofuscinoses et les autres qui sont non catégorisées. Si nous regardons de plus près la classe des lipidoses, nous constatons qu'elles sont subdivisées en sphingolipidoses et en d'autres maladies de surcharge. Les sphingolipidoses se divisent à leur tour en deux groupes majeurs : les sphingolipidoses glycosylées (glycosphingolipidoses) et non glycosylées. Les glycosphingolipidoses se divisent encore en deux classes selon que le premier sucre est un glucose, le glucosylcéramide, ou un galactose, le galactosylcéramide. La maladie de Fabry, qui fait l'objet de cette thèse, est un glucosylcéramide (voir le Tableau I.1).

Tableau I.1 Classification traditionnelle des maladies de surcharge (Adapté de Platt et Walkley, 2004, p. 35)



- 2.4 MPS IIIA (Syndrome de Sanfilippo A)
- 2.5 MPS IIIB (Syndrome de Sanfilippo B)
- 2.6 MPS IIIC (Syndrome de Sanfilippo C)
- 2.7 MPS IIID (Syndrome de Sanfilippo D)
- 2.8 MPS IVA (Maladie de Morquio A)
- 2.9 MPS IVB (Maladie de Morquio B)
- 2.10 MPS VI (Syndrome Maroteaux-Lamy)
- 2.11 MPS VII (Syndrome de Sly)
- 2.12 MPS IX (Déficit en hyaluronidase)

3. Glycogénoses

- 3.1 Maladie de Pompe (Type II)
- 3.2 Maladie de Danon

4. Glycoprotéinoses

- 4.1 Aspartylglucosaminurie
- 4.2 Fucosidose
- 4.3 Galactosialidose
- 4.4 α -Mannosidose
- 4.5 β -Mannosidose
- 4.6 Maladie de Schindler
- 4.7 Sialidose

5. Céroïde lipofuscinose neuronale

- 5.1 Forme infantile (CLN1)
- 5.2 Forme infantile tardive (CLN2)
- 5.3 Forme juvénile (CLN3)
- 5.4 Forme adulte (CLN4)
- 5.5 Autres (CLN5, CLN6, CLN7, CLN8)

6. Mucopolidoses

- 6.1 Mucopolidose Type II (Maladie de I-cell)
- 6.2 N-Acétylglucosamine
- 6.3 Mucopolidose Type IIIA
- 6.4 Déf. N-acétylglucosamine phosphoryltransférase
- 6.5 Mucopolidose Type IIIC
- 6.6 Mucopolidose Type IV

7. Autres

- 7.1 Cystinose
- 7.2 Maladie infantile de stockage de l'acide sialique libre
- 7.3 Maladie de Salla
- 7.4 Mucosulphatidose

La deuxième classification porte sur le défaut moléculaire menant à l'accumulation de substrats; selon cette classification, nous retrouvons les déficits primaires en hydrolase avec 33 maladies, les troubles post-traductionnels des enzymes lysosomales, les troubles de transport des enzymes lysosomales, les troubles de protection des enzymes, les troubles des protéines lysosomales solubles non enzymatiques, les troubles de transport des protéines transmembranaires et une catégorie pour les céroïdes lipofuscinoses (voir le Tableau I.2).

Au sein de cette classification, la maladie de Fabry se retrouve dans la catégorie des déficits en hydrolase. Une cinquantaine de maladies de surcharge ont été décrites à ce jour. Il est à noter que ce tableau est en constante évolution puisque de nouvelles maladies de surcharge sont répertoriées au fil du temps.

Tableau I.2 Classification des maladies de surcharge selon leur trouble moléculaire
(Adapté de Platt et Walkley, 2004, p. 41).

1. Déficit primaire en hydrolase

- 1.1 **Maladie de Fabry**
- 1.2 Maladie de Gaucher
- 1.3 Gangliosidose GM1
- 1.4 Maladie de Tay-Sachs
- 1.5 Maladie de Sandhoff
- 1.6 Maladie de Krabbe
- 1.7 Maladie de Niemann-Pick, Type A
- 1.8 Leucodystrophie métachromatique
- 1.9 MPS 1H (Maladie de Hurler)
- 1.10 MPS 1S (Syndrome de Scheie)
- 1.11 MPS II (Maladie de Hunter)
- 1.12 MPS IIIA (Syndrome de Sanfilippo A)
- 1.13 MPS IIIB (Syndrome de Sanfilippo B)
- 1.14 MPS IIIC (Syndrome de Sanfilippo C)
- 1.15 MPS IIID (Syndrome de Sanfilippo D)
- 1.16 MPS IVA (Maladie de Morquio A)
- 1.17 MPS IVB (Maladie de Morquio B)
- 1.18 MPS V (redéfinie MPS 1S)
- 1.19 MPS VI (Syndrome Maroteaux-Lamy)
- 1.20 MPS VII (Syndrome de Sly)
- 1.21 MPS IX (Déficit en hyaluronidase)
- 1.22 Maladie de Wolman
- 1.23 Maladie de Farber
- 1.24 Maladie de stockage du cholestéryl ester
- 1.25 Maladie de Pompe, Type II
- 1.26 Aspartylglucosaminurie
- 1.27 Fucosidose
- 1.28 α -Mannosidose
- 1.29 β -Mannosidose
- 1.30 Maladie de Schindler
- 1.31 Sialidose
- 1.32 Céroïde lipofuscinose neuronale infantile (CLN1)
- 1.33 Céroïde lipofuscinose neuronale infantile tardive (CLN2)

2. Troubles post-traductionnels des enzymes lysosomales

- Mucosulfatidose

3. Troubles de transport des enzymes lysosomales

- 3.1 Mucolipidose Type II
- 3.2 Mucolipidose Type IIIA
- 3.3 Mucolipidose Type IIIC

4. Troubles de protection de l'enzyme lysosomale

- └ Galactosialidose

5. Troubles de protéines lysosomales solubles non enzymatiques

- └ 5.1 Niemann-Pick Type C, NPC2
- └ 5.2 Déficit en protéine activatrice GM2, variante AB
- └ 5.3 Déficit en protéine activatrice de sphingolipides
- └ 5.4 Céroïde lipofuscinose neuronale (CNL5)

6. Troubles de transport des protéines transmembranaires non enzymatiques

- └ 6.1 Maladie de Danon
- └ 6.2 Niemann-Pick Type C, NPC1
- └ 6.3 Cystinose
- └ 6.4 Maladie infantile de stockage de l'acide sialique libre
- └ 6.5 Céroïde lipofuscinose neuronale juvénile (CLN3)
- └ 6.6 Céroïde lipofuscinose neuronale (CNL6 et CLN8)
- └ 6.7 Mucopolidose Type IV

7. Non classifiées

- └ Céroïde lipofuscinose neuronale (CNL4 et CLN7)

I.1.3 Présentation clinique

Les maladies de surcharge ou maladies lysosomales (ML) présentent une variabilité phénotypique marquée, puisque la plupart des ML se retrouvent sous les formes infantile, juvénile et adulte (Futerman et van Meer, 2004). De fait, les manifestations cliniques des ML peuvent se présenter durant la période néonatale ou durant la vie adulte, tel qu'observé chez des patients qui présentent un même déficit enzymatique mais dû à des mutations distinctes (Platt et Walkley, 2004; Wraith, 2004). Ceci renforce la grande hétérogénéité des symptômes cliniques des ML. D'ailleurs, les signes et les symptômes cliniques généralement retrouvés chez des patients atteints de ML sont nombreux : le dysmorphisme, la dysostose multiple (qui se manifeste entre autres par une dysplasie squelettique généralisée ou des

fractures pathologiques); l'hépatosplénomégalie, les manifestations du système nerveux central (comme la macrocéphalie, l'ataxie, les convulsions, les problèmes cognitifs); des pertes sensorielles (telles l'opacité cornéenne, les cataractes, la cécité, la surdité) et les problèmes d'apprentissage; la cardiomyopathie et en particulier la cardiomégalie et l'insuffisance cardiaque menant au décès dans l'enfance; les troubles rénaux (telles une dysfonction rénale progressive, l'insuffisance rénale, une sclérose glomérulaire); et des manifestations cutanées (tels les angiokératomes) (Platt et Walkley, 2004). Quoique l'étendue et la sévérité des ML dépendent principalement du type et de la quantité de substrat accumulé, il est par contre établi que presque toutes les ML sont de nature évolutive, avec une progression constante de la maladie (Wilcox, 2004). Plusieurs patients avec des ML meurent au cours de la petite enfance et de l'enfance. Les patients adultes ont quant à eux une diminution de l'espérance de vie et une morbidité sévère (Wilcox, 2004). La Figure I.1 illustre la variabilité des manifestations cliniques retrouvées chez les patients atteints de la maladie de Fabry.

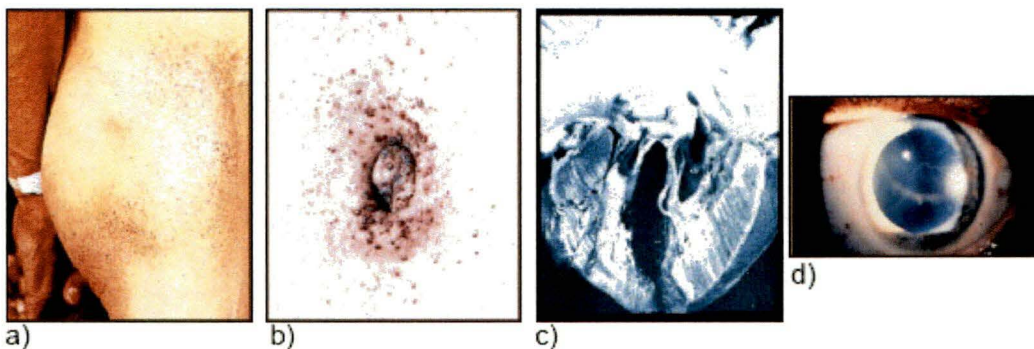


Figure I.1 Aspects cliniques de la maladie de Fabry. a) et b) Angiokératomes; c) Hypertrophie ventriculaire; d) Opacité cornéenne (Photos Dr RJ Desnick).

I.1.4 Lysosome

Les lysosomes (Figure I.2) sont des organites subcellulaires qui se présentent comme des vésicules de forme, de nombre et de dimensions variables (de 0.5 à 2 μm), telles des structures multilamellaires ou de longs tubules comme ceux des macrophages (Platt et Walkley, 2004). Ils se retrouvent dans toutes les cellules des mammifères, à l'exception des globules rouges. Ils contiennent plus de 50 enzymes, les hydrolases telles les phosphatases, les nucléases, les glycosidases, les protéases, les peptidases, les sulphatases et les lipases, où celles-ci assurent la dégradation intracellulaire de macromolécules de la cellule. Ces hydrolases fonctionnent selon une activité optimale à un pH entre 5 et 5.5, grâce à une pompe à protons ATP-dépendante qui est située dans la membrane lysosomale (Winchester, 2001; Futerman et van Meer, 2004). La paroi membranaire du lysosome est recouverte d'une couche luminale glucidique servant à la protéger des nombreuses hydrolases acides.

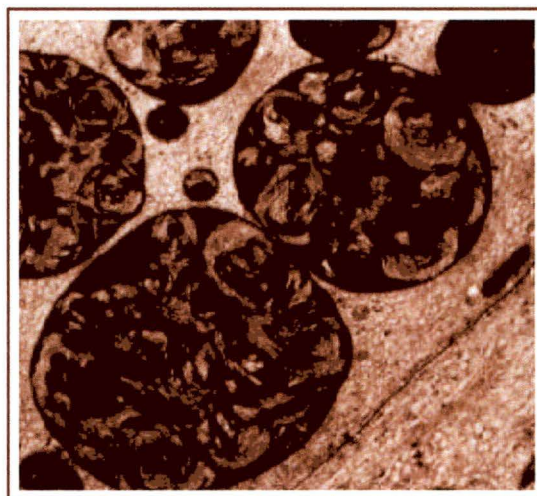


Figure 1.2 Microphotographie électronique de lysosomes
(www.jdaross.mcmail.com/lysosome.htm)

Le processus d'endocytose des organites est particulièrement dynamique et comprend différents « compartiments cellulaires » qui assurent une communication intracellulaire : les endosomes précoces, les endosomes tardifs, le recyclage, l'appareil trans-Golgien et le lysosome (voir la Figure I.3). Certaines voies intracellulaires, comme celles retrouvées au niveau des endosomes, représentent des éléments-clés dans la distribution des molécules : a) les endosomes précoces communiquent avec la membrane plasmique impliquant tout le processus d'internalisation des molécules qui doivent d'abord passer par cet endosome précoce avant d'atteindre l'endosome tardif; de plus, il y a le processus de recyclage des molécules, comme la transferrine et des ligands dégradés, tel le LDL; b) les endosomes tardifs ne contiennent pas de transferrine; ils contiennent plutôt les récepteurs mannose-6-phosphate (M6P) qui ne pénètrent pas dans le lysosome mais jouent un rôle crucial en se liant aux hydrolases acides solubles et en les transportant de l'appareil trans-Golgien vers le système endosome/lysosome. L'acidification des endosomes tardifs et des lysosomes facilite la dissociation des complexes ligands-M6P-récepteur et le processus protéolytique requis pour l'activation enzymatique de plusieurs hydrolases.

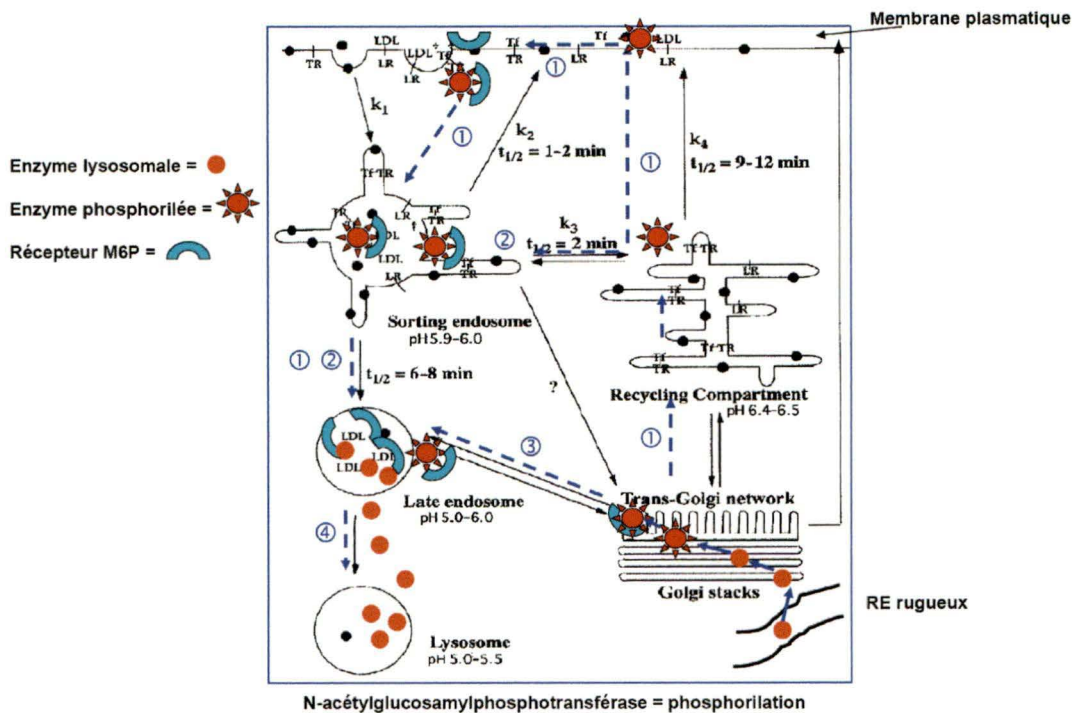


Figure I.3 Représentation schématique des différentes voies du processus d'endocytose d'organites et de leurs interrelations dans une cellule non spécialisée. TR = récepteur transferrine; LDL = "low density lipoprotein"; lipides = •; RE = réticulum endoplasmique; M6P = mannose-6-phosphate (Adaptée de Platt et Walkley, 2004, p. 5).

I.1.5 Troubles moléculaires des maladies de surcharge

Différents sites possibles pour expliquer les troubles moléculaires retrouvés au niveau des maladies de surcharge dans le système endosome/lysosome sont représentés à la Figure I.4. Les substances de stockage sont générées par l'accumulation de matériels dans les endosomes tardifs (LE), les lysosomes, le réticulum endoplasmique, la membrane cellulaire, le cytosol et même le noyau. Il existe d'ailleurs une interrelation entre ces deux compartiments (voir la flèche à deux sens) et les endosomes précoces (EE) et les endosomes de recyclage (RE). Les

troubles au niveau du compartiment endosome tardif et le lysosome influencent directement les enzymes lysosomales (voir 1 dans la Figure I.4), la protéine protectrice (voir 2 dans la Figure I.4), et les protéines activatrices (voir 3 dans la Figure I.4); un trouble dans le fonctionnement de l'enzyme au niveau du réticulum endoplasmique (voir 4 dans la Figure I.4) peut aussi survenir; ou certains enzymes sont fabriqués correctement, mais ne peuvent recevoir le mannose-6-phosphate lors de leur transit à travers l'appareil de Golgi (voir 5 dans la Figure I.4); les défauts de protéines transmembranaires qui mènent à un déplacement anormal du matériel dégradé, comme les gangliosides et le cholestérol en dehors du compartiment endosome tardif-lysosome (voir 6 dans la Figure I.4) peuvent être une autre cause menant à une ML; d'autres protéines transmembranaires peuvent faciliter l'endocytose (voir 7 dans la Figure I.4) ou le processus d'autophagie et de fusion des vésicules (voir 8 dans la Figure I.4).

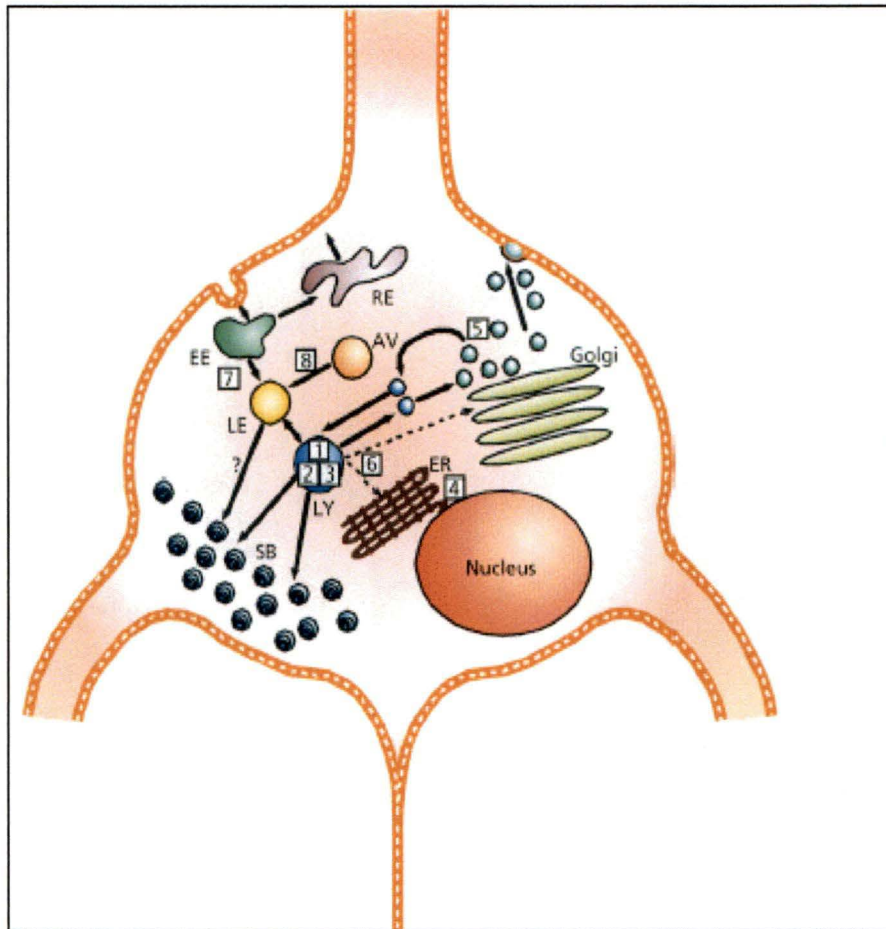


Figure I.4 Illustration schématique d'un neurone et des troubles moléculaires possibles menant à une maladie lysosomale dans le système endosome-lysosome. LE = late endosome (endosome tardif); LY = lysosome; EE = early endosome (endosome précoce); RE = recycling endosome (endosome de recyclage); LE-LY = compartiment « late endosome-lysosome » (endosome tardif-lysosome); ER = endoplasmic reticulum (réticulum endoplasmique); SB = storage bodies (substrat accumulé). (D'après Platt et Walkley, 2004, p. 101).

I.2 Maladie de Fabry

I.2.1 Présentation générale

La maladie de Fabry (OMIM 301500), parfois mentionnée sous le nom de maladie Anderson-Fabry en l'honneur des deux médecins qui l'ont observée chez leur patient à la fin du 19^e siècle (dont l'historique a été récemment rapporté par le neveu de Johannes Fabry) (Fabry, 2001), est une maladie de surcharge liée au

chromosome X, située sur le chromosome Xq22.1, (voir Figure I.5) (Tse et al., 2003) et causée par un déficit en une hydrolase, l'enzyme α -galactosidase A (EC 3.2.1.22).

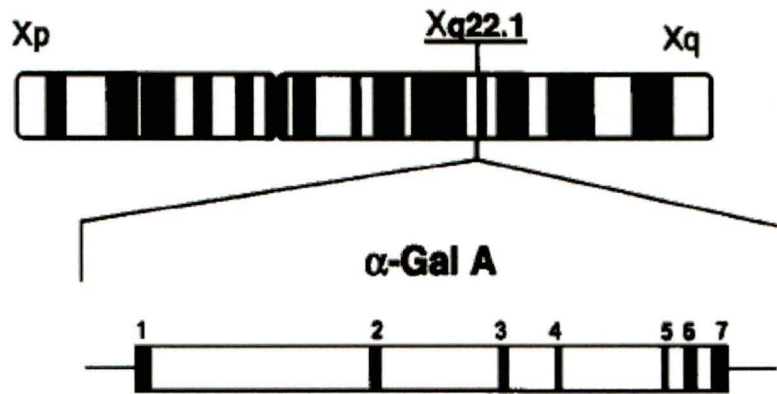


Figure I.5 Représentation schématique du chromosome X humain en bandes G, situant à la position Xq22.1 le gène *GLA* pour la maladie de Fabry et les 7 exons du gène (D'après Tse et al., 2003).

Ce déficit enzymatique engendre une accumulation de glycosphingolipides (GSL), tout particulièrement, et en plus grande abondance, le globotriaosylcéramide (Gb_3 ou GL-3) aussi appelé céramide trihexoside (CTH) (voir Figure I.6) dans les lysosomes de l'endothélium vasculaire, du muscle lisse, des cellules ganglionnaires et épithéliales. Le digalactosylcéramide (CDH) ou galabiosylcéramide (Ga_2) est aussi retrouvé, mais en quantité moindre (Branton et al., 2002). La Figure I.6 montre la différence observée au niveau des cellules épithéliales rénales pour un patient atteint de la maladie de Fabry qui a reçu la thérapie enzymatique de remplacement pendant 11 mois. Nous pouvons observer une diminution majeure de la présence de Gb_3 au niveau desdites cellules.

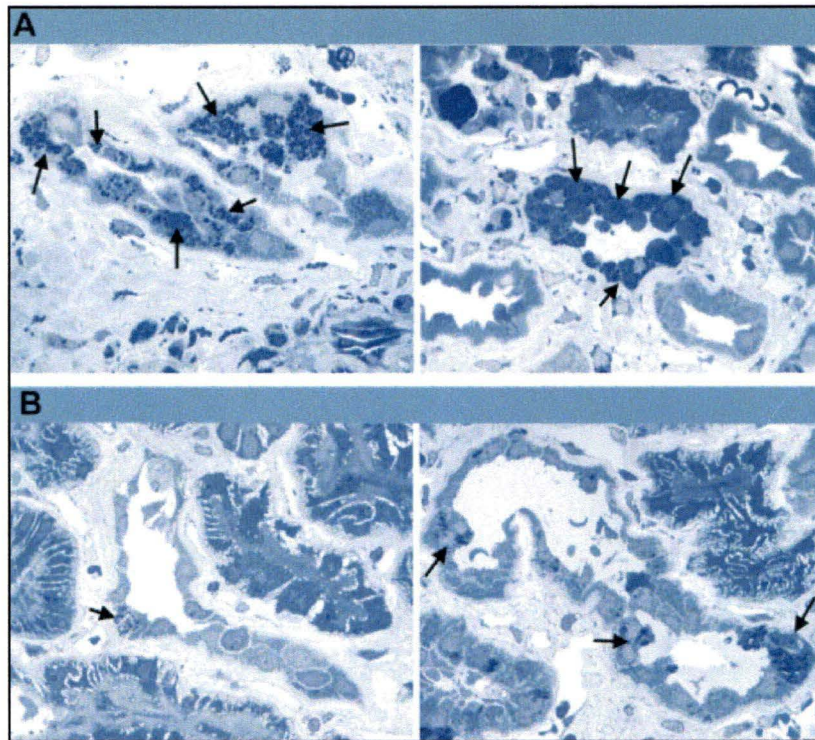


Figure I.6 Présence de dépôts de glycosphingolipides, Gb₃, dans les cellules épithéliales rénales (partie A). Les flèches indiquent la présence de Gb₃. Le même patient 11 mois après un traitement avec la thérapie d'enzyme de remplacement (partie B) (D'après Thurberg et al., 2002).

I.2.2 Hémizygotés et hétérozygotés

Même si la maladie de Fabry est une maladie liée au chromosome X, il n'en demeure pas moins que les femmes hétérozygotés sont symptomatiques dans une grande proportion (Gupta et al., 2005; Mehta et Widmer, 2006), soit près de 70% (Clarke, 2007). Les personnes qui souffrent de la maladie de Fabry présentent une panoplie de symptômes cliniques d'une grande hétérogénéité, soit entre autres, une neuropathie douloureuse (Luciano et al., 2002) qui se manifeste sous la forme d'acroparesthésies, des angiokératomes, une cardiomyopathie (Schiffmann et al., 2006a), des troubles cérébrovasculaires (Moore et al., 2002a; Moore et al., 2002b; Schiffmann et Ries, 2005), une opacité cornéenne, une insuffisance rénale (Branton

et al., 2002), des troubles gastrointestinaux et une hypohidrose (Schiffmann et al., 2006a; Clarke, 2007; Vedder et al., 2007). Les manifestations cliniques apparaissent habituellement au cours de l'enfance ou à l'adolescence, sous forme d'acroparesthésies, d'une hypohidrose et d'angiokératomes (Ries et al., 2005). À l'âge adulte, la maladie de surcharge atteint la microvascularisation, ce qui engendre des troubles cardiaques, neurologiques et cochléaires, de même qu'une insuffisance rénale chronique terminale. Chez les hommes hémizygotés atteints de la maladie de Fabry, l'espérance de vie est réduite d'approximativement 20 ans, alors qu'elle est réduite de 10 à 15 ans chez les femmes hétérozygotes (Mehta et Widmer, 2006). Il existe aussi plusieurs variantes atypiques de la maladie, où les seules manifestations sont d'origine cardiaque (Elleder et al., 1990; von Scheidt et al., 1991), ou rénale (Nakao et al., 2003). Il a été postulé que les patients présentant ces variantes cardiaque et rénale ont des mutations faux-sens qui engendrent une activité enzymatique résiduelle qui prévient l'apparition de symptômes dans l'enfance et chez les jeunes adultes (Mehta et Widmer, 2006).

I.2.3 Incidence

L'incidence de la maladie de Fabry est variable à travers le monde comme le démontre le Tableau I.3 (Meikle et al., 1999; Masson et al., 2004; Spada et al., 2006). Il existe en Nouvelle-Écosse un effet fondateur de la maladie de Fabry qui a récemment été rapporté (West et al., 2002), où 800 individus sur 14 générations, représentant 299 hétérozygotes et hémizygotés provenant d'Allemagne ont une mutation faux-sens (A143P) dans l'exon 3. La maladie de Fabry est par ailleurs fort probablement sous-diagnostiquée : ceci est attribuable à la grande hétérogénéité des

symptômes cliniques de la maladie. En effet, certains patients qui présentent des symptômes de sévérité moindre reçoivent une confirmation de leur diagnostic beaucoup plus tardivement (von Scheidt et al., 1991; Germain, 2005c; 2007a). Il a été récemment rapporté que du début des symptômes jusqu'à l'obtention d'un diagnostic exact chez des patients souffrant de la maladie de Fabry, un délai de 16.3 ans s'est avéré nécessaire pour les hommes et 13.7 ans pour les femmes (Mehta et al., 2004).

Tableau I.3 Variabilité de l'incidence de la maladie de Fabry à travers le monde.

Endroits	Incidence
Italie (nouveau-nés)	⇒ 1: 3 100
Nouvelle-Écosse	⇒ 1: 15 000
France	⇒ 1: 40 000
États-Unis	⇒ 1: 50 000
Australie	⇒ 1:117 000
Pays-Bas	⇒ 1:476 000
Portugal (Nord)	⇒ 1:833 000
Québec	⇒ inconnue (38patients/12 familles)

I.2.4 Traitement

Le traitement de la maladie de Fabry est possible grâce à une thérapie d'enzyme de remplacement (TER) qui est administrée par infusions aux patients (Schiffmann et al., 2001; Germain, 2002; Lee et al., 2003; Ries et al., 2006; Banikazemi et al., 2007; Clarke, 2007; Germain et al., 2007) (voir Figure I.6). Deux

produits d'infusion, qui sont des reproductions de l' α -galactosidase A humain, ont été développés : l'agalsidase alpha (Schiffmann et al., 2006b; Murray et al., 2007) et l'agalsidase beta, qui sont produits par différentes techniques de génie génétique à partir de lignées cellulaires (Brady et Schiffmann, 2004). L'agalsidase beta contient une plus grande quantité du récepteur mannose-6-phosphate qui est requis lors de l'utilisation cellulaire de l'enzyme administrée de façon exogène (Clarke, 2007). La TER représente une percée dans le traitement de cette maladie, puisqu'elle est associée à une diminution de la douleur neuropathique chez les hémizygotés atteints, de même qu'à une amélioration significative de la fonction nerveuse périphérique (Schiffmann et al., 2003). Un récent éditorial stipulait que l'effet de la TER était meilleur chez les patients qui étaient à un stade précoce de la détérioration rénale, suggérant donc que l'introduction de la TER au début de la maladie, chez des enfants par exemple, serait plus efficace que d'attendre que la fonction rénale commence à se détériorer (Schiffmann, 2007). Par ailleurs, cette proposition ne pourrait être vérifiée que par une étude de recherche clinique qui assignerait les enfants soit à une thérapie donnée immédiatement ou soit à une thérapie qui est donnée seulement lors de l'apparition des symptômes (Schiffmann, 2007). Ceci soulève des problèmes éthiques épineux. D'autres thérapies intéressantes, comme celles des chaperons, qui agissent pour prévenir la dégradation prématurée de l'enzyme mutée en la stabilisant selon une pharmacologie définie, ont permis d'accroître de façon substantielle l'activité enzymatique. Considérant que le niveau d'activité nécessaire pour prévenir la maladie n'est que de 10%, même une légère augmentation de l'activité enzymatique

par le chaperon pourrait être suffisante pour arrêter la progression de la maladie (Clarke, 2007). De plus, une recherche fondamentale récente avec un modèle de souris ayant la maladie de Fabry a révélé une autre approche alternative, soit celle de la thérapie de réduction du substrat avec le N-butyldeoxynojirimicin. C'est un inhibiteur de la biosynthèse des glycosphingolipides qui agit en réduisant le taux d'accumulation du Gb₃ dans les lysosomes et donc assure une protection partielle pour éviter une dysfonction des cellules endothéliales (Heare et al., 2007).

I.2.5 Voies biochimiques et l'étude de biomarqueurs

Tout d'abord, une définition s'impose en ce qui concerne les biomarqueurs. Ce sont des indicateurs de changements observables et/ou mesurables aux niveaux moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental qui reflètent la présence d'un processus biologique et qui sont directement reliés aux manifestations cliniques et au devenir d'une maladie. Un biomarqueur permet de mieux suivre l'évolution naturelle d'une maladie, de mieux comprendre le processus de ladite maladie, d'évaluer l'efficacité du traitement offert aux patients et de servir de mesure d'évaluation dans l'atteinte de buts thérapeutiques en fonction du suivi des patients. Dans le cas de maladies rares, les biomarqueurs sont des métabolites qui peuvent être quantifiés, parce qu'ils reflètent spécifiquement l'évolution pathologique de la maladie. Ils deviennent donc un outil diagnostique important. Les biomarqueurs sont aussi particulièrement utiles afin d'éviter des biopsies chez des patients souffrant parfois de pathologies multisystémiques sévères puisque lesdits biomarqueurs sont facilement accessibles, car excrétés dans les fluides biologiques. Finalement, les biomarqueurs doivent entre autres: 1) permettre

des mesures rapides, fiables et non dispendieuses, 2) être facilement quantifiables dans les échantillons de fluides biologiques, 3) être exprimés ou excrétés en quantité appréciable et spécifique pour une maladie particulière, 4) être en corrélation directe avec l'expression de la maladie (Cox, 2006).

Chez les patients atteints de la maladie de Fabry, le Gb₃, un glycosphingolipide (voir Figure I.7) (substrat naturel de l' α -galactosidase A), est le produit de stockage ou d'accumulation le plus important, tel que mentionné dans la section sur l'aspect général de la maladie de Fabry. Il est aussi excrété en quantité prédominante dans les fluides biologiques, donc, il devient un biomarqueur d'intérêt (Cox, 2005). Un autre biomarqueur naturel chez les patients atteints de la maladie de Fabry est le galabiosylcéramide (Ga₂), un métabolite excrété en quantité nettement moindre que le Gb₃ dans les fluides biologiques. Deux autres substrats peuvent aussi être retrouvés chez les patients atteints de la maladie de Fabry, provenant des glycosphingolipides du groupe sanguin B et B1 des individus qui ont des résidus terminaux α -galactosyl et du statut d'excréteur du patient (Winchester et Young, 2006). La Figure I.7 montre la structure chimique du Gb₃. La variabilité de la chaîne d'acides gras permet l'analyse de différents isoformes de cette molécule complexe.

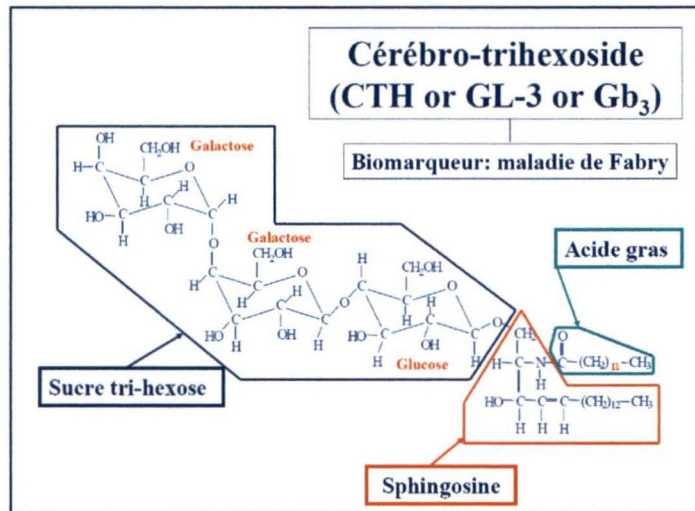


Figure I.7 Structure chimique de la molécule de Gb₃, un glycosphingolipide.

La déficience de l'enzyme α -galactosidase A chez les patients atteints de la maladie de Fabry cause une augmentation progressive de glycosphingolipides (GSL) ayant des résidus α -galactosyl et ce, incluant les antigènes des groupes sanguins B, B1, Pk et P1. Ces glycosphingolipides proviennent du métabolisme des cellules des reins, du foie, des poumons et des érythrocytes (Desnick et al., 2001). Ce déficit enzymatique provoque une augmentation du Gb₃ urinaire et sérique qui est la cause du dépôt lipidique dans des tissus et organes-cibles.

Les dépôts lipidiques sont nombreux dans les cellules épithéliales des glomérules et tubules rénaux (Ries et al., 2004), dans les myocytes cardiaques, dans les cellules ganglionnaires du système autonome et dans la cornée. D'autres tissus sont ciblés, telles les cellules endothéliales, périthéliales et les cellules des muscles lisses des vaisseaux sanguins. Les dépôts de GSL qui s'accumulent dans les cas sévères, sous la forme de masses intracytoplasmiques, engendrent une dysfonction cellulaire, une dégénérescence ou une nécrose dues à l'ischémie qui est secondaire à l'occlusion vasculaire (Pastores et Lien, 2002). Les GSL du plasma sont synthétisés

principalement par le foie et incorporés avec les lipoprotéines, c'est-à-dire le LDL (lipoprotéine de faible densité) et le HDL (lipoprotéine de haute densité) dans la circulation systémique. Des études cinétiques ont montré qu'environ 25% de l'ensemble des GSL plasmatiques est nouvellement synthétisé chaque jour (Desnick et al., 2001). Par ailleurs, le taux d'échange des GSL plasmatiques avec celui des membranes plasmatiques n'a pas été déterminé, ce qui soulève des questions sur l'utilisation du Gb₃ plasmatique comme marqueur de l'accumulation du substrat et moniteur de la réponse clinique à la TER.

Les analyses enzymatiques de l' α -galactosidase A sont faites dans le plasma et dans les leucocytes, par contre, elles sont sujettes à différents facteurs secondaires. Le pH, la température, les anticoagulants et la contamination par les érythrocytes doivent être pris en considération dans l'établissement des valeurs normales. Les hémizygotés souffrant de la forme classique (sévère) de la maladie de Fabry ont de très faibles niveaux ou aucune activité enzymatique décelable. Certains patients qui ont la mutation N215S peuvent avoir une activité résiduelle plus élevée (Mills et al., 2005b). Par ailleurs, l'activité de l' α -galactosidase A chez les femmes peut varier énormément en passant de niveaux aussi faibles que chez les hommes à un niveau normal. Ceci est dû à l'inactivation du chromosome X retrouvée chez les femmes hétérozygotes (Marguery et al., 1993; Redonnet-Vernhet et al., 1996; Lyon, 2002; Guffon, 2003; Morrone et al., 2003; Deegan et al., 2006). Les analyses enzymatiques chez les hétérozygotes ne sont donc pas valables pour la maladie de Fabry.

Plusieurs études menées afin de mieux comprendre ce biomarqueur ont été réalisées au cours des dernières années. Il a été démontré que l'excrétion du Gb₃ urinaire est 66 fois plus élevée chez les patients Fabry que chez les contrôles, tandis que le Gb₃ sanguin chez les patients Fabry n'est que 2.6 fois plus élevé que celui des contrôles (Mills et al., 2005b). Des standards internes de C_{17:0}-Gb₃ ont aussi été synthétisés afin d'assurer une détermination quantitative du Gb₃ (Mills et al., 2002). La quantification du Gb₃ devient ainsi un outil intéressant pour évaluer le monitoring des patients qui sont sous thérapie d'enzyme de remplacement (Boscaro et al., 2002; Mills et al., 2004; Whitfield et al., 2005). La Figure I.8 présente le catabolisme des glycosphingolipides menant à la maladie de Fabry ainsi qu'à plusieurs autres maladies de surcharge.

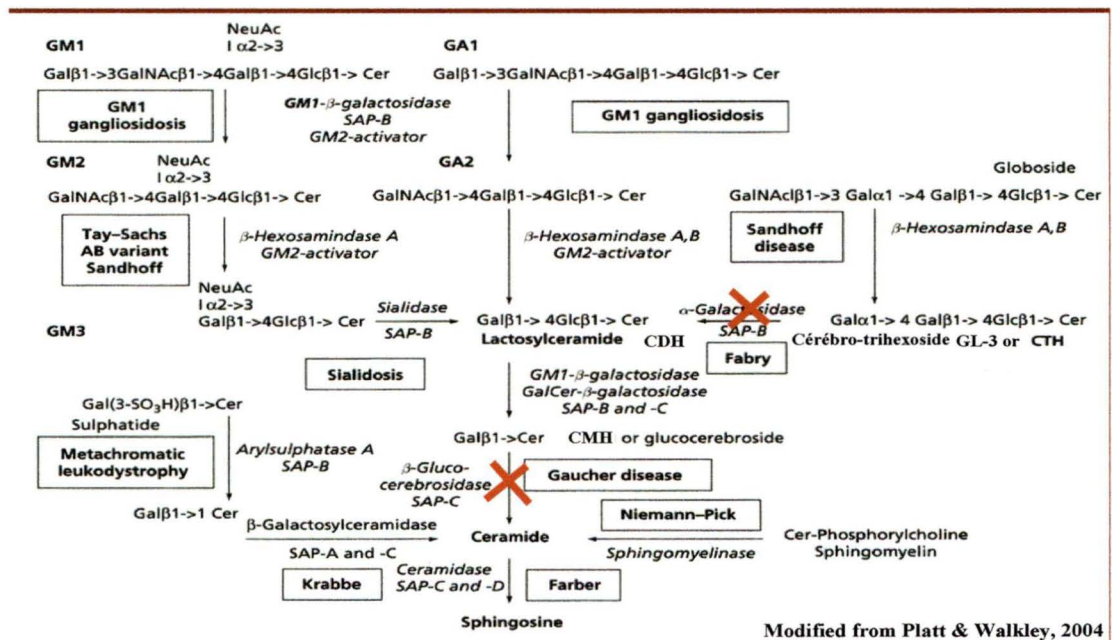


Figure I.8 Catabolisme lysosomal de certains glycosphingolipides. (Adapté de Platt et Walkley, 2004, p. 88).

I.2.6 Génétique moléculaire

Le gène *GLA* est de 12kb. Il code pour l'enzyme α -galactosidase qui est de 101 kDa. Une étude cristallographique par rayons X a révélé que la structure de cette glycoprotéine est homodimérique, et que chaque monomère comporte 2 domaines. Le premier domaine contient le site actif; en enlevant les 31 résidus en position N-terminale, ce premier domaine débute au résidu 32 pour se terminer au résidu 330. Le deuxième domaine est un C-terminal qui contient 8 brins β antiparallèles composés des résidus 331 à 429 (Garman et Garboczi, 2004) (voir Figure I.9). Les deux sites actifs du dimère sont séparés par 50 Å. Une grande hétérogénéité existe au niveau de l'attachement des hydrates de carbone sur l' α -galactosidase A, avec plus de 70 glycoformes différentes. Chaque monomère a la possibilité de 3 attachements potentiels aux sites N139, N192 et N215 et un quatrième site potentiel à N408 qui contient la séquence d'acides aminés asparagine-proline-thréonine. L'hydrate de carbone sur le site N215 est nécessaire, mais non suffisant pour l'excrétion de l'enzyme actif, tandis que le site N192 améliore la sécrétion de l'enzyme actif. Les hydrates de carbone liés aux sites N215 et N192 sont responsables pour cibler la glycoprotéine vers le lysosome, puisque seuls les hydrates de carbone oligomannosyl possèdent le signal-cible du mannose-6-phosphate. De fait, l'hydrate de carbone situé sur le N215 est en position dégagée de la protéine et peut ainsi se lier facilement au récepteur M6P. Une mutation du N215 à la sérine élimine le site d'attachement de l'hydrate de carbone et occasionne alors un mauvais transport de l'enzyme vers le lysosome, ce qui mène éventuellement à la maladie de Fabry (Garman et Garboczi, 2004).

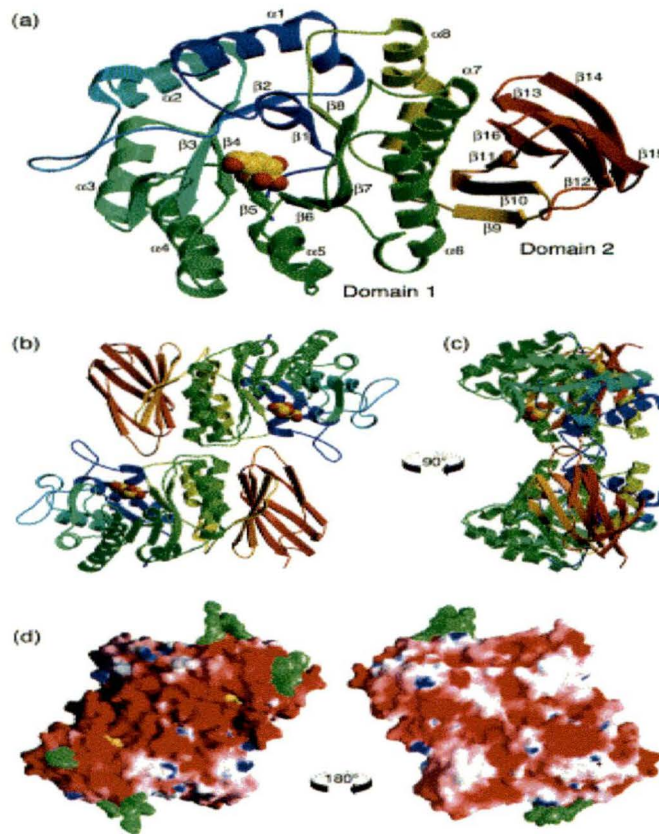


Figure I.9 En (a) : structure du monomère α -GAL présentant les terminaisons N en bleu et C en rouge. Le domaine 1 contient le site actif au centre des brins β . Le domaine 2 contient les brins β antiparallèles, avec le ligand galactose en jaune. En (b) et (c) : deux représentations du dimère α -GAL, avec les mêmes identifications colorées que celles vues en (a), où les sites actifs sont séparés de 50 Å. En (d) : deux visualisations de la surface du α -GAL où les hydrates de carbone liés en N sont en vert. Les degrés de rotation des molécules sont aussi indiqués (Figure tirée de la publication de Garman et Garboczi, 2004).

I.2.7 Mutations

Il existe deux phénotypes au niveau de la maladie de Fabry : 1) le phénotype classique où il n'y a pas d'activité enzymatique dans les tissus et les patients présentent des symptômes multisystémiques et 2) le phénotype modéré où il existe une activité enzymatique résiduelle, les symptômes étant principalement d'origine cardiaque (Garman et Garboczi, 2004; Clarke, 2007). La plupart des 350 mutations

actuellement identifiées chez les patients atteints de la maladie de Fabry sont dites privées, c'est-à-dire qu'elles sont restreintes ou particulières à une famille individuelle (Schaefer et al., 2005). La Figure I.10 présente des mutations ponctuelles du gène humain α -Gal.

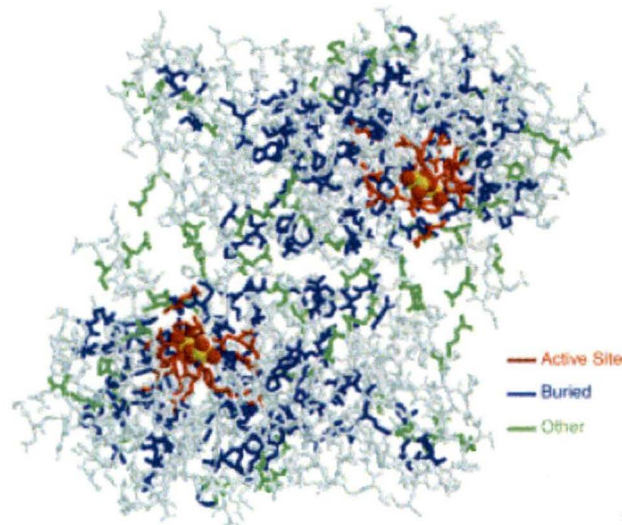


Figure I.10 Mutations ponctuelles de la maladie de Fabry sur la protéine dimérique α -Gal. En rouge: mutations qui perturbent directement le site actif; en bleu: mutations au niveau des résidus enfouis dans le modèle; en vert: mutations qui n'entrent pas dans les deux catégories précédentes; en jaune: ligand galactose (D'après Garman et Garboczi, 2004).

Une seule mutation ponctuelle dans la protéine α -Gal est suffisante pour produire le phénotype classique ou sévère de la maladie de Fabry, où aucune activité de l'enzyme n'est décelable, mais une seule mutation peut aussi causer le phénotype modéré, où il existe une activité enzymatique résiduelle (Garman et Garboczi, 2004). Les génotypes qui associent des mutations non-sens et de décalage du cadre de lecture causent un arrêt prématuré de la synthèse de la protéine qui

amène une protéine tronquée. De plus, plusieurs mutations faux-sens qui impliquent des sites catalytiques et des sites de dimérisation de la synthèse de la protéine sont toutes associées avec la forme classique de la maladie de Fabry (Pastores et Lien, 2002). Selon le modèle homologue élaboré, il existe au moins 2 classes de mutations qui mènent à la progression de la maladie de Fabry: celles qui sont près du site actif dans le domaine 1 et celles retrouvées au niveau des résidus qui sont enfouis dans le domaine 2, distants du site actif et qui jouent un rôle dans le repliement moléculaire de la protéine. Les mutations dans le deuxième domaine, qui sont situées à au moins 25 Å du site actif, modifient les liens hydrophobes de l'enzyme, et ce faisant, réduisent sa stabilité et diminuent la quantité d'enzyme qui est transportée vers le lysosome. Des substitutions mineures d'acides aminés à cet endroit peuvent mener à une perte d'activité enzymatique de l' α -Gal, telle que celle retrouvée dans la maladie de Fabry (Garman et Garboczi, 2004). D'autres mutations, comme la mutation A143P qui est retrouvée au niveau de la population de la Nouvelle-Ecosse (West et al., 2002; Thanamayooran et al., 2003), sont localisées dans une région possédant une large chaîne secondaire; cette mutation brise le lien bisulfure C52-C94, ce qui occasionne une perte d'activité enzymatique. Les 7 exons sont répartis de la façon suivante : l'exon 1 jusqu'à l'exon 6 sont situés dans le premier domaine et l'exon 7 est dans le deuxième domaine (Garman et Garboczi, 2004). Des mutations causant la maladie de Fabry ont été répertoriées au niveau de tous les exons (Altarescu et al., 2001) et sembleraient être plus fréquentes au niveau des exons 3 et 7 du gène *GLA* (Azcona et al., 2007). Certains patients avec des mutations particulières présentent des variantes cliniques où la maladie

n'affecte que certains organes. Par ailleurs, plusieurs de ces mutations ont été trouvées chez des patients avec la forme classique de la maladie, indiquant ainsi que d'autres facteurs interviennent au niveau du phénotype (Winchester et Young, 2006).

I.3 Spectrométrie de masse

I.3.1 Historique

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse chimique qui est devenue au fil des ans un outil de fine pointe technologique indispensable dans la majorité des laboratoires scientifiques. Il faut par ailleurs remonter au début du 20^e siècle pour retrouver la première conception d'un spectromètre de masse par Joseph John Thomson.



Figure I.11 Joseph John Thomson (1856-1940) a conçu le 1^{er} spectromètre de masse.

Auparavant, il avait découvert l'électron, ce qui lui a valu le prix Nobel de physique en 1906. Puis, Aston en 1919 a utilisé la spectrométrie de masse pour étudier différents poids atomiques. En 1946, Stephens a développé le principe du

temps de vol ("Time-of-flight = TOF") pour effectuer ses analyses. Ce n'est qu'en 1956 que Gohlke et McLafferty ont développé la chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse. Bieman et collaborateurs ont procédé au séquençage de peptides en 1959. Une étape importante a été franchie en 1968, lorsque Dole et ses collaborateurs ont développé le principe d'électronébulisation ("electrospray ionization"). Le premier spectromètre de masse en tandem a été développé en 1967 par McLafferty et Jennings. McLafferty a récidivé en 1973 en adaptant le spectromètre de masse afin qu'il puisse être couplé à la chromatographie liquide (LC-MS). Fenn, en 1984, a appliqué l'électronébulisation à l'étude de macromolécules. Depuis 1993, le développement de la spectrométrie de masse a été orienté vers l'étude de protéines, d'oligonucléotides et de leur séquençage (Siuzdak, 1996). La Figure I.12 rapporte la première électronébulisation faite en 1917. L'auteur mentionnait alors : "The spreading of the drops formed from the central tread of liquid into a more or less conical volume is most probably due to the combined action of the divergence in the electric field and of the mutual repulsion of the drops" (Zeleny, 1917). Déjà, il cernait les principes de base impliqués.

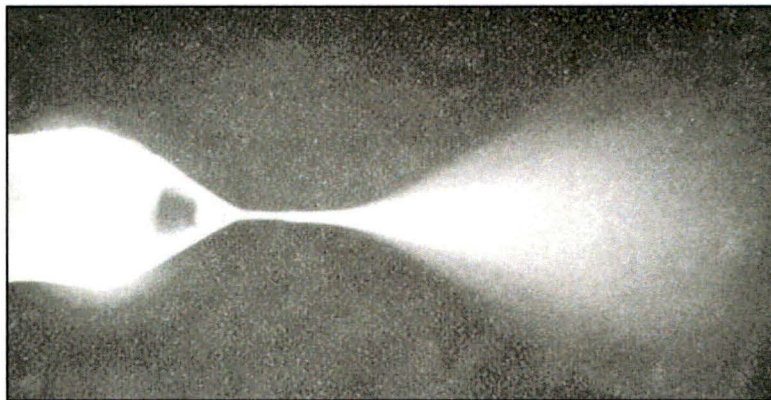


Figure I.12 Électronébulisation telle que rapportée par J. Zeleny en 1917.

I.3.2 Principes de base, composantes d'un spectromètre de masse

Un spectromètre de masse est un appareil analytique servant à mesurer les poids moléculaires de molécules individuelles ou les fragments de ces molécules chargées électriquement (les ions moléculaires) et à les quantifier. Il est alors possible de déterminer la masse en faisant diverger les particules chargées dans un champ électrique ou un champ magnétique sous vide et en séparant les ions selon un rapport masse/nombre de charges (m/z). Nous verrons au cours des prochaines lignes les principes de base de la spectrométrie de masse, les différentes composantes de l'appareillage, les mécanismes d'ionisation moléculaire, les différents types d'analyseurs et les méthodes d'ionisation.

Les principes de base pour tous les types de spectromètres de masse portent sur: 1) la création d'ions chargés par la source d'ions; 2) la séparation des ions sous vide par un analyseur de masse; 3) la détection des ions par un multiplicateur d'électrons. La Figure I.13 montre un diagramme d'un spectromètre de masse, où l'entrée de l'échantillon se fait à la pression atmosphérique et ce, de deux façons: soit par infusion directe ou soit par chromatographie liquide (HPLC), selon les applications visées.

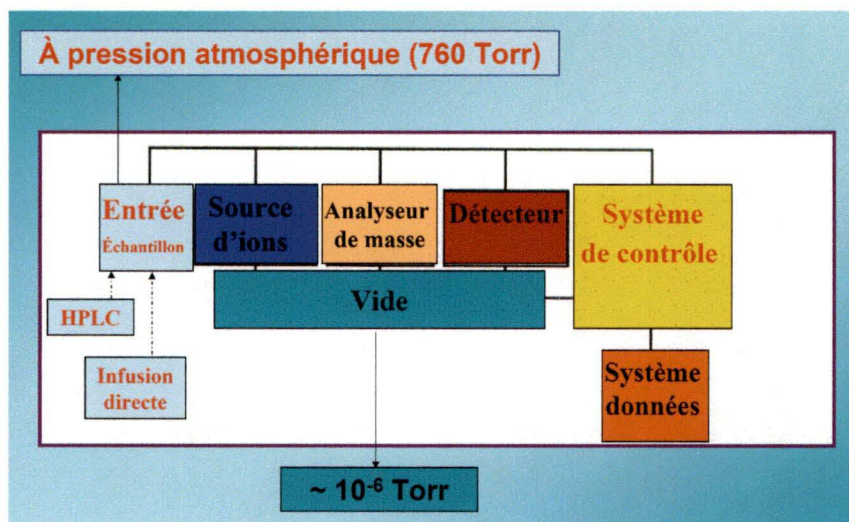


Figure I.13 Diagramme d'un spectromètre de masse. (Adapté de Kinter et Sherman, 2000).

Certaines parties de la source d'ions, l'analyseur de masse et le détecteur sont maintenus sous une pression de 10^{-6} Torr (Kinter et Sherman, 2000). Les principales sources d'ions sont l'électronébulisation, le bombardement rapide d'atomes ("Fast Atom Bombardment"), la désorption au laser et l'ionisation d'électrons. Nous présenterons plus en détail le principe de l'électronébulisation qui est la méthode d'ionisation utilisée dans le cadre de nos recherches.

I.3.3 Électronébulisation

L'électronébulisation est une méthode pour produire des molécules ionisées gazeuses à partir d'une solution liquide (voir la Figure I.14). Ceci est rendu possible en créant un voile gazeux de gouttelettes chargées en présence d'un fort champ électrique. La solution à être analysée est vaporisée par un cône métallique sur lequel est appliqué un champ électrique de 4 000 V.

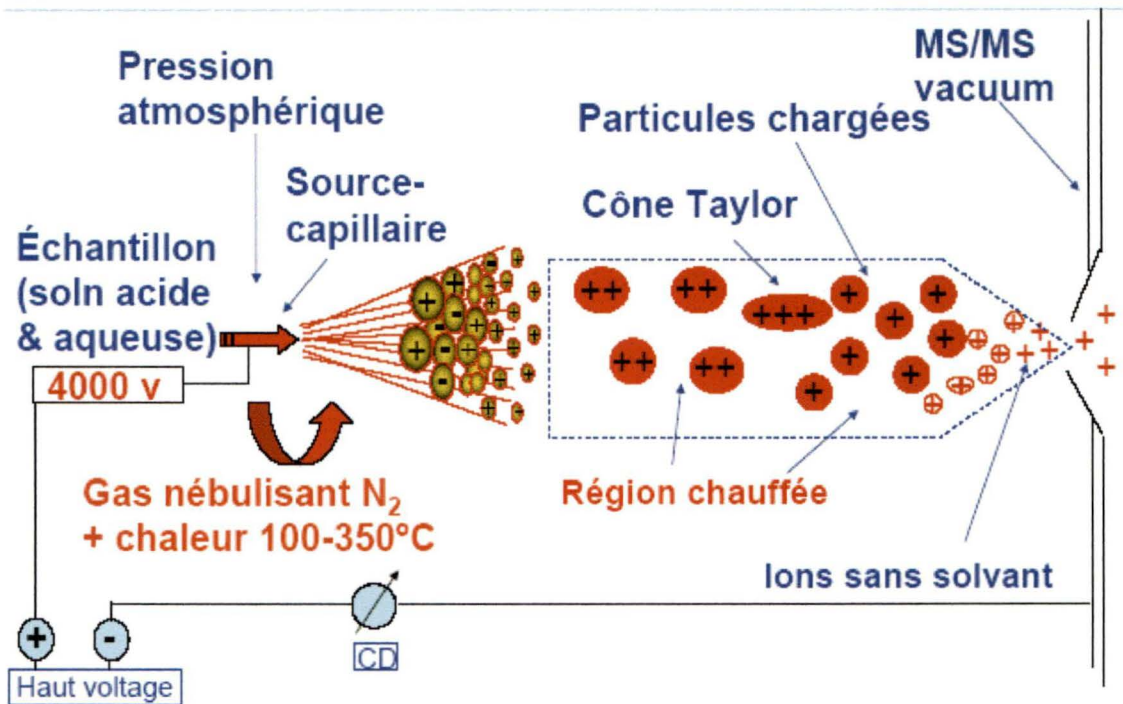


Figure I.14 Production de gouttelettes chargées à partir du capillaire.

Les gouttelettes ainsi hautement chargées sont ensuite attirées de façon électrostatique vers la source du spectromètre de masse. De la chaleur et un gaz sont appliqués sur les gouttelettes avant qu'elles pénètrent dans le spectromètre de masse afin d'évaporer le solvant qui contient l'échantillon. Au fur et à mesure que le solvant s'évapore, les gouttelettes diminuent de taille, ce qui augmente la densité du champ électrique à leur surface. Il se produit une répulsion entre les charges identiques qui augmente au fur et à mesure que le solvant s'évapore. Lorsque cette répulsion coulombique dépasse les forces de cohésion de tension de surface, les ions quittent les gouttelettes pour former un cône Taylor, tel qu'illustré à la Figure I.15.

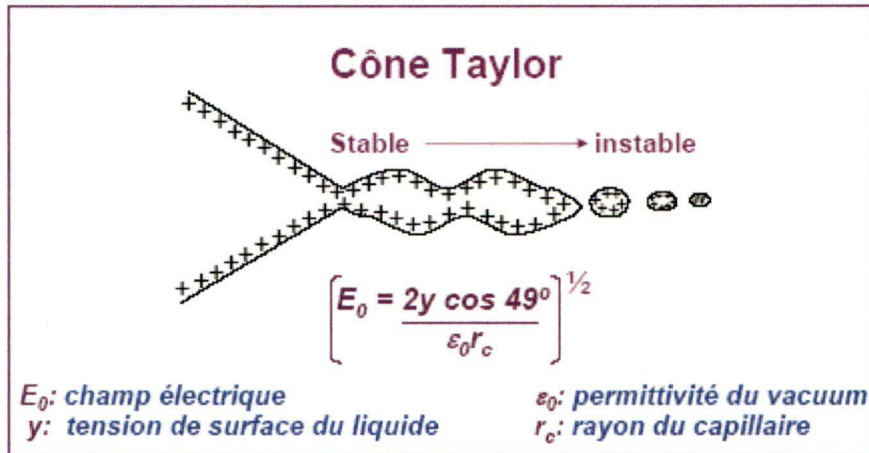


Figure I.15 Formation du cône Taylor à partir de gouttelettes d'échantillon. (Adaptée de P. Kebarle, 2000).

Un modèle récemment élaboré a permis de mieux comprendre le cône Taylor et les principes qui sous-tendent sa formation (Hager et al., 1994; Kebarle, 2000). Un faisceau de gouttelettes non chargées est produit par effet piézo-électrique. Les gouttelettes deviennent ensuite chargées lorsqu'elles s'approchent à 50 μm d'une électrode de 3 kV qui produit une décharge électrique à l'air ambiant. Les gouttelettes sont alors déstabilisées et émettent une fine brume qui peut être enregistrée par une technique stroboscopique. Les spectres enregistrés sont quasi identiques à ceux observés en spectrométrie de masse traditionnelle (voir la Figure I.16).

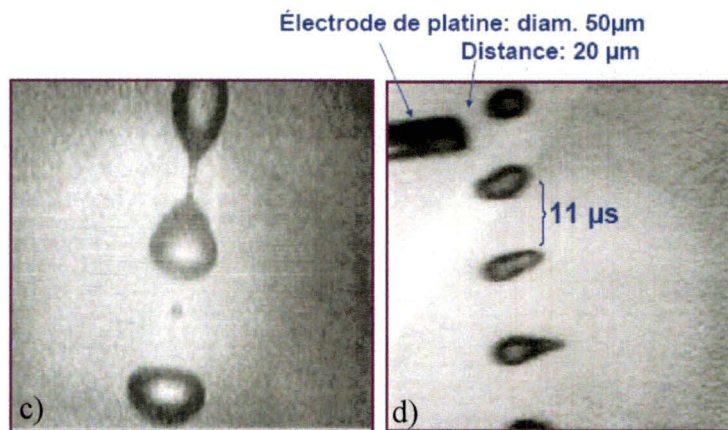
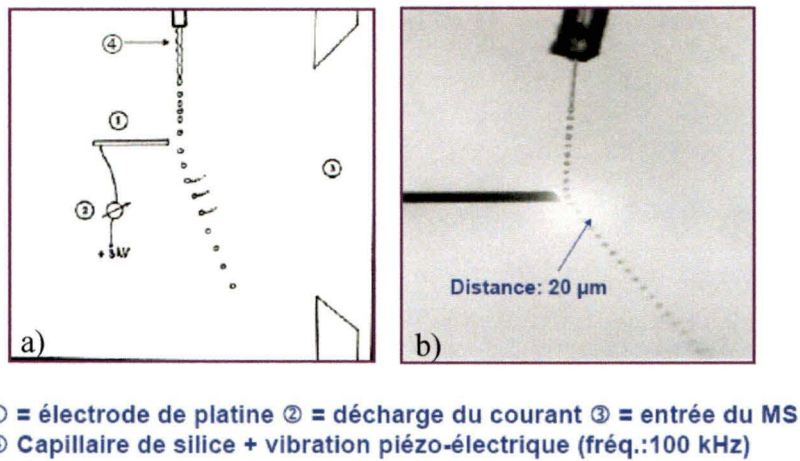


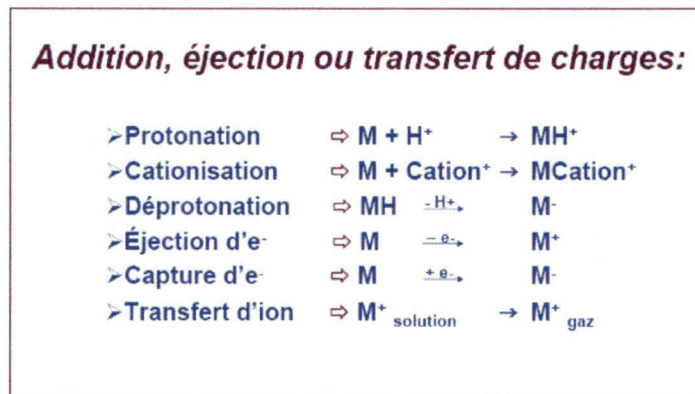
Figure I.16 Modèle montrant la formation du cône Taylor lors de l'électronébulisation : a) modèle théorique; b) effet de la décharge de courant sur les gouttelettes; c) et d) formation du cône Taylor.

Les multiples particules chargées qui sont formées lors de l'électronébulisation représentent une caractéristique particulière de cette méthode d'ionisation, puisque le spectromètre de masse mesure le rapport masse/charge exprimé ainsi : m/z .

I.3.4 Rapport masse/charge

L'analyse de masse faite par les spectromètres de masse détermine le rapport de la masse sur la charge des ions provenant des substances à analyser. Mais tout d'abord, examinons les différents mécanismes d'ionisation moléculaire retrouvés au Tableau I.4. La protonation ("electrospray" positif), la cationisation, la déprotonation ("electrospray" négatif) et le transfert d'ions sont les principaux mécanismes utilisés lors de l'électronébulisation.

Tableau I.4 Différents mécanismes d'ionisation moléculaire.



Dans l'exemple de la Figure I.17, nous observons une protonation d'une molécule de 8 000 Da, c'est-à-dire qu'il y a une augmentation de la masse selon le nombre de protons ajoutés : l'addition d'un proton à une molécule produit une charge nette de +1. Dans le cas qui nous intéresse, cette molécule peut recevoir 1, 2, 3, 4 protons ou charges différentes. Le spectromètre de masse peut donc déceler à 4 charges ajoutées à la molécule, une masse de 8 004 divisée par 4, ce qui donne un ion moléculaire de 2001. Le même principe s'applique pour les 3 autres charges ajoutées. Ceci fournit un spectre de masse spécifique qui est propre à la molécule

ciblée, avec des ions à 2001, 2668, 4001 et 8001, pour 4, 3, 2, 1 charges ajoutées, respectivement.

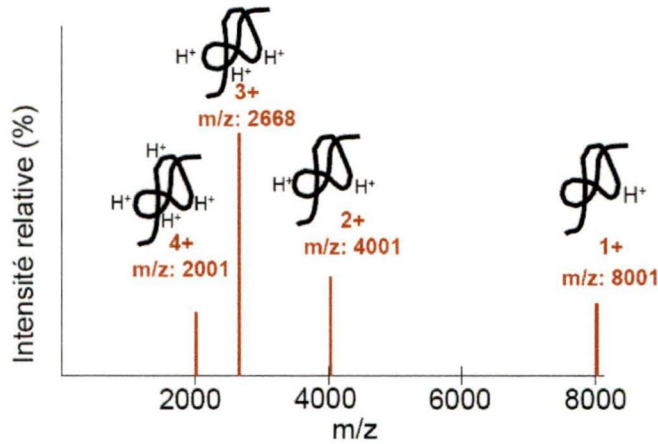


Figure I.17 Spectre de masse d'une molécule de 8 000 Da.

I.3.5 Analyseurs de masse

Plusieurs types d'analyseurs de masse sont disponibles selon l'application visée. Ce sont les quadripôles, les secteurs magnétiques, les TOF, la trappe ionique, etc. Nous présenterons le quadripôle, qui est l'analyseur utilisé lors de nos expériences en laboratoire. Il est constitué de 4 tiges métalliques qui sont reliées en paires (A et B) sur lesquelles un courant direct ainsi qu'une radio-fréquence sont appliqués. Le courant direct est opposé entre les tiges A et B. Les quadripôles fonctionnent comme un filtre de masse. Lorsqu'un champ est appliqué, les ions se déplacent sous forme oscillatoire selon la radio-fréquence appliquée, ce qui implique que seulement les ions ayant un rapport m/z spécifique passeront à travers le filtre et atteindront le détecteur. La Figure I.18 présente un exemple du fonctionnement de ce filtre où, selon la présélection faite, seulement l'ion ayant un

rapport m/z de 100 atteindra le détecteur. Les autres ions seront bifurqués dans le quadripôle et n'atteindront donc pas le détecteur.

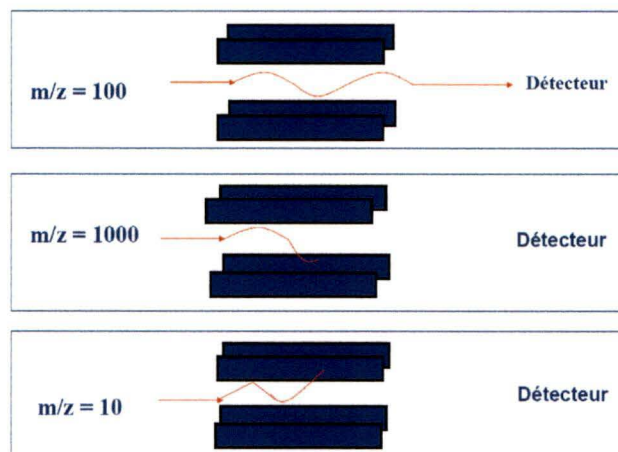


Figure I.18 Sélection spécifique du rapport m/z de 100 dans le quadripôle.

La Figure I.19 présente un aspect schématique d'un quadripôle, depuis l'injection de l'échantillon au niveau du cône, l'électronébulisation, l'entrée vers le quadripôle et l'oscillation des ions entre les tiges métalliques du quadripôle pour se rendre ensuite au détecteur.

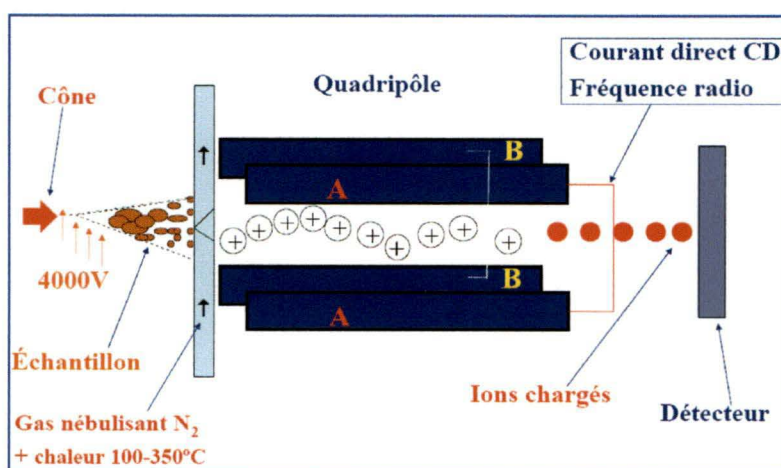


Figure I.19 Coupe schématique d'un analyseur de masse, le quadripôle.

I.3.6 Applications de la spectrométrie de masse en tandem

Le spectromètre de masse en tandem est représenté schématiquement à la Figure I.20 : deux quadripôles séparés par un hexapôle qui contient un gaz inerte, tel l'argon. Lors d'une acquisition en MS/MS, l'hexapôle devient une cellule à collisions où l'énergie cinétique de l'ion sélectionné est convertie lors de ses nombreuses collisions successives en énergie interne. La dissociation de l'ion se produira lorsque son énergie interne atteindra un niveau supérieur à l'énergie d'activation nécessaire pour le fragmenter. La molécule d'intérêt ainsi fragmentée parviendra au dernier quadripôle.

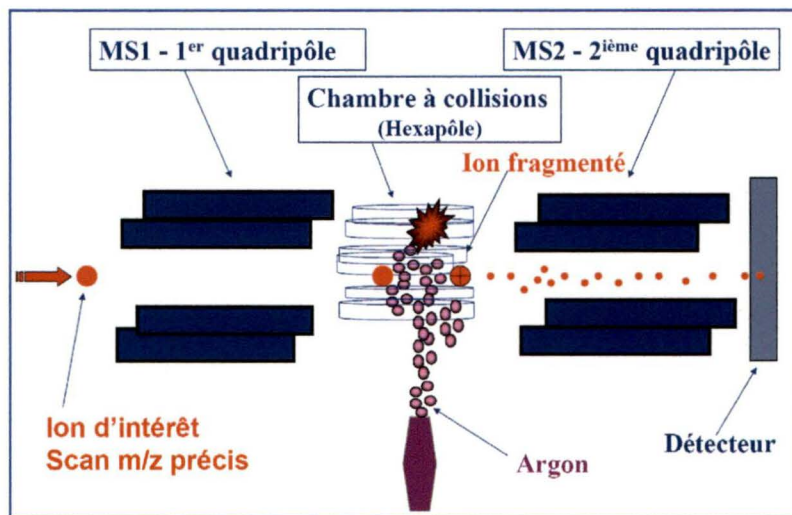


Figure I.20 Coupe schématique d'un spectromètre de masse en tandem présentant deux quadripôles séparés par un hexapôle.

La spectrométrie de masse en tandem permet de travailler sous différents modes de fragmentation selon les besoins requis. Nous présenterons les 4 modes de fragmentation principaux utilisés lorsque le travail est effectué avec un gaz inerte (de Hoffmann et Stroobant, 2003). Tout d'abord : 1) le mode des ions-filles produits ("Product ion scan") qui consiste à sélectionner un ion-parent (ou précurseur) d'un

rapport masse/charge choisi dans le premier quadripôle et de déterminer tous les ions-filles qui résultent de la fragmentation dans la cellule à collisions. Ces fragments sont alors séparés dans le 2^e quadripôle et analysés; 2) le mode des ions-parents produits ("Precursor ion scan"), qui consiste à choisir un ion-fille produit et à déterminer les ions précurseurs (ou ions-parents); le premier quadripôle balaie une gamme de masse, alors que le deuxième quadripôle se concentre sur un seul rapport m/z; 3) le mode de MRM ou "Multiple Reaction Monitoring", où l'ion-parent à être étudié est sélectionné par le 1^{er} quadripôle et fragmenté dans la cellule à collisions, alors que le 2^e analyseur est focalisé sur l'ion produit. Donc, les 2 analyseurs ciblent des masses sélectionnées. Toutes les analyses faites dans cette recherche l'ont été en utilisant le mode MRM; 4) finalement, le mode « perte de neutre » consiste à sélectionner un fragment neutre et à déceler tous les fragments qui mènent à cette perte de fragment neutre. Les deux quadripôles balaient une gamme de masse simultanément, avec un décalage de masse constant.

Tableau I.5 Quatre modes opérationnels d'un spectromètre de masse utilisant un triple quadripôle.

Mode d'opérations	MS1	Chambre à collisions	MS2
① Ion-fille (Produit)	Statique (Sélection masse-parent)	↓	Scan
② Ion-parent (Précurseur)	Scan	RF	Statique
③ « MRM »	Statique (Sélection masse-parent)	passe toutes masses	Statique (sélection ion-fille)
④ Perte de neutre	Scan (Synchro. MS2)		Scan (Synchro. MS1)

La spectrométrie de masse offre une grande versatilité autant dans ses modes opérationnels que dans le fait qu'elle peut être associée ou jumelée à la chromatographie liquide (HPLC) (Cunico et al., 1998). Cette association permet de séparer les substances présentes dans les fluides biologiques pour ne conserver que les substances d'intérêt à être analysées, donc de purifier les échantillons biologiques avant qu'ils ne pénètrent dans le spectromètre de masse. Il faut aussi éviter toute suppression de l'ionisation qui aurait pour conséquence de diminuer le signal de la molécule à analyser (Matuszewski et al., 1998; Kloepfer et al., 2005; Larger et al., 2005).

La spectrométrie de masse en tandem a ouvert la voie à de multiples applications, entre autres, dans les laboratoires de chimie clinique (Chace, 2001) avec différents fluides biologiques : le sang, l'urine, le liquide céphalorachidien et le liquide amniotique. D'autres applications sont retrouvées pour le dépistage de nouveau-nés à partir du sang séché (Zytkovicz et al., 2001; Carpenter et Wiley, 2002; Jones et Bennett, 2002; Chace et al., 2003; Venditti et al., 2003) ou pour l'analyse urinaire de biomarqueurs (Pitt et al., 2002) ou de carnitines et d'acylcarnitines dans les laboratoires de dépistage à haut risque (Vernez et al., 2003) ou de macromolécules pour les maladies de surcharge (Clements, 2004; Meikle et al., 2004b; Fauler et al., 2005; Fuller et al., 2005; Mills et al., 2005b; Auray-Blais et al., 2007).

Plusieurs méthodologies ont été développées pour l'analyse de macromolécules, entre autres pour la maladie de Fabry pour l'analyse du Gb₃ sanguin et urinaire. Ces techniques étaient particulièrement longues et fastidieuses et nécessitaient plusieurs étapes d'extraction, de centrifugation, d'évaporation,

d'ultrasonication et de précipitation de protéines afin d'extraire le biomarqueur de la matrice biologique (Boscaro et al., 2002; Fuller et al., 2005; Utsumi et al., 2005). L'utilisation du sang séché sur papier filtre dans le cadre du dépistage sanguin (Carpenter et Wiley, 2002; Schulze et al., 2003) partout à travers le monde et de l'urine déposée et séchée sur papier filtre dans le cadre d'un programme de dépistage de maladies métaboliques héréditaires (Auray-Blais et al., 1978; Auray-Blais et al., 1979; Lemieux et al., 1984; Lemieux et al., 1988; Auray-Blais et al., 2003) a grandement facilité le transport des échantillons de façon sécuritaire et économique, tout en maintenant une qualité d'échantillon pour les analyses. Cette possibilité de procéder à des analyses à partir d'échantillons sanguins déposés sur papier filtre remonte aux initiatives et à l'aspect visionnaire de Robert Guthrie qui, au début des années '60, a élaboré un processus de collecte et d'analyse pour le dépistage d'une maladie métabolique héréditaire, la phénylcétonurie (Guthrie et Susi, 1963; Lesser, 1963).

Maintenant, quels sont les enjeux éthiques pour tout projet de recherche en génétique impliquant des biobanques, ou en particulier, en ce qui concerne des échantillons biologiques sollicités pour la recherche mais qui proviennent d'une biobanque de prélèvements et d'échantillons utilisés dans le cadre d'un programme de dépistage urinaire offert comme service à toute une population donnée, en l'occurrence, la population des nouveau-nés du Québec? Comment peut-on assurer le respect de l'intégrité et la gestion de ladite biobanque? Parallèlement, comment les comités d'éthique peuvent-ils accepter des projets de recherche avec des biobanques en vue d'analyses génétiques et protéger la confidentialité des informations génétiques du sujet participant?

1.4 Problématique de la recherche impliquant des biobanques

I.4.1 Principes éthiques de la recherche avec l'humain

La recherche scientifique qui nécessite la participation de sujets humains doit être approuvée par un comité d'éthique qui en fait l'évaluation. Le comité d'éthique a le pouvoir d'approuver, de modifier, de stopper ou de refuser toute proposition ou poursuite de projets de recherche faisant appel à des sujets humains, réalisés sur place ou par leurs membres selon la règle 1.2 de l'Énoncé de politique des Trois Conseils (Trois Conseils, 1998, 2000, 2002). Comme toute recherche qui s'applique à des êtres humains, la recherche avec des biobanques doit respecter des principes éthiques fondamentaux qui visent à assurer la protection et le respect de l'intégrité du sujet participant, soit : 1) le respect des personnes et de leur intégrité physique et psychologique et ce, en reconnaissant et en respectant l'autonomie des individus, la capacité des sujets participants éventuels à déterminer ce qui est bon pour eux et en assurant une protection particulière pour les personnes inaptes ou mineures ; 2) et 3) la bienfaisance par opposition à la non-malfaisance, ce qui implique de veiller au bien-être des individus et de la collectivité, donc de faire du bien, de s'abstenir de nuire, de maximiser les avantages et de minimiser les risques. Ceci implique donc que les personnes assument les risques qui sont par ailleurs compensés par des avantages anticipés face à leur participation à la recherche. C'est un devoir de maximiser les avantages nets des projets de recherche car dans la majorité des cas les bénéfices profitent essentiellement à la société et à l'enrichissement des connaissances. Ceci se manifeste concrètement en recrutant un nombre minimum de sujets nécessaires pour participer à un projet de recherche ou

en procédant à un nombre minimum de tests nécessaires à l'obtention de données scientifiquement valables ; 4) le principe fondamental de justice, c'est-à-dire, il faut éviter un fardeau trop lourd pour certains groupes, et assurer une répartition équitable des risques et des avantages (Trois Conseils, 1998, 2000, 2002).

Aussi, à ces principes éthiques fondamentaux s'ajoutent des principes éthiques directeurs, tels 1) le respect d'un consentement libre et éclairé (Réseau et al., 2003; German National Ethics Council, 2004; Hoeyer et al., 2004) par la divulgation efficace de l'information aux sujets ; ceci implique de fournir une information simple, vulgarisée, complète, individualisée au moment du recrutement des sujets, d'assurer la compréhension des sujets en offrant un formulaire de consentement reflétant la réalité du projet et d'assurer dans tout le processus une communication qui favorise le dialogue et le respect de l'autonomie décisionnelle des sujets. De plus, le consentement doit être donné librement par le sujet, c'est-à-dire sans manipulation, coercition ou influence excessive. Il ne doit pas y avoir de gratifications, de privations ou d'autres formes d'exercice de pouvoir ou d'autorité sur les sujets pressentis. Le sujet a le droit de choisir de participer ou non au projet et il peut revenir sur cette décision en tout temps. Il a le droit d'être informé ou non des résultats qui découleront de la recherche. Il a aussi la liberté de se retirer du projet de recherche en tout temps et sa décision ne peut entraîner de limites ou de restrictions quant aux soins et aux services de santé qu'il est en droit d'obtenir ; 2) le respect de la vie privée et des renseignements personnels devient possible en protégeant l'accès aux renseignements personnels, en assurant leur contrôle, en protégeant la diffusion des résultats découlant de la recherche et en préservant l'intégrité psychologique et mentale du sujet en accord avec les valeurs qui sous-

tendent la vie privée, la confidentialité des données et l'anonymat ; 3) le respect des personnes vulnérables, soit celles qui sont devenues sans défense parce que leur capacité de faire des choix ou leurs aptitudes sont amoindries. Il est question ici des personnes inaptes ou mineures et la protection par l'article 21 du Code civil du Québec (C.c.Q.) ; 4) le respect de la justice, qui implique un concept d'impartialité et d'équité ; ceci est rendu possible lorsque les protocoles de recherche sont évalués selon des normes et règles justes et avec un processus d'évaluation éthique appliqué de façon indépendante. Il doit aussi y avoir une répartition des bienfaits et des fardeaux de la recherche selon une justice distributive ; ceci signifie qu'aucun segment de la population, comme les personnes vulnérables ou celles qui sont incapables d'assurer la défense de leurs intérêts, ne devrait subir plus que sa juste part des inconvénients reliés à des projets de recherche ; il est important que lesdites personnes ne soient pas exploitées au bénéfice de l'enrichissement des connaissances ; 5) l'équilibre des avantages et des inconvénients, où les inconvénients prévisibles doivent être moins importants que les avantages escomptés. Cette proportionnalité influence donc le bien-être et les droits des sujets qui participent à la recherche (Trois Conseils, 1998, 2000, 2002)

I.4.2 Biobanques : définition, importance en génétique

Malgré le fait que plusieurs définitions existent pour définir le mot « biobanque », nous trouvons que cette multiplicité de définitions entraîne une problématique d'une ampleur considérable dans la gestion desdites biobanques. Étant impliquée dans un travail au quotidien avec des biobanques, il nous semblait important de déterminer à partir de certaines définitions l'essentiel de ce que

constitue une biobanque. Donc, les biobanques sont des collections d'échantillons biologiques et les données qui s'y rattachent. (Cambon-Thomsen, 2004). Cette définition devient plus précise lorsqu'elle est appliquée à la recherche dans le domaine de la génétique. Les biobanques sont alors définies comme des regroupements d'échantillons biologiques obtenus d'individus identifiés et sélectionnés selon les caractéristiques cliniques ou biologiques des membres de ce groupe, et de tout ce qui en découle (Moutel et al., 2004). En ce qui a trait aux données et aux prélèvements faits dans le cadre d'études génétiques, l'UNESCO a émis la déclaration suivante : « Données génétiques humaines : informations relatives aux caractéristiques héréditaires des individus, obtenues par l'analyse d'acides nucléiques ou par d'autres analyses scientifiques » et « Échantillon biologique : tout échantillon de matériel biologique (par exemple cellules du sang, de la peau et des os ou plasma sanguin) où sont présents des acides nucléiques et qui contient la constitution génétique caractéristique d'un individu (UNESCO, 2003) ». En somme, le matériel génétique concerne tout élément du corps humain (tissus, organes, fluides biologiques, cellules ou autres substances) qui peut fournir directement ou indirectement de l'ADN. L'information génétique quant à elle représente tous les éléments de connaissance qui concernent les gènes et l'hérédité et qui sont susceptibles d'être codés pour être conservés, traités ou communiqués selon des règles précises. Le matériel génétique étant, de par sa nature même, partagé avec d'autres parents biologiques, l'identification d'un agent génétique causal a des conséquences qui vont au-delà de l'individu (Trois Conseils, 1998, 2000, 2002) (Anderlik, 2003). De plus, les enjeux éthiques qui entourent

l'utilisation du matériel génétique touchent aussi les individus en tant que communauté ou groupe particulier d'appartenance.

Les biobanques sont d'une importance capitale pour identifier les causes et les mécanismes sous-jacents d'un grand nombre de maladies et en particulier, celles qui sont fréquentes parmi la population. L'approfondissement de nos connaissances sur le génome humain nous permet de mieux comprendre le rôle, non seulement des facteurs environnementaux, mais aussi des facteurs héréditaires impliqués dans la cause ou la prédisposition à la maladie. Par ailleurs, toute recherche scientifique doit respecter les grands principes éthiques fondamentaux, de même que les principes éthiques directeurs qui s'y rattachent.

I.4.3 Gestion des échantillons faisant partie d'une biobanque

Le but de la recherche en génétique est d'obtenir du matériel génétique et de l'information phénotypique (histoire familiale) sur le sujet participant à la recherche, sur les membres de sa famille ou sur des sous-populations spécifiques. Il y a quelques années, les compagnies pharmaceutiques ou autres organismes subventionnaires ont réclamé la création de biobanques pour poursuivre leurs études génétiques. Les échantillons initialement identifiés étaient alors anonymisés, c'est-à-dire, que toute identification était enlevée. Toute possibilité de retracer le sujet participant et les données génétiques qui s'y rattachent était ainsi irrévocablement éliminée (ASHG, 1996). Mais, au fil des ans, la demande pour des échantillons codés, donc retraçables, est devenue la norme lors de la création d'une biobanque par des organismes subventionnaires. Il est donc devenu difficile pour les comités d'éthique de la recherche d'assurer la protection du sujet participant et

de contrôler la gestion des spécimens et de l'information qui s'y rattache (Rothstein, 2002; Moutel et al., 2004). Certains projets de recherche ont même été refusés parce qu'ils impliquaient la création de biobanques (Patenaude et de Champlain, 2004). Sur la gestion des biobanques dans la recherche en génétique humaine, plusieurs questions sont soulevées : 1) Comment assurer la gestion des prélèvements biologiques? 2) Comment assurer la protection de la vie privée pour un sujet participant qui donne son consentement à une biobanque? 3) Comment maintenir la sécurité et l'intégrité des sujets participants lorsque les échantillons sont codés? 4) Comment assurer la confidentialité et la sécurité de l'information génétique? 5) Comment gérer le matériel biologique conservé pour une période de temps souvent indéfinie? 6) Comment s'assurer du respect du consentement éclairé du sujet? 7) Comment recontacter le sujet participant, advenant une découverte d'utilité clinique majeure, tout en respectant la confidentialité? Ce sont des questions complexes qui placent les comités d'éthique de la recherche sur l'humain dans une situation particulièrement difficile. Certains ont soulevé qu'il incombe aux comités d'éthique d'établir leurs propres lignes directrices pour évaluer des projets de recherche impliquant des biobanques (Wolf et Lo, 2004; Joly et al., 2005). Une quête de solutions s'avérait nécessaire pour pallier à ce problème en émergence.

I.4.4 Aspect éducationnel à propos des biobanques

En tant que membre d'un comité d'éthique de la recherche sur l'humain (CÉR) pendant plusieurs années, il nous a été possible de constater qu'il était difficile pour les membres du CÉR d'évaluer les projets de recherche impliquant

des biobanques. Une évaluation d'un protocole fictif soumis à 44 comités d'éthique à travers le Canada a permis de constater une très grande variabilité dans l'évaluation des protocoles : 68.2% ont rejeté le protocole à cause de la présence de la biobanque dans celui-ci; 22.7% l'ont approuvé sous certaines conditions; 6.8% l'ont approuvé sans condition; 2.3% ont préféré ne pas répondre au questionnaire (Patenaude et de Champlain, 2004). La complexité des projets, les enjeux éthiques et les conséquences à court et à long terme pour le sujet potentiel sont aussi particulièrement difficiles à cerner pour le personnel de recherche qui est impliqué dans le recrutement de sujets éventuels. Le personnel doit avoir la connaissance en éthique nécessaire pour fournir une information complète aux sujets afin d'obtenir leur consentement libre et éclairé.

I.5 Projet de recherche : Objectifs de chaque chapitre

I.5.1 Chapitre II – Premier article

Development of a filter paper method potentially applicable to mass and high-risk urinary screenings for Fabry disease.

- Développer une méthodologie rapide et efficace pour l'analyse d'un glycosphingolipide, le globotriaosylcéramide (Gb₃) à partir d'échantillons d'urine prélevée sur papier filtre pour les patients atteints de la maladie de Fabry.
- Développer une méthodologie par spectrométrie de masse en tandem pour quantifier le Gb₃ total urinaire.

- Valider la méthodologie développée : précision et reproductibilité, pourcentage de recouvrement, variations intra-jour, inter-jour, limites de détection et de quantification.

I.5.2 Chapitre III – Deuxième article

Neonatal Mass Urinary Screening Program: from micromolecules to macromolecules.

- Présenter l'intégration potentielle de la méthodologie développée par LC-MS/MS du Gb₃ urinaire à l'intérieur d'une étude de faisabilité chez les nouveau-nés du Québec.
- Présenter la méthodologie développée en fonction du monitoring et du suivi de patients atteints de la maladie de Fabry qui sont sous thérapie d'enzyme de remplacement.
- Vérifier la stabilité du Gb₃ sur une période de temps prolongée.

I.5.3 Chapitre IV – Troisième article

Urinary globotriaosylceramide excretion correlates with the genotype in children and adults with Fabry disease

- Développer une méthodologie multiplex rapide pour l'analyse urinaire du Gb₃ total et de la créatinine par LC-MS/MS pour les patients d'âge adulte et

pédiatrique atteints de la maladie de Fabry et pour une éventuelle étude de faisabilité.

- Valider la méthodologie développée pour des urines prélevées sur papier filtre, autant pour le Gb₃ que pour la créatinine.
- Appliquer cette méthodologie à une étude de corrélation entre l'excrétion urinaire du rapport Gb₃/créatinine et 4 types de mutations : faux-sens, non-sens, décalage du cadre de lecture et jonction d'épissage chez les hémizygotés et les hétérozygotés atteints de la maladie de Fabry.
- Étudier la corrélation entre l'âge et le taux d'excrétion urinaire du rapport Gb₃/créatinine chez ces patients.
- Étudier la corrélation entre le sexe et le taux d'excrétion urinaire du rapport Gb₃/créatinine chez ces patients.
- Étudier la corrélation entre le traitement et le taux d'excrétion urinaire du rapport Gb₃/créatinine chez ces patients.

1.5.4 Chapitre V – Quatrième article

A biobank management model applicable to biomedical research

- Évaluer et présenter les enjeux éthiques liés à la gestion des biobanques dans la recherche en génétique humaine en milieu institutionnel, en particulier, dans le projet de recherche sur la maladie de Fabry et la population de nouveau-nés du Québec : nouveau-né anormal à 21 jours de vie pour l'excrétion de Gb₃ et l'importance d'un consentement éclairé pour les parents.

- Élaborer un modèle de gestion des biobanques qui serait applicable dans la recherche institutionnelle et assurerait la protection du sujet participant et le respect de son intégrité.
- Assurer que le modèle de gestion des biobanques respecte l'infrastructure organisationnelle de l'institution.
- Permettre un retour d'information pour le sujet participant si une découverte d'utilité clinique majeure se présentait.
- Garantir qu'aucun coût de gestion ne soit imputé à l'institution pour assurer la gestion du modèle.

1.5.5 Chapitre VI – Cinquième article

Biobanking Primer: Down to basics

- Retour aux principes de base : élaborer un processus efficace et cohérent pour assurer une participation informée des sujets qui participent à un projet de recherche.
- Élaborer un modèle pour assurer la formation continue des membres du comité d'éthique qui évaluent les projets de recherche comportant des biobanques.
- Élaborer un modèle d'application internationale.
- Maintenir une cohésion efficiente entre le chercheur et le personnel de recherche, les membres du comité d'éthique, l'institution et l'organisme subventionnaire dans l'élaboration du modèle.

- Garantir qu'aucun coût ne soit imputé à l'institution pour assurer la formation continue des intervenants.

Chapitre II - Premier Article

Development of a filter paper method potentially applicable to mass and high-risk urinary screenings for Fabry disease.

C. Auray-Blais, D. Cyr, K. Mills, R. Giguère, R. Drouin*, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, (2007) 30(1):106.

Christiane Auray-Blais a conçu le projet de recherche, élaboré le protocole et développé la méthodologie. Elle a rédigé la demande pour le Comité d'éthique de la recherche sur l'humain. Elle a fait les démarches pour obtenir les échantillons d'urine pour ce projet. Elle a réalisé la majorité du travail de laboratoire nécessaire pour cet article. Un support technique a été apporté par Monsieur Denis Cyr au niveau de l'utilisation et du développement du protocole de la spectrométrie de masse en tandem. La rédaction de cet article relève dans sa totalité de Christiane Auray-Blais.

Résumé

La maladie de Fabry est une maladie de surcharge liée au chromosome X et implique un trouble dans le catabolisme des glycosphingolipides. Il en résulte un déficit enzymatique de l' α -galactosidase A qui mène à une accumulation importante d'un biomarqueur, le globotriaosylcéramide (Gb₃), dans l'urine des patients atteints. Nous avons développé et validé une technique d'analyse du Gb₃ par spectrométrie de masse en tandem reliée à une chromatographie liquide et ce, à partir d'échantillons d'urine prélevée sur papier filtre. Les techniques pour l'analyse du Gb₃ sont actuellement longues et nécessitent plusieurs étapes en laboratoire. L'utilisation du papier filtre avec cette méthode permet d'éliminer plusieurs étapes laborieuses d'extraction des lipides, de centrifugation, d'évaporation de solvants, tout en maintenant une grande sensibilité et efficacité. La stabilité du Gb₃ sur papier filtre est bonne pour une période de 7 semaines sous différentes conditions de température. Nous avons établi des valeurs normales et analysé des urines de patients hémizygotés et hétérozygotés atteints de la maladie de Fabry. Les valeurs du Gb₃ urinaire total chez les patients hémizygotés avec le phénotype classique de la maladie étaient supérieures aux valeurs normales, sauf pour deux patients non sécréteurs. De plus, cette nouvelle méthode favorise la collecte urinaire, l'entreposage et l'envoi postal des échantillons. C'est une méthode simple et efficace qui serait applicable à une étude de faisabilité pour déterminer le Gb₃ urinaire au niveau d'une population de nouveau-nés. Cette méthode pourrait aussi être utile dans les laboratoires de dépistage à haut risque. De plus, l'incidence de la

maladie de Fabry est difficile à évaluer due à la grande hétérogénéité du phénotype clinique. Une étude de faisabilité pourrait donc s'avérer importante afin d'estimer cette incidence dans la population québécoise.

Development of a filter paper method potentially applicable to mass and high-risk urinary screenings for Fabry disease

C. Auray-Blais^a, D. Cyr^a, K. Mills^b, R. Giguère^a and R. Drouin^{a*}

^a *Service of Genetics, Department of Paediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, 3001, 12th Avenue North, Sherbrooke, Qc, Canada J1H 5N4*

^b *Biochemistry, Endocrinology and Metabolism Unit, Institute of Child Health, University College London, 30 Guilford Street, London, WC1N 1EH, UK*

***Corresponding author:** *Service of Genetics, Department of Paediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, 3001, 12th Avenue North, Sherbrooke, Qc, Canada J1H 5N4*

Tel.: +1 819 820 6827; fax: +1 819 564 5217.

E-mail: regen.drouin@usherbrooke.ca

Grant support: Genzyme Canada Inc.

Word counts (text): 2 687

Word counts (abstract): 239

Number of figures: 2

Submitted to: **Journal of Inherited Metabolic Disease**
Official Journal of the Society for the Study of Inborn
Errors of Metabolism
Editors-in-Chief: G.F. Hoffmann; J. Zschocke
Dr Verena Peters, Managing Editor
Springer Netherlands

Abstract

Fabry disease is an X-linked lysosomal storage disorder of glycosphingolipid catabolism resulting from a deficiency of the enzyme alpha-galactosidase A, and leading to the progressive accumulation of one biomarker, globotriaosylceramide (Gb₃), predominantly elevated in the urine of these patients. We have developed a technique for the analysis of total Gb₃ in urine samples collected on filter paper, using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with a triple quadrupole instrument. Existing Gb₃ techniques being both time- and labour-intensive, this filter paper method eliminates lipid extraction, glycolipid isolation, centrifugation and evaporation steps, while maintaining sensitivity and efficiency. The stability of Gb₃ on filter paper was good for a 7-week period under different temperature conditions. Normal control values were established and the technique was tested with anonymised samples from Fabry hemizygotes and heterozygotes. The levels of total Gb₃ in all classical hemizygotes were well above the control values and all heterozygotes, except two nonexcretors, were above the reference level. The proposed novel filter paper method favours the collection, storage and shipment of samples. It is simple and efficient for a feasibility study, potentially applicable to the determination of total urinary Gb₃ in the newborn population as part of a screening programme, and could also be used in high-risk screening laboratories. Since the incidence of Fabry disease is hard to establish, owing to the heterogeneous clinical expression of the visible phenotype,

this feasibility study could help determine its actual incidence in the Quebec population.

Sentence summary: Fabry disease presents a heterogeneous clinical expression with one biomarker, Gb₃, specifically increased in urine. Mass screening samples for inherited metabolic disorders are mostly collected on filter paper. Since no urine filter paper method exists for the analysis of Gb₃, we developed and validated a novel, non-invasive, rapid and efficient LC-MS/MS filter paper method potentially applicable to a feasibility study to determine the total urinary Gb₃ levels in the newborn population, as part of a mass screening program, and also in high-risk screening labs.

Keywords: Fabry disease, urine, filter paper, Gb₃, LC-MS/MS, mass screening

Abbreviated title: Urine filter paper method for Fabry disease.

Lists of abbreviations:

α -Gal A	α -galactosidase A
ES	electrospray
ESI-MS/MS	electrospray ionization-tandem mass spectrometry
Gb ₃	GL-3 or CTH (ceramide trihexoside): globotriaosylceramide
ERT	enzyme replacement therapy
IS	internal standard (C _{17:0} -Gb ₃)
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LOD	limit of detection
LOQ	limit of quantification
LSD	lysosomal storage disorder
MRM	multiple reaction monitoring
RF	radiofrequency
TIC	total ion chromatogram

Introduction

Fabry disease (McKusick 301500) is an inborn error of glycosphingolipid catabolism resulting from a deficiency of α -galactosidase A (α -Gal A) leading to the progressive accumulation of lysosomal fatty deposits, particularly the substrate globotriaosylceramide (Gb₃ or GL-3, also known as ceramide trihexoside (CTH)), in the vascular endothelium, causing renal, cardiac, and cerebrovascular manifestations and early death (Desnick et al 2003). Treatment of the disease is now possible with enzyme replacement therapy (ERT) (Eng et al 2001). The incidence of Fabry disease is difficult to establish with precision, varying from 1:50 000 to 1:3 100, (Meikle et al 1999; Spada et al 2006), because it is heterogeneous in its clinical manifestations (Desnick et al 2003; Elleder et al 1990; Nakao et al 2003).

Advances in technology, and particularly the use of liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (Fauler et al 2005; Mills et al 2002, 2005; Roddy et al 2005), have created an unprecedented interest in the identification of specific biomarkers. In Fabry disease, urinary Gb₃ is predominantly elevated (Mills

et al 2005), being derived from the accumulation in the epithelial cells of the glomerulus and distal tubules of Fabry patients (Desnick et al 1971). Urine has thus become a physiological fluid of choice to analyse glycosphingolipids and, in particular, total Gb₃ isoforms. Unfortunately, most of the Gb₃ techniques devised over the years are both time- and labour-intensive, necessitating sample dilution, extraction, ultrasonication, centrifugation and evaporation steps (Boscaro et al 2002; Fuller et al 2005; Utsumi et al 2005). Also, a high protein content in liquid urine samples compromises Gb₃ extraction, so these “high-protein” samples had to be identified and treated separately (Kitagawa et al 2005). Since no urine filter paper method exists for the analysis of Gb₃, we have developed a noninvasive, rapid, simple and efficient LC-MS/MS filter paper method potentially applicable to a feasibility study oriented towards mass and high-risk screening programmes and follow-up of treated Fabry hemizygous patients, in order to adequately evaluate their biochemical evolution and assure regular monitoring, as recently suggested (Whitfield et al 2005). In fact, samples (either blood or urine) collected on filter paper are used in most of the mass screening programmes around the world, since they are easy to process in analysing laboratories (Auray-Blais et al 2003). The stability of Gb₃ on filter paper was also tested at different temperatures for a period of 7 weeks, thus allowing shipping of samples by mail, even under harsh weather conditions. Results of urine filter paper samples of known classical Fabry patients, heterozygotes and controls are presented.

Materials and methods

Chemicals and reagents

A total globotriaosylceramide isoforms standard was purchased from Matreya Inc. (Pleasant Gap, PA, USA); C_{17:0}-Gb₃ isoform internal standard (IS) was a courtesy of Genzyme Inc.; chromatographic-grade methanol, chloroform, formic acid, picric acid and sodium hydroxide were obtained from Fisher Scientific (Nepean, Ontario, Canada). The creatinine standards were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Filter papers were Whatman no. 903. A 10 mg stock solution of Gb₃ isoforms was prepared by dissolving it in 1 mL of a mixture of chloroform-methanol (2:1). Different working solutions ranging from 3.7 ng/ml to 80 µg/ml were prepared from the stock solution, by dilution in methanol. A stock solution of C_{17:0}-Gb₃ was prepared by adding 1 ml of chloroform-methanol (2:1) to a 0.5 mg vial. We used a working solution of 1 µg/20 µl of methanol. Standard solutions were kept at -20°C.

Patient and control urine samples

Fresh random urine samples were collected in a blind manner after informed consent was obtained from hemizygotes and heterozygotes who had been diagnosed with Fabry disease, evidenced by reduced α -galactosidase A activity in leucocytes (males) or by a mutation in the α -galactosidase A gene, consistent with Fabry disease (females), or by pedigree. Fresh control urine samples (mean age 41.2 \pm 11.3 years old; range 18-58; male/female ratio 40/60) were collected from 43

healthy adult individuals. Urine samples taken from collection containers were well mixed and 1 ml was deposited on a 5 cm (diameter) filter paper disc. Samples were left to dry at room temperature for at least 4 hours. One μg of $\text{C}_{17:0}\text{-Gb}_3$ (IS) per 1 ml of dried urine sample was added directly on the filter paper and allowed to dry for 30 minutes in order to simulate the procedure that will be used in mass or high-risk screening programmes, since the parents or the patients will be collecting the urine samples on virgin filter papers, before sending them by mail.

Urine elution and homogenizing processes

Attempts with varying quantities of methanol or methanol-chloroform (1:1), as well as timetable schedules, were used to determine an optimal total Gb_3 recovery from the filter paper compared to untreated samples using a Gb_3 standard (final concentration of $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$) deposited on each urine filter paper sample with $1 \mu\text{g}$ of $\text{C}_{17:0}\text{-Gb}_3$ IS per 1 ml of dried urine sample. Filter paper discs were folded in half, deposited in 20 ml glass vials and eluted with one of the two solvents to be tested, by shaking the vials on a rotary shaker (New Brunswick Scientific, NJ, USA) for 1 h with 4 ml of each eluent. Also, sonication of the eluted samples was compared to homogenization (at speed 6 with the PowerGen 125 Homogenizer, Fisher Scientific) under different timetables (for 10, 30, 60 s) to maximize total Gb_3 recovery from urine debris. Different concentrations of total Gb_3 isoforms (final concentrations of 0.15 to $50 \mu\text{g}/\text{ml}$) were added to urine filter paper samples with the $\text{C}_{17:0}\text{-Gb}_3$ IS. Homogenization was performed by inserting the probe of the

homogenizer in the glass tubes containing the eluates in order to disrupt any intact epithelial cells, such as distal tubular cells, loaded with Gb₃.

Gb₃ values versus creatinine

Gb₃ values obtained from urine filter paper samples of patients and controls were expressed according to creatinine (Jaffe reaction) (Chasson et al 1960), which was evaluated on the same methanol-eluted specimens. Creatinine is a metabolite widely used to normalize urinary output. Care was taken when analysing samples for phenotype prediction because creatinine is derived from muscle metabolism and levels increase with age. Accordingly, samples from affected individuals were matched for age to controls.

Liquid chromatography (LC):

An Alliance 2795XE system was used. LC analysis of Gb₃ was performed using the following step-gradient: mobile phase A = ammonium acetate 2mmol/L + 0.1% formic acid in water; mobile phase B = ammonium acetate 2mmol/L + 0.1% formic acid in methanol. The time program was 0-0.5 min, 50% A to 100% B; 0.5-4.0 min, 100% B; and 4.0-6.0 min, 50% A and 50% B to recondition the column before the next analysis. The solvent divert valve was used from 0 to 1.9 min and from 4 to 6.0 min to prevent unwanted salts and contaminants entering the tandem mass spectrometer and prevent contamination of the ion source. The best flow rate was

0.5ml/min to minimize ion suppression, with a column temperature at 45°C. Rapid analyses were achieved with a C8 guard SunFire column (3.5 µm, 3.0 x 20 mm, Waters Micromass, Manchester, UK) before samples entered the mass spectrometer. The total analysis time between each injection was 6.0 min.

Electrospray ionization-tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS)

Mass spectrometry of glycosphingolipids was carried out using a Quattro micro tandem quadrupole instrument (Waters Micromass) with electrospray ionization operated in positive-ion mode (ES+) according to Mills and colleagues (2002, 2005), with the following modified parameters: capillary voltage = 4.0 kV; extractor = 3.0 V; RF lens 0.2 V; collision energy = 60 eV; cone gas flow = 10L/hr; desolvation gas flow = 600 L/hr; multiplier setting = 650 V.

Quantification of total Gb₃

The multiple reaction monitoring (MRM) mode was used to measure total urinary Gb₃ content, as the sum of eight specific isoforms, from C_{16:0}, C_{18:0}, C_{20:0}, C_{22:1}, C_{22:0}, C_{24:1}, C_{24:0} to C_{24:OH}. Data for total Gb₃ were acquired over a period of 1.9-3.5 min from low to high mass with a dwell time of 0.08. Samples were quantified using Waters QuanLynx software and with the C_{17:0}-Gb₃ internal standard (1 µg/ml of dried urine sample) added to each sample, to generate a reference value for quantification during analysis.

Validation of method

Validation of the method was performed by spiking different concentrations of total Gb₃ isoforms standard solutions on already dried normal random urine filter paper samples. Samples were analysed in triplicate. We assessed the intra-day precision (4 runs in a day) and the inter-day precision (6 different days by two operators) by adding 0.5 and 15 µg/ml (final concentrations) and 0.125 and 50 µg/ml (final concentrations), respectively, of total Gb₃ isoforms to urine filter paper samples to provide an assessment of the reproducibility of the method. The linearity of the response was assessed by adding varying amounts of total Gb₃ (0.125 to 50 µg/ml final concentrations) to urine filter paper samples. The limit of detection (LOD) of total Gb₃ isoforms was determined in order to obtain a signal-to-noise ratio three times higher than the signal obtained for the urine filter paper samples alone. The limit of quantification (LOQ) was determined for total Gb₃ isoforms as the lowest quantity of Gb₃ that can be measured within 20% of the target concentration.

Stability of total Gb₃

The use of urine filter paper samples in mass or high-risk screening programmes requires the evaluation of the stability of the metabolites of interest (Cyr et al 1997), in particular regarding shipment by mail and storage of specimens. Different concentrations of total Gb₃ isoforms standards with the C_{17:0}-Gb₃ IS were added to 5 cm discs containing 1 ml of a random urine filter paper samples. The filter papers

were stored in plastic bags for a period of 7 weeks at different temperature conditions (room temperature, 4°C, -20°C, -80°C), allowing sufficient time to evaluate Gb₃ stability. All analyses were performed in triplicate at time 0 and every week for the selected timetable. Results were quantified as previously described and a coefficient of variation was calculated for each concentration under the four conditions.

Results

Filter paper urine sample processing

Elution procedure

Optimal elution results with the best recovery percentages of total Gb₃ from urine filter paper samples (using MRM) were obtained while shaking the filter papers for 1 h with 4 mL of methanol with a mean recovery of 108.8% for concentrations varying from 0.125 to 100 µg/ml.

Sonication versus homogenization

Figure 1 shows the difference between the three groups studied. An increase in recovery of 16% to 52% was noticed in total Gb₃ concentrations ranging from 0.125 to 50 µg/ml when homogenizing samples compared to untreated samples,

respectively. We have thus opted for the homogenization technique, which is also less cumbersome than the sonication procedure. In summary, the following conditions were adopted: all filter paper samples were eluted with 4 ml of methanol, shaken for 1 hour, poured in glass tubes and homogenized for 30 s, and 50 μ l (full loop) was injected into the LC-MS/MS system.

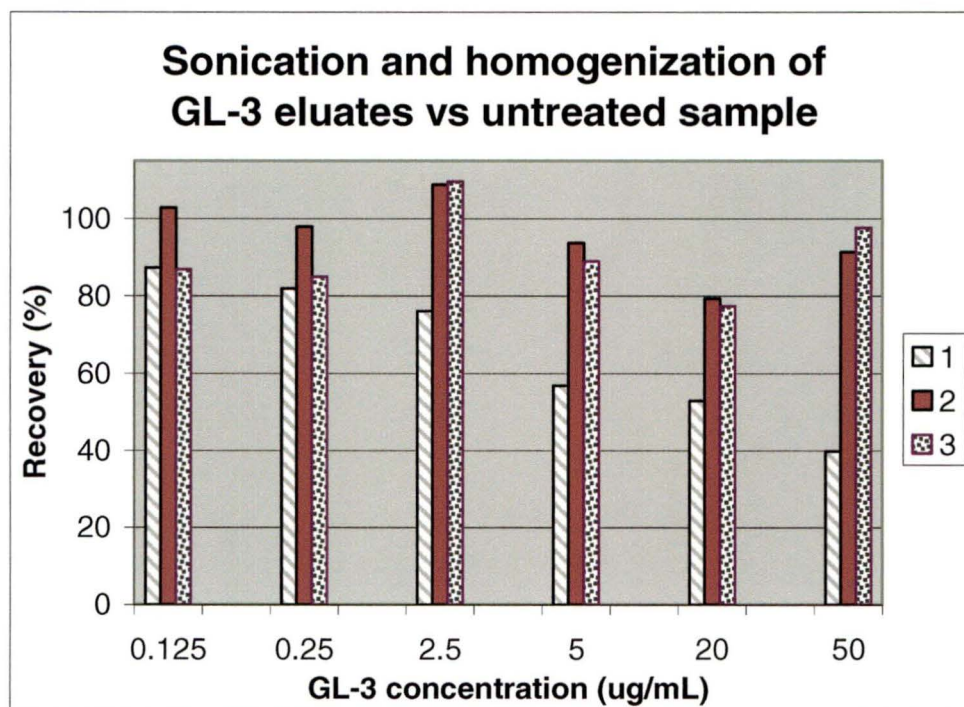


Figure 1. Histogram of the efficacy of sonication or homogenization procedures versus untreated samples at different total Gb₃ concentrations extracted from the eluate of urine filter paper samples: (1) untreated samples; (2) eluted samples homogenized for 30 s; (3) eluted samples sonicated for 60 s.

LC-MS/MS analysis

For 8 different Gb₃ isoforms and the IS extracted from the total ion chromatogram peaks at 2.61 and 2.78 min, the MRM transitions corresponding to the loss of a

galactosyl residue were: m/z 1046→884 (C_{16:0}), 1060→898 (C_{17:0}), 1074→912 (C_{18:0}), 1102→940 (C_{20:0}), 1128→966 (C_{22:1}), 1130→968 (C_{22:0}), 1156→994 (C_{24:1}), 1158→996 (C_{24:0}), 1174→1012 (C_{24:OH}).

Validation of method

At total Gb₃ isoforms final concentrations ranging from 0.125, 0.25, 2.5, 5, 20 to 50 µg/ml eluted from urine filter paper samples, the mean recovery of the different assays (n = 4) is 86.9%, 95.4%, 104.9%, 104.7%, 97.1%, 75.2%, respectively. The linearity of the response was good at concentrations from 0.125 to 50 µg/ml, with a mean correlation coefficient of 0.977. The precision and reproducibility of the method were good, with mean coefficient of variation (CV%) of 10.5% for the intra-day assays (concentrations of 0.5 and 15 µg/ml) and 11.1% for the inter-day assays (concentrations of 0.125 and 50 µg/ml). The lowest LOD and LOQ attained for total Gb₃ were 2.5 ng/ml and 50 ng/ml, respectively. The stability of total Gb₃ for a period of 7 weeks was confirmed with a mean recovery of 116.7% at 0.25 µg/mL and 99.5% at 20 µg/ml for all temperature conditions.

Applicability of the urine filter paper method to Fabry hemizygotes, heterozygotes and controls

Results of total urinary Gb₃ concentrations of 85 urine samples dried onto filter paper from Fabry hemizygotes, heterozygotes and controls are presented in Fig. 2.

We established normal total Gb₃ excretion with 43 control samples with values below 0.1 mg/mmol creatinine (mean value and standard deviation of 0.043 +/- 0.02 mg/mmol creatinine, the lowest normal value being 0.018 mg/mmol creatinine). We found that eight untreated Fabry hemizygotes presented a higher level of total Gb₃, ranging from 0.52 to 177.7 mg/mmol creatinine, compared to controls, the lowest level being from a patient with the R112H mutation, while 15 treated hemizygotes on ERT had values from 0.08 to 5.51 mg/mmol creatinine. Sixteen non treated heterozygotes had values from 0.05 to 340 mg/mmol creatinine and three heterozygotes on ERT had values ranging from 0.20 to 2.50 mg/mmol creatinine. Two had the lowest values: a nontreated asymptomatic female carrier again with the R112H mutation had a Gb₃ value within normal range (0.05 mg/mmol creatinine), as well as another nontreated female carrier who was minimally symptomatic (0.09 mg/mmol creatinine). We found a tremendous total Gb₃ variation among untreated carriers, again emphasizing the heterogeneous aspect of the disease depending on the gene mutation. In fact, three heterozygotes with the Q386X mutation who were more than 60 years old excreted the highest levels of Gb₃ (340.0, 15.3, 4.4 mg/mmol creatinine) in their group. Furthermore, the highest Gb₃ level in the hemizygote group (177.7 mg/mmol creatinine) was present in a 43-year-old Fabry untreated hemizygote having the same Q386X mutation.

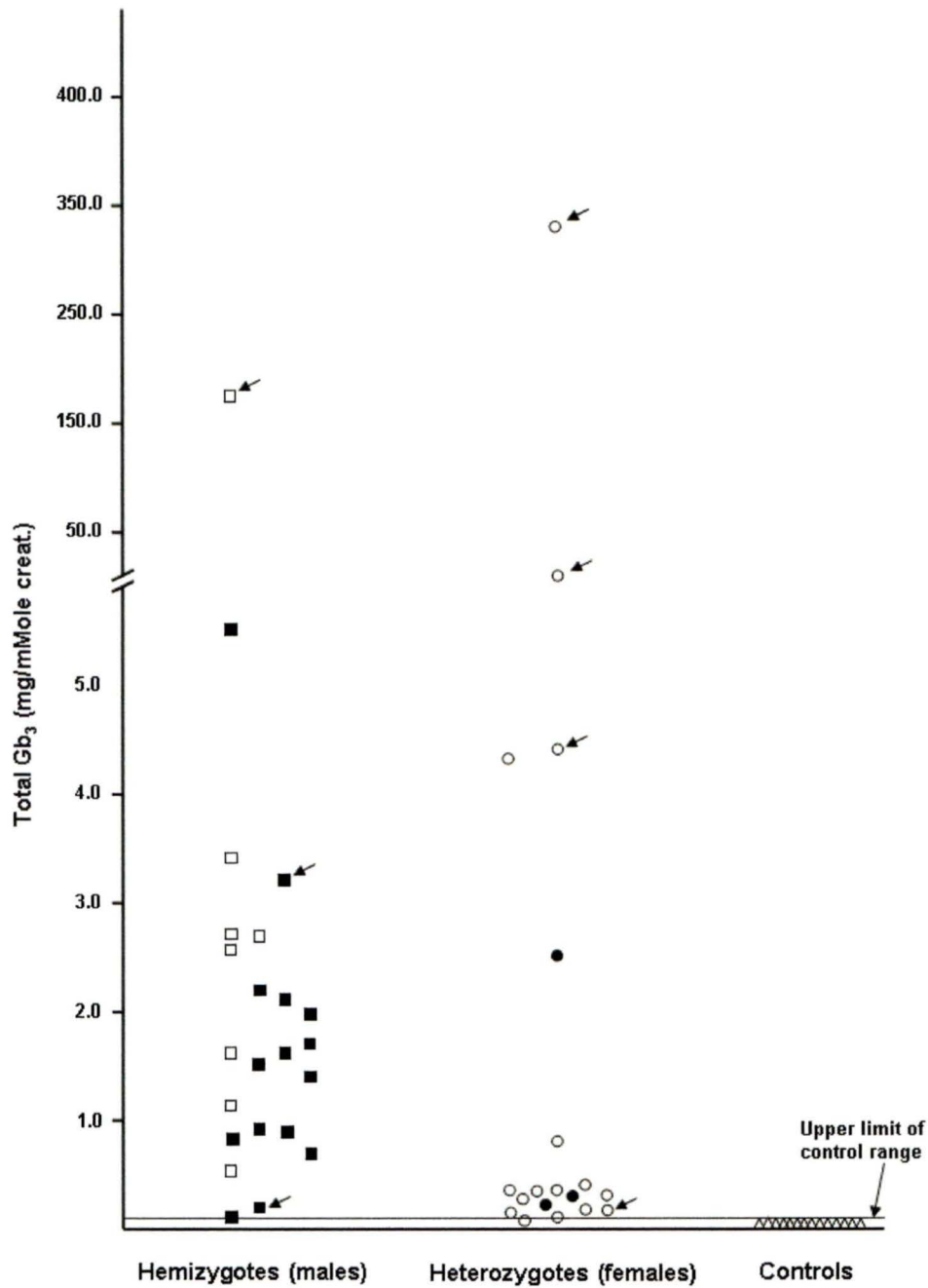


Figure 2. Total urinary Gb₃ (mg/mmol creatinine): □ untreated hemizygotes ($n = 8$); ■ hemizygotes on ERT ($n = 15$); ○ untreated heterozygotes ($n = 16$); ● heterozygotes on ERT ($n = 3$); △ controls ($n = 43$). The arrows represent patients with the Q386X mutation

Discussion

Urine is a medium of choice for analysis of lysosomal storage disorder (LSD) biomarkers, considering that they are often many times more elevated than in blood (Meikle et al 2004b; Mills et al 2005). In a family with Fabry disease, the urinary excretion per 100 ml did not increase with age since a newborn infant excreted approximately the same increased amount of Gb₃ as the oldest surviving patient, aged 47 (Philippart et al 1969). The efficacy of new therapies, for the treatment of LSDs depends heavily on early detection and treatment, before the onset of irreversible pathology. Newborn screening for LSDs holds the promise of early detection (Meikle et al 2004a). However, in screening programmes, it is important to have simple techniques that are rapid and specific and where samples can be sent to laboratories easily, conveniently and without degradation. The proposed filter paper method addresses these criteria and greatly favours the collection, storage and shipment of samples at lower cost. It can be used in a feasibility study for mass screening, as well as in high-risk screening programmes for Fabry disease. Since Gb₃ excretion reflects the evolution of the storage in tubular kidney cells, this method is also convenient for the biochemical monitoring of total Gb₃ in Fabry hemizygotes on enzyme replacement therapy, since urine filter samples can be mailed directly to analysing laboratories. The stability of total Gb₃ on filter paper over a prolonged period was also confirmed. One important advantage of this method is that no protein precipitation is necessary. Also, no protein precipitate accumulates in the tubes after elution of the urine filter paper samples, compared to a technique using liquid urine specimens (Kitagawa et al

2005). Filter paper is an adsorbent that prevents many unwanted urine proteins from being eluted, while it favours the extraction and transfer of Gb₃ in the methanol phase when adequate shaking and homogenization are provided.

For more than three decades, urine screening for inborn errors of metabolism in newborn babies in the province of Quebec and the Nunavut region (in the northern part of Quebec), whereby parents voluntarily collect and send urine samples dried on filter paper, has proved to be reliable and inexpensive (Auray-Blais et al 1999, 2003). The filter paper total Gb₃ methodology reported could be applicable to a feasibility study for mass screening programmes in the newborn population and high-risk screening in biochemical genetics and metabolic laboratories.

Acknowledgements The authors would like to sincerely thank Dr Gerald P. Holmquist for his valuable comments and for carefully reviewing the manuscript, and Claude Alie, computer analyst, for his keen expertise. We express our gratitude to Drs Joe T.R. Clarke, Daniel Bichet and Bernard Lemieux for providing us with urine samples from their Fabry patients. We thank Genzyme Canada Inc. for providing grant support that made this study possible, and we are grateful to Waters for their continued support. R.D. holds the Canada Research Chair in “Genetics, Mutagenesis and Cancer”.

References

- Auray-Blais C, Giguère R, Girard JG, Lemieux B (1999) Le Programme de dépistage urinaire des nouveau-nés du Québec et la collaboration des parents. *Diagnostic et dépistage génétiques. Aspects cliniques, juridiques, éthiques et sociaux*. Sainte-Foy, Québec: Les Presses de l'Université Laval.
- Auray-Blais C, Giguère R, Lemieux B (2003) Newborn urine screening programme in the province of Quebec: an update of 30 years' experience. *J Inherit Metab Dis* **26**(4): 393-402.
- Boscaro F, Pieraccini G, la Marca G, et al (2002) Rapid quantitation of globotriaosylceramide in human plasma and urine: a potential application for monitoring enzyme replacement therapy in Anderson-Fabry disease. *Rapid Commun Mass Spectrom* **16**(16): 1507-1514.
- Chasson AL, Grady HJ, Stanley MA (1960) Determination of creatinine by means of automatic chemical analysis. *Tech Bull Regist Med Technol* **30**: 207-212.
- Cyr D, Giguère R, Tuchman M, Lemieux B (1997) Stability of urinary HVA and VMA on filter paper. *Early Hum Dev* **49**(2): 149-152.
- Desnick RJ, Dawson G, Desnick SJ, Sweeley CC, Krivit W (1971) Diagnosis of glycosphingolipidoses by urinary-sediment analysis. *N Engl J Med* **284**(14): 739-744.
- Desnick RJ, Brady R, Barranger J, et al (2003) Fabry disease, an under-recognized multisystemic disorder: expert recommendations for diagnosis,

management, and enzyme replacement therapy. *Ann Intern Med* **138**(4): 338-346.

Elleder M, Bradova V, Smid F, et al (1990) Cardiocyte storage and hypertrophy as a sole manifestation of Fabry's disease. Report on a case simulating hypertrophic non-obstructive cardiomyopathy. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **417**(5): 449-455.

Eng CM, Guffon N, Wilcox WR, et al (2001) Safety and efficacy of recombinant human alpha-galactosidase A-replacement therapy in Fabry's disease. *N Engl J Med* **345**(1): 9-16.

Fauler G, Rechberger GN, Devrnja D, et al (2005) Rapid determination of urinary globotriaosylceramide isoform profiles by electrospray ionization mass spectrometry using stearyl-d35-globotriaosylceramide as internal standard. *Rapid Commun Mass Spectrom* **19**(11): 1499-1506.

Fuller M, Sharp PC, Rozaklis T, et al (2005) Urinary lipid profiling for the identification of Fabry hemizygotes and heterozygotes. *Clin Chem* **51**(4): 688-694.

Kitagawa T, Ishige N, Suzuki K, et al (2005) Non-invasive screening method for Fabry disease by measuring globotriaosylceramide in whole urine samples using tandem mass spectrometry. *Mol Genet Metab* **85**(3): 196-202.

Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF (1999) Prevalence of lysosomal storage disorders. *Jama* **281**(3): 249-254.

Meikle PJ, Fietz MJ, Hopwood JJ (2004a) Diagnosis of lysosomal storage disorders: current techniques and future directions. *Expert Rev Mol Diagn* **4**(5): 677-691.

-
- Meikle PJ, Ranieri E, Simonsen H, et al (2004b) Newborn screening for lysosomal storage disorders: clinical evaluation of a two-tier strategy. *Pediatrics* **114**(4): 909-916.
- Mills K, Johnson A, Winchester B (2002) Synthesis of novel internal standards for the quantitative determination of plasma ceramide trihexoside in Fabry disease by tandem mass spectrometry. *FEBS Lett* **515**(1-3): 171-176.
- Mills K, Morris P, Lee P, et al (2005) Measurement of urinary CDH and CTH by tandem mass spectrometry in patients hemizygous and heterozygous for Fabry disease. *J Inherit Metab Dis* **28**(1): 35-48.
- Nakao S, Kodama C, Takenaka T, et al (2003) Fabry disease: detection of undiagnosed hemodialysis patients and identification of a "renal variant" phenotype. *Kidney Int* **64**(3): 801-807.
- Philippart M, Sarlieve L, Manacorda A (1969) Urinary glycolipids in Fabry's disease. Their examination in the detection of atypical variants and the pre-symptomatic state. *Pediatrics* **43**(2): 201-206.
- Roddy TP, Nelson BC, Sung CC, et al (2005) Liquid chromatography-tandem mass spectrometry quantification of globotriaosylceramide in plasma for long-term monitoring of Fabry patients treated with enzyme replacement therapy. *Clin Chem* **51**(1): 237-240.
- Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, et al (2006) High incidence of later-onset Fabry disease revealed by newborn screening. *Am J Hum Genet* **79**(1): 31-40.
- Utsumi K, Mitsunashi F, Asahi K, et al (2005) Enzyme replacement therapy for Fabry disease: morphologic and histochemical changes in the urinary sediments. *Clin Chim Acta* **360**(1-2): 103-107.

Whitfield PD, Calvin J, Hogg S, et al (2005) Monitoring enzyme replacement therapy in Fabry disease-role of urine globotriaosylceramide. *J Inherit Metab Dis* **28**: 21-33.

Chapitre III - Deuxième Article

Quebec Neonatal Mass Urinary Screening Programme: from micromolecules to macromolecules.

C. Auray-Blais*, D. Cyr, R. Drouin *Journal of Inherited Metabolic Disease*, (2007), June. Accepté pour publication.

Christiane Auray-Blais a élaboré l'infrastructure et les protocoles; elle a conçu toutes les techniques et développé les méthodologies utilisées au niveau du Programme de dépistage urinaire. Face au projet sur la spectrométrie de masse en tandem pour les macromolécules, Christiane Auray-Blais a conçu le projet de recherche, élaboré le protocole et développé la méthodologie. Elle a rédigé la demande pour le Comité d'éthique de la recherche sur l'humain. Elle a fait les démarches pour obtenir les échantillons d'urine essentiels au projet, autant pour les contrôles que pour les patients atteints de la maladie de Fabry. Elle a réalisé le travail en laboratoire de façon majoritaire. Un support technique a été apporté par Monsieur Denis Cyr au niveau du développement du protocole en spectrométrie de masse en tandem. La rédaction de cet article relève dans son entièreté de Christiane Auray-Blais. Elle est l'auteure correspondante pour cet article.

Résumé

Le Programme de dépistage urinaire de maladies métaboliques héréditaires, débuté au Québec en 1971, a permis le dépistage de plus de 2 500 000 nouveau-nés pour 25 erreurs innées du métabolisme qui sont divisées en deux groupes. Le premier groupe a trait aux troubles du cycle de l'urée (citrullinémie, hyperargininémie, acidurie argininosuccinique), à l'hyperglycinémie cétotique et aux aciduries organiques (acidurie méthylmalonique, acidurie glutarique type I, etc.); le deuxième groupe concerne les troubles du métabolisme des acides aminés (cystathioninurie, déficience en prolidase, etc.) et de transport (syndrome de Fanconi, cystinurie, maladie de Hartnup, etc.) L'objectif de ce Programme est de détecter et de prévenir ces maladies (certaines se manifestant uniquement dans l'urine) avant l'apparition de symptômes cliniques. Nous avons développé une technique simultanée d'analyse par chromatographie sur couche mince où nous pouvons visualiser différents métabolites tels les acides aminés et les acides organiques urinaires et ce, par une vaporisation séquentielle de 4 réactifs différents. La technique est simple, reproductible, économique et rapide (500 échantillons analysés quotidiennement par une technicienne). La collaboration volontaire des parents est de 90%. Nous avons établi au fil des ans une procédure de fonctionnement dynamique, en poursuivant le développement de nouvelles techniques ou en ajoutant de nouveaux réactifs à la méthodologie existante afin de dépister le plus grand nombre possible de maladies. Nous évaluons actuellement la possibilité d'une étude de faisabilité pour l'analyse d'une macromolécule associée aux maladies de surcharge, le globotriaosylcéramide (Gb₃), un biomarqueur pour la maladie de Fabry. Nous présentons donc la méthodologie, l'infrastructure mise en place, les résultats et les plus récentes

statistiques du Programme de dépistage urinaire. Nous présentons aussi une étude par spectrométrie de masse en tandem de l'analyse urinaire du Gb₃ pour la maladie de Fabry. Cette analyse du Gb₃ offre la possibilité d'un suivi et d'un monitoring des patients sous traitement. Elle offre aussi la possibilité d'un dépistage à haut risque et ouvre la voie à une éventuelle étude de faisabilité d'analyse du Gb₃ dans une population donnée.

Quebec Neonatal Mass Urinary Screening Programme: From micromolecules to macromolecules

C. Auray-Blais C*, D. Cyr, R. Drouin

Service of Genetics, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, 3001, 12th Avenue North, Sherbrooke, Qc, Canada J1H 5N4

**Corresponding author: Service of Genetics, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, 3001, 12th Avenue North, Sherbrooke, Qc, Canada J1H 5N4*

Tel.: +1 819 820-6827; fax: +1 819 564 5217.

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

Funding for the Mass Urinary Screening Programme: Quebec Ministry of Health and Social Services
Grant support for the Fabry disease study: Partial funding by Genzyme Canada Inc.

Word counts (text): 1 764

Word counts (abstract): 259

Number of Figures: 5

Number of Table: 1

Submitted to: **Journal of Inherited Metabolic Disease**
Official Journal of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism
Editors-in-Chief: G.F. Hoffmann; Prof. Pollitt, Prof. Torresani
Dr Verena Peters, Managing Editor
Springer Netherlands

Abstract

The Quebec Mass Urinary Screening Programme, initiated in 1971, has resulted in the screening of more than 2 500 000 newborns in the province of Quebec for 25 inherited Mendelian disorders divided into 2 groups. The first group concerns urea cycle disorders (citrullinaemia, hyperargininaemia, argininosuccinic aciduria), ketotic hyperglycinaemia, and organic acidurias (methylmalonic aciduria, glutaric aciduria type 1, etc.); the second group relates to disorders of amino acid metabolism (cystathionuria, prolidase deficiency, etc.) and transport (Fanconi syndrome, cystinurias, Hartnup syndrome, etc.). The main goal of the Programme is to detect and prevent these genetic diseases, some detectable only in urine, before the onset of clinical symptoms. A multiplex thin-layer chromatography methodology was developed, in which metabolites in urine are resolved and visualized by the sequential application of four different reagents to detect aminoacidopathies and organic acidurias. The technique is simple, reproducible, inexpensive and rapid, allowing the analysis of 500 samples daily by a single technician. The voluntary compliance of the parents is excellent, averaging 90% per year. Over the years, we have established a dynamic process, developing techniques or new reagents to detect as many treatable disorders as possible, now evaluating macromolecules associated with lysosomal storage disorders, mainly globotriaosylceramide (Gb₃) for Fabry disease. We present here the methodology, infrastructure in place, results and recent statistics of the well-established Quebec Mass Urinary Screening Programme. We also report a study by tandem mass spectrometric analysis of urinary Gb₃ in Fabry disease for the follow-up and

monitoring of Fabry patients, as well as for its possible application to mass and high-risk screening programmes.

Sentence summary: The Quebec Mass Urinary Screening Programme for inherited metabolic disorders of aminoacidopathies and organic acidurias, in the newborn population, has been in place for more than 35 years. The main goal of the Programme is early detection and prevention of genetic diseases, some only detectable by analysis of urine, before the onset of symptoms. Voluntary parental compliance in submitting urine samples collected on filter paper from their babies is excellent at 90%. Also, a study of the use of a biomarker for Fabry disease, globotriaosylceramide (Gb₃), using urine filter paper samples analysed by liquid chromatography tandem mass spectrometry has been initiated.

Keywords: Mass screening, urine, inherited metabolic disorders, filter paper, Fabry disease, Gb₃, LC-MS/MS

Abbreviated title: Mass Urinary Screening for inherited metabolic disorders.

Abbreviations:

AA	amino acid(s)
AO	organic acids
CHUL	Centre hospitalier de l'Université Laval
CHUS	Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke
ES ⁺	electrospray ionization in positive-ion mode
Gb ₃	GL-3 or CTH (ceramide trihexoside); globotriaosylceramide
GC-MS	gas chromatography-mass spectrometry

IS	internal standard (C _{17:0} -Gb ₃)
LC	liquid chromatography
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LSDs	lysosomal storage disorders
MCH	Montreal Children's Hospital
MRM	multiple reaction monitoring
TLC	thin-layer chromatography

Authors' contribution

Christiane Auray-Blais declares: I participated in the research, development, planning, conduct and reporting of the work described in this article.

Denis Cyr contributed to the LC-MS/MS technical support and reporting of the work described in this article.

Régen Drouin contributed to the planning and reporting of the work described in this article.

The three co-authors contributed to the drafting of the manuscript and have seen and approved this final version in view of its publication.

Guarantor for the article

Christiane Auray-Blais accepts full responsibility for the work and the conduct of this study, and had access to the data, and controlled the decision to publish.

Competing interest statement

All authors confirm that they have no competing interests for declaration.

Details of Funding

The Mass Urinary Screening Programme is supported by the Ministry of Health and Social Services of the Province of Quebec. Genzyme Canada Inc. provided partial funding of the work on Fabry disease. The authors confirm independence from the sponsors; the content of the article has not been influenced by the sponsors.

Ethics approval

The REB of the Sherbrooke Medical Centre and the Faculty of Medicine and Health Sciences of the Université de Sherbrooke gave their approval for the work on Fabry disease. Ethics approval was not required for the Mass Urinary Screening Programme, being a voluntary cooperation programme from the parents.

Introduction

The Mass Urinary Screening Programme for newborns in the province of Quebec to detect inborn errors of metabolism of amino acids and organic acids was implemented in 1971, supported by the Quebec Ministry of Health and Social Services. At that time, newborn urine samples were collected at 5 days of age by the nurses in the hospitals in Quebec. Soon, we noticed that we had an unacceptable number of false-positives, and we could have false-negatives, the collection of urine being too early in life. The decision was made in 1973, to delay the time for the

urine collection to 14 days of age, and since 1981 the urine samples have been collected by the parents when the babies are 21 days old.

Samples are collected on a filter paper, left to dry at room temperature and returned by mail to the Screening Programme laboratory in Sherbrooke, Quebec. Voluntary cooperation by the parents has resulted in an average of 90% of the newborns being tested throughout the years, confirming their interest in this preventive genetic medicine programme. We routinely screen for 25 inherited Mendelian disorders that are divided into 2 groups: (1) those causing severe clinical problems which require immediate therapeutic intervention, such as urea cycle disorders, ketotic hyperglycinemia and organic acidurias; (2) those metabolic and transport disorders requiring surveillance and follow-up. This programme has always been a dynamic process to increase the number of treatable disorders screened (Auray-Blais et al 1978, 1979, 1989). It is also viewed as a component of a comprehensive programme and as a means to communicate directly with the parents, an advantageous form of genetic education (Auray-Blais et al 2003; Lemieux et al 1988). We present here the methodology, the flowsheet depicting the processing of samples, the results and latest statistics, and our research interest in examining larger molecules excreted in urine in lysosomal storage disorders (LSDs), particularly Fabry disease (Auray-Blais et al 2007).

Materials and methods

Collection and processing of urine samples

Before leaving the hospital, mothers of newborn infants receive two kits; one kit contains a filter paper (Whatman no. 903), a yellow identification form, and a leaflet to explain the way the programme works and promote informed participation from the parents; the second kit contains two absorbent pads and instructions on the collection procedure. This latter kit is sponsored by private companies (e.g. Cascades Inc.) in the province of Quebec, a great synergy between the private and public sectors. Mothers giving birth at home receive the kits from midwives. We ask parents to soak the filter paper completely with urine and leave it to dry before mailing the sample in the return, pre-addressed envelope. Upon reception, the filter papers are examined under ultraviolet light to determine whether there is sufficient urine free of contamination with faeces and then numbered, and a 5 cm disc is punched out, folded in half and deposited in glass bottles. Elution is then performed by adding 3 ml of 0.01 mol/L NH_4OH , shaking on a rotary shaker for 10 minutes and pouring the eluates into polyethylene conical cups. Five hundred samples are deposited on the thin-layer plates in one hour with a semi-automatic spotting device (Shapcott et al 1972), whereby 15 μl is applied for thin-layer chromatography. There are 20 samples and 3 standards per plate.

Thin-layer chromatography

All screening analyses are performed by thin-layer chromatography (TLC), being simple, rapid, reproducible and inexpensive. We prepare our own TLC plates

on reusable 16 cm x 20 cm glass plates by spreading a slurry of cellulose (75%), silica gel G (25%) and water, previously mixed in a blender, using an automatic spreading machine. One hundred plates are prepared in about 40 min, and left to dry horizontally for 24 h in a desiccating cabinet before use. They are used without further activation. Solvent migrations are performed by depositing the plates in vertical stainless-steel racks, allowing two ascending unidimensional migrations in 1-butanol-acetic acid-water (13:3:5), for one hour, with drying at 50°C in the oven in between migrations in order to obtain better resolution. A multiplex staining technique is performed by using four different sprays in sequence on the same plate: (1) bromocresol green (Sigma, St Louis, MO, USA) for organic acids is first applied on the upper part of the TLC plates, while covering the lower part with a plastic shield; (2) *ortho*-dianisidine (Sigma) is then applied over the previous spray, on the same plate, to detect methylmalonic acid (Auray-Blais et al 1979), while covering the lower part of the plate; (3) the plastic shield is removed and ninhydrin (Sigma) is applied on the lower part; (4) the last spray to be applied is Ehrlich's reagent, specific for citrulline. The chemical preparation and technique application of the four different sprays have been described previously (Auray-Blais et al 2003, Lemieux et al 1988). The plates are examined under fluorescent light to identify abnormal samples.

Recalling samples or referral procedures

If an abnormality is detected, two possibilities exist. (1) If it is a disorder that may cause severe clinical problems, such a an increase in amino acids from the

urea cycle (e.g. citrulline, arginine, argininosuccinic acid) or a high increase in organic acids (e.g. methylmalonic acid, glutaric acid), quantitative analysis of amino acids is then performed, by ion-exchange chromatography (Biochrom 30) or of organic acids by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (Agilent) before referral. The baby is referred immediately to one of four referral centres by phoning the parents and explaining the situation. The parents choose the referral centre that is more convenient to them and where they wish their child to be followed up. (2) If it is a transport disorder, such as a cystinuria, Hartnup syndrome or Fanconi syndrome, a second specimen is requested in order to verify whether the abnormality is due simply to immature renal transport metabolism. Upon receiving the second urine specimens, we measure the creatinine concentration (Chasson et al 1960) in order to deposit a precise quantity of the eluate for TLC. If the profile is again abnormal, the child is referred to one of the referral centres for further investigation, diagnosis, management, follow-up and parental counselling.

LC-MS/MS

In response to the development of new, potentially effective, approaches to the treatment of lysosomal storage diseases, particularly by enzyme replacement therapy, we undertook to identify novel urinary biomarkers that could potentially be applicable to mass and high-risk urine screenings. We are currently conducting a feasibility study for macromolecules, such as biomarkers for lysosomal storage disorders, particularly Fabry disease. Tandem mass spectrometry has proved to be an efficient and sensitive technology for analysis of urinary globotriaosylceramide

(Gb₃) in Fabry disease. We have developed and validated a rapid, simple and efficient technique for the analysis of total Gb₃ in urine collected on filter paper sample (Auray-Blais et al 2007). This technique needs no extraction, centrifugation or evaporation steps. A C_{17:0}-Gb₃ IS (1 µg) is added to each 5 cm filter paper disc, which is punched out, folded in half and deposited in a glass vial. The elution is performed by adding 4 ml of methanol to each vial, shaking on a rotary shaker (New Brunswick Scientific, NJ, USA) for 1 h. The eluates are then poured into glass tubes and homogenized for 30 s to disrupt any intact epithelial cells, such as distal tubular cells, containing Gb₃ and 50 µl is injected in the LC-MS/MS system. We use a Quattro micro triple quadrupole (Waters Micromass) with electrospray ionization operated in positive-ion mode (ES⁺), coupled to an Alliance 2795 LC. The LC-MS/MS parameters for the analysis of total Gb₃ on urine filter paper samples have been published recently (Auray-Blais et al 2007).

Results

More than 2 500 000 newborns' urine samples have been analysed by TLC since 1971, including 72,000 in the year 2006. Figure 1 presents the flowsheet depicting the processing of samples in the Urinary Screening Programme. Figure 2 shows four TLC plates sequentially sprayed (from (a) to (d)) for the detection of organic acids and amino acids.

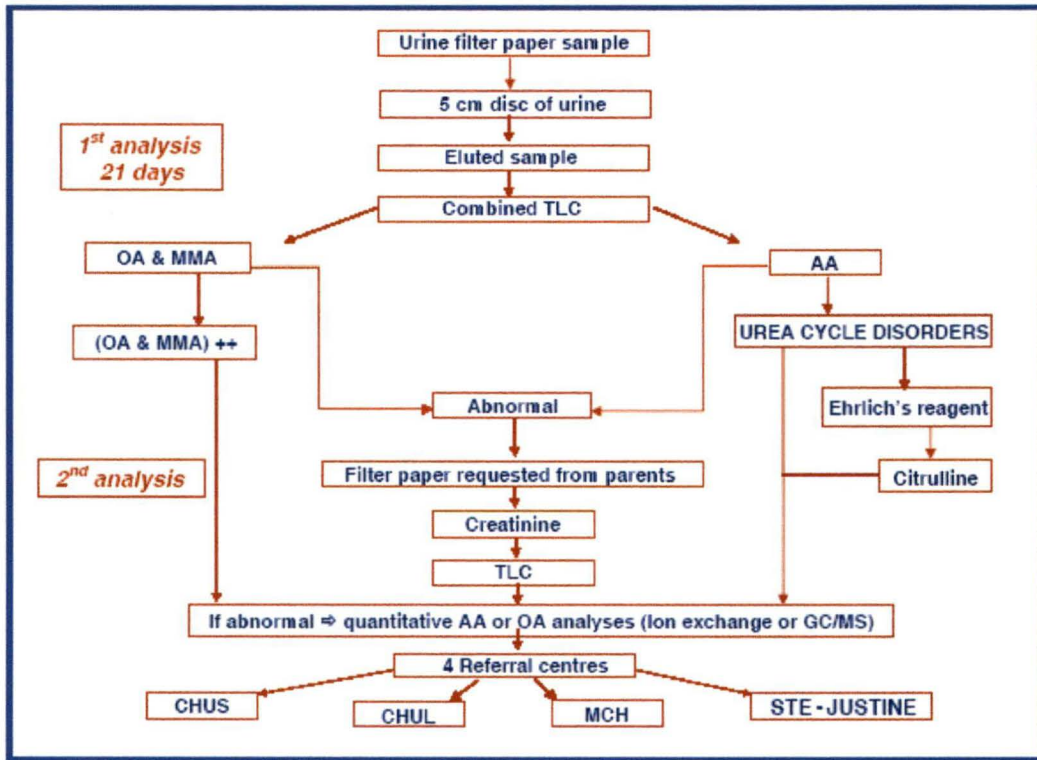


Figure 1. Flowsheet of the Mass Urinary Screening Programme depicting the processing of samples.

Figure 2. a)

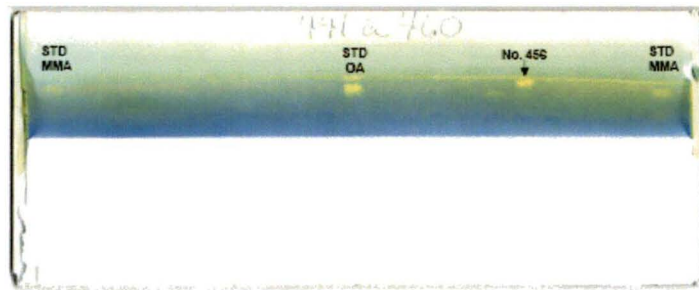


Figure 2. b)

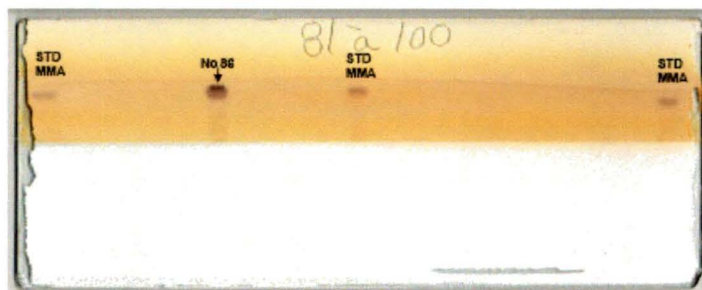


Figure 2. c)



Figure 2. d)

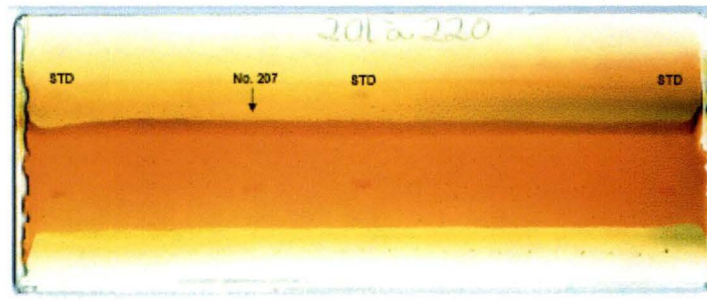


Figure 2. Multiplex thin layer chromatography plate, where four different reagents are applied sequentially: **(a)** TLC plate sprayed with the first reagent, bromocresol green for organic acids, where a case of glutaric aciduria type I patient is presented (No 456); there are two standards of methylmalonic acid (STD MMA) on each side of the plates and in the center a standard mixture of lactic acid, hexanoylglycine, 3-hydroxy-3-methylglutaric acid and MMA (STD OA); **(b)** TLC plate sprayed with the second reagent, *ortho*-dianisidine, with a case of methylmalonic acid (no 86); **(c)** TLC plate sprayed with the third reagent, ninhydrin for amino acids, where cases of citrullinaemia (no 207) and homozygote cystinuria (no 215) are detected; **(d)** fourth and final spray, Ehrlich's reagent for citrulline, proline, homocitrulline, applied to the same TLC plate as in **(c)**, with the confirmed case of citrullinaemia at no 207; the increase in citrulline appears specifically as a reddish spot on a yellow background.

Figure 3 shows the compliance of the parents in recent years.

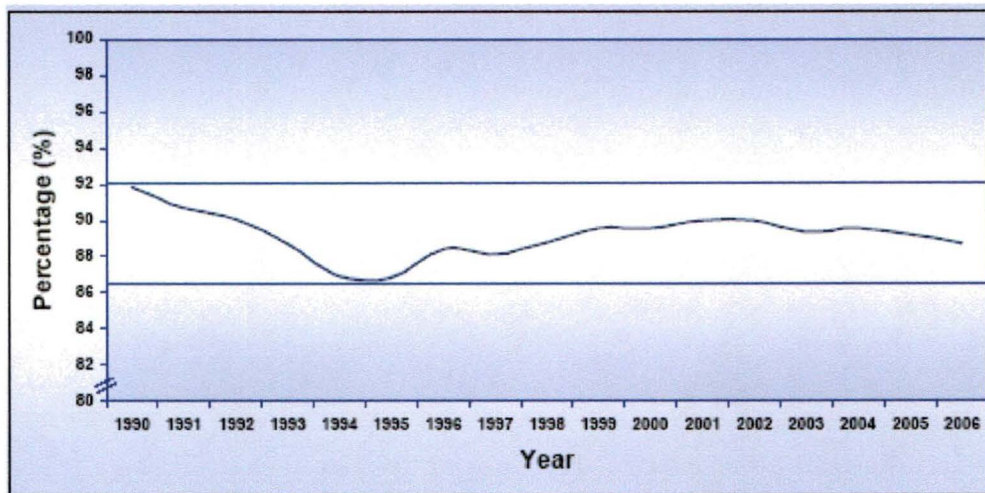


Figure 3. Voluntary parental compliance (%) in submitting urine samples collected on filter paper in recent years.

Table 1 presents the latest statistics of confirmed cases detected by the Quebec Mass Urinary Screening Programme. Two rare cases of citrullinemia type II, the neonatal onset form, were detected at 21 days of age by urine screening, being the first two caucasians patients detected. Contrary to low-protein diets given to patients with citrullinaemia type I, both children with citrullinaemia type II are doing well on a high-protein diet (4g/kg weight per day) (Ohura et al 2001).

Regarding the Fabry project, Figure 4 shows urine filter paper samples of a Fabry patient and a control analysed by LC-MS/MS. Figure 5 presents the stability of total Gb₃ on filter paper for at least 7 weeks, giving us sufficient time to receive the samples by mail without degradation of the samples. The mean recovery is 116.7% at 0.25 µg/ml and 99.5% at 20 µg/ml for all temperature conditions (Auray-Blais et al 2007).

Table 1. Total incidence of confirmed findings in urine filter paper specimens collected at 21 days of age from 1973 to 2006

Disorders	OMIM no.	Number of identified cases	Total incidence
<i>Disorders requiring early medical intervention</i>			
Methylmalonic aciduria(s)*	251000, 251100, 277380	60	
Argininosuccinic aciduria**	207900	17	
Citrullinemia, classic	215700	5	
Citrullinemia type II	605814	2	
Ketotic hyperglycinemia	606054	4	
Hyperargininemia	207800	4	
Methylcrotonylglycinuria***	210200	3	
Glutaric aciduria type I	231670	1	
HHH syndrome	238970	1	
			1: 25 500
<i>Conditions requiring only counselling and surveillance</i>			
Disorders of amino acid metabolism			
Histidinemia	235800	233	
Sarcosinemia	268900	166	
Cystathioninuria	219500	26	
Prolidase deficiency	+170100	2	
			1: 5 800
Disorders of amino acid transport			
Cystinuria (homozygote range)	220100	143	
Cystinuria (heterozygote range)	220100	989	
Fanconi syndrome	227810	18	
Dicarboxylicaminoaciduria	222730	69	
Hartnup disorder	234500	56	
			1: 1 900
*	2 342 029 babies screened for methylmalonicaciduria (screening started in 1975)		
**	2 469 929 babies screened for aminoacidurias (screening started in 1973)		
***	414 961 babies screened for other organic acidurias (screening started in 2000)		

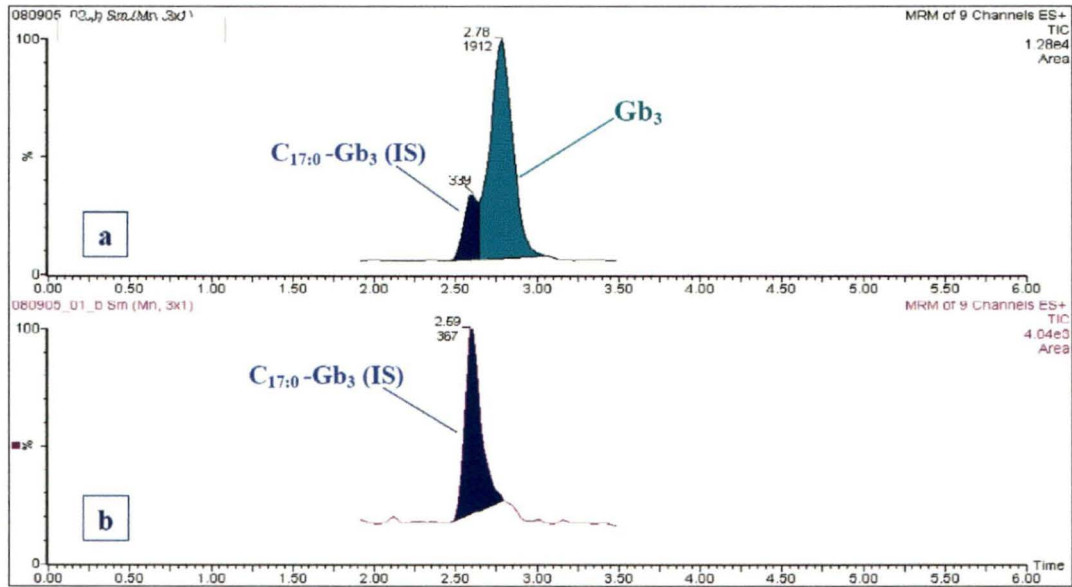


Figure 4. Urine filter paper samples analysed by LC-MS/MS in multiple reaction monitoring (MRM) mode: **(a)** Fabry disease patient + C_{17:0}-Gb₃ (IS); **(b)** Control sample + C_{17:0}-Gb₃ (IS).

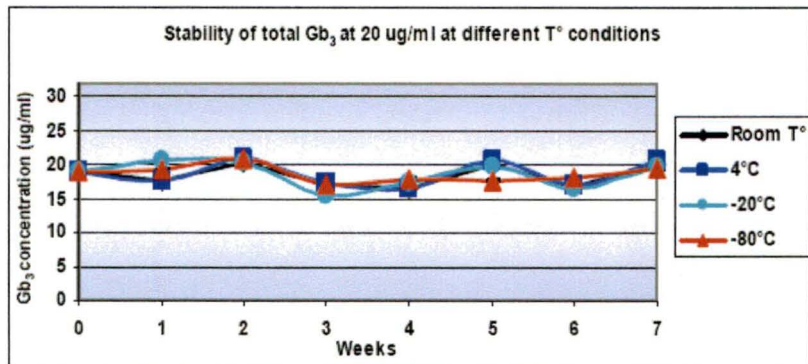
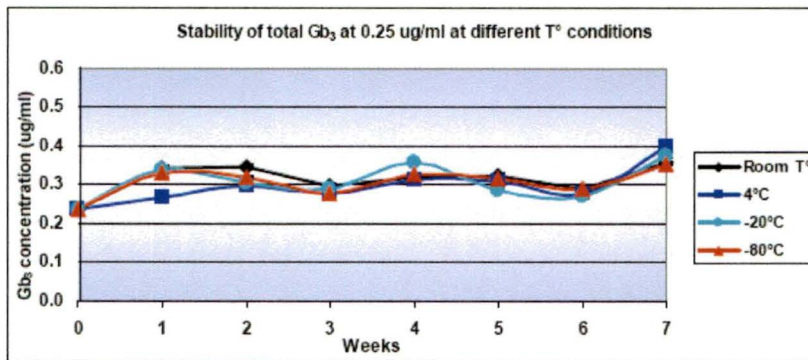


Figure 5. Stability of total Gb₃ on filter paper at 0.25 and 20 µg/mL under different temperature conditions for 7 weeks.

Discussion

The Quebec Mass Urinary Screening Programme requires the informed participation of the parents. The parents receive complete information about the programme before collecting and submitting urine from their babies. They are provided with contact information enabling them to contact us by phone, mail or email, and invited to inquire about the objectives of the Programme. The parents pay the postage for return their baby's urine filter paper in a preaddressed envelope. The compliance of the parents did not falter throughout the years, maintaining an average of 90%. A slight decrease in cooperation was observed during the years in which we performed a neuroblastoma pilot project, when the parents had to collect two samples, one at 21 days and one at 6 months (Auray-Blais et al 1989). Means have been put in place to inform the parents about the urinary screening (Auray-Blais et al 2003).

The TLC technique used is simple, rapid, reproducible, inexpensive (~ CAD 4.50\$ /sample) and has permitted screening for 25 metabolic or transport disorders, before the onset of symptoms and prevented clinical problems in hundreds of children. Certain inborn errors of metabolism, notably disorders of amino acid transport, can be detected only by analysing urine samples (cystinurias, Fanconi syndrome, Hartnup syndrome, etc.).

The use of urine filter paper samples for total Gb3 analysis allows collection, storage and shipment of samples at lower cost without degradation. Our interest in developing a simple and efficient technique for screening for larger molecules is now oriented towards the follow-up and management of Fabry patients treated by enzyme replacement therapy and could be applicable eventually to a feasibility study for mass screening programmes in the newborn population and high-risk screening in biochemical genetics and metabolic laboratories.

Acknowledgements

We thank Dr Joe T.R. Clarke from the Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke for reviewing the manuscript. We acknowledge the work of our dedicated and skilful personnel. We thank Francine Cloutier, Nicole Labbé, Donalda Thebaud and Yolande Lefèvre, coordinating nurses at the four referral centres, for their excellent work. The Mass Urinary Screening Programme is supported by the Ministry of Health and Social Services of the Province of Quebec. Genzyme Canada Inc. provided partial funding of the work on Fabry disease. Waters has also provided continued financial support. R.D. holds the Canada Research Chair in "Genetics, mutagenesis and cancer".

References

Auray-Blais C, Giguere R, Draper P, Shapcott D, Lemieux B (1978) Simple and rapid system for screening and identification of reducing sugars in urine. *Clin Biochem* **11**(6): 235-237.

Auray-Blais C, Giguere R, Paradis D, Lemieux B (1979) Rapid thin-layer chromatographic method for the detection of urinary methylmalonic acid. *Clin Biochem* **12**(2): 43-45.

Auray-Blais C, Giguere R, Lemieux B (1989) Thin-layer chromatography of urinary homovanillic acid and vanillylmandelic acid for large-scale neuroblastoma mass screening. *Med Pediatr Oncol* **17**(5): 364-367.

Auray-Blais C, Giguere R, Lemieux B (2003) Newborn urine screening programme in the province of Quebec: an update of 30 years' experience. *J Inherit Metab Dis* **26**(4): 393-402.

Auray-Blais C, Cyr D, Mills K, Giguere R, Drouin R (2007) Development of a filter paper method potentially applicable to mass and high-risk urinary screenings for Fabry disease. *J Inherit Metab Dis*. **30**:106

Chasson AL, Grady HJ, Stanley MA (1960) Determination of creatinine by means of automatic chemical analysis. *Tech Bull Regist Med Technol* **30**: 207-212.

Lemieux B, Auray-Blais C, Giguere R, Shapcott D, Scriver CR (1988) Newborn urine screening experience with over one million infants in the Quebec Network of Genetic Medicine. *J Inherit Metab Dis* **11**(1): 45-55.

Ohura T, Kobayashi K, Tazawa Y, Nishi I, et al (2001) Neonatal presentation of adult-onset type II citrullinemia. *Hum Genet* **108**:87-90.

Shapcott D, Lemieux B, Shahapoglu A (1972) A semi-automatic device for multiple sample application to thin-layer chromatography plates. *J Chromatogr* **70**(1): 174-178.

Chapitre IV - Troisième Article

Urinary globotriaosylceramide excretion correlates with the genotype in children and adults with Fabry disease.

Christiane Auray-Blais, Denis Cyr, Aimé Ntwari, Michael L. West, Josanne Cox-Brinkman, Daniel G. Bichet, Dominique P. Germain, Rachel Laframboise, Serge B. Melançon, Tracy Stockley, Joe T.R. Clarke, Régen Drouin *

Soumis à *Clinical Chemistry*.

Christiane Auray-Blais a conçu le projet de recherche, élaboré le protocole et développé la méthodologie. Elle a rédigé la demande pour le Comité d'éthique de la recherche sur l'humain. Elle a fait les démarches pour obtenir les échantillons d'urine essentiels au projet autant pour les contrôles que pour les patients atteints de la maladie de Fabry. Elle a réalisé le travail en laboratoire de façon majoritaire. Un support technique a été apporté par Monsieur Denis Cyr en ce qui concerne l'utilisation et le développement du protocole de spectrométrie de masse en tandem. La rédaction de cet article relève dans sa totalité de Christiane Auray-Blais.

Résumé

Introduction: La maladie de Fabry est une maladie complexe, d'atteinte multisystémique et qui présente une grande hétérogénéité clinique. L'excrétion urinaire du globotriaosylcéramide (Gb₃), principal substrat accumulé suite au déficit enzymatique de l'alpha-galactosidase A, est plus importante que les concentrations de Gb₃ dans le plasma des patients hémizygotés et hétérozygotés atteints de la maladie. Notre premier objectif était de développer et de valider une méthode simple et simultanée du rapport Gb₃/créatinine par chromatographie liquide liée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) et ce, en utilisant des échantillons d'urine prélevée sur papier filtre. Notre deuxième objectif portait sur l'évaluation de la corrélation entre l'excrétion urinaire du rapport Gb₃/créatinine et le génotype d'enfants et d'adultes atteints de la maladie de Fabry.

Méthodologie: L'analyse du Gb₃ et de la créatinine fut développée et validée en une analyse simultanée ("multiplex") de 2.6 minutes. Des disques de 5 cm de diamètre furent découpés du papier filtre, élués, homogénéisés et analysés par LC-MS/MS. Nous avons étudié le rapport entre les niveaux d'excrétion du Gb₃/créatinine total et 4 types de mutations du gène *GLA* (mutations faux-sens, non-sens, du décalage du cadre de lecture et de jonction d'épissage) chez 32 enfants et 78 adultes atteints de la maladie.

Résultats: Le recouvrement moyen du Gb₃ et de la créatinine à partir d'urine déposée sur papier filtre était respectivement de 91% et de 97%. La précision, la reproductibilité et la linéarité de la méthodologie étaient acceptables. L'analyse statistique utilisant les variables indépendantes du sexe, de l'âge, des types de mutations et du traitement a démontré que le facteur "mutation" est statistiquement

significatif ($p = 0.0006$). Ceci signifie que le taux d'excrétion urinaire du Gb₃/créatinine chez les enfants et les adultes atteints de la maladie de Fabry est directement relié au type de mutations. La même corrélation fut observée pour le sexe ($p = 0.0001$) et le traitement ($p = 0.0005$).

Conclusions: Nous avons trouvé une corrélation hautement significative entre le niveau d'excrétion urinaire du Gb₃ total et les 4 types de mutations chez les patients atteints de la maladie de Fabry. De plus, l'excrétion urinaire de ce glycosphingolipide est directement reliée au sexe et au traitement, mais pas à l'âge.

Other Areas of Clinical Chemistry

Urinary globotriaosylceramide excretion correlates with the genotype in children and adults with Fabry disease

Christiane AURAY-BLAIS¹, Denis CYR¹, Aimé NTWARI¹, Michael L. WEST²,
Josanne COX-BRINKMAN³, Daniel G. BICHET⁴, Dominique P. GERMAIN⁵,
Rachel LAFRAMBOISE⁶, Serge B. MELANÇON⁷, Tracy STOCKLEY⁸, Joe T.R.
CLARKE¹, Régen DROUIN^{1*}

¹Service of Genetics, Dept of Pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences,
Université de Sherbrooke, 3001, 12th Avenue North, Sherbrooke, Quebec, Canada

²Dept of Medicine, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada

³ Dept of Pediatrics, Division of Metabolic Disorders, Academic Medical Centre,
Meibergdreef 9, 1105 AZ Amsterdam, The Netherlands

⁴ Centre de recherche, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, Montreal, Quebec,
Canada

⁵ Centre de référence de la maladie de Fabry et des maladies héréditaires du tissu
conjonctif, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Paris, France

⁶ Service de Génétique médicale, Dept of Pediatrics, Centre hospitalier universitaire
de Québec, Pavillon CHUL 2705, Laurier Blvd, Quebec, Quebec, Canada

⁷ Montreal Children's Hospital, 2300 Tupper Street, Montreal, Quebec, Canada

⁸ Dept of Pediatric Lab Medicine, Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario,
Canada

***Corresponding author:** Dr. Régen Drouin, Service of Genetics, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, 3001, 12th Avenue North, Sherbrooke, Qc, Canada J1H 5N4

Tel.: +1 819 820-6827; Fax: +1 819 564-5217.

E-mail: Regen.drouin@usherbrooke.ca

Running title: Gb₃ levels and genotype relationship in Fabry disease patients

Abbreviations:

Creat.: Creatinine

CV: Coefficient of variation

d3-creat: Deuterated creatinine

DF: Degrees of freedom

Den DF: Denominator degrees of freedom

ERT: Enzyme replacement therapy

ES: Electrospray

ESI-MS/MS: Electrospray ionization-tandem mass spectrometry

α -GAL: α -galactosidase

Gb₃: Globotriaosylceramide (GL-3 or CTH (ceramide trihexoside))

GLA gene: α -galactosidase A gene

HPLC: High-performance liquid chromatography

IS: Internal standard (C_{17:0}-Gb₃)

LC-MS/MS: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LOD: Limit of detection

Log: Logarithm

LOQ:	Limit of quantification
MRM:	Multiple reaction monitoring
Num DF:	Numerator degrees of freedom
NS:	Nova Scotia
PCR:	Polymerase chain reaction
RF:	Radiofrequency
SD:	Standard deviation
SSCP:	Single strand conformation polymorphism
TIC:	Total ion chromatogram

Abstract

Background: Fabry disease is a complex, multisystemic and clinically heterogeneous disease, in which the urinary excretion of globotriaosylceramide (Gb₃), the principal substrate of the deficient enzyme, alpha-galactosidase A, is more prominent than the increased concentrations of the lipid in the plasma of affected hemizygotes and heterozygotes. Our first aim was to develop and validate a simple and rapid multiplex Gb₃/creatinine methodology using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis of urine samples collected on filter paper. The second aim was to evaluate the relationship between urinary Gb₃/creatinine excretion and the genotype of children and adult patients with Fabry disease.

Methods: The analysis of Gb₃ and creatinine was developed and validated for use with a short multiplex LC-MS/MS run of 2.6 minutes, where 5-cm diameter urine filter paper discs were punched out, eluted, homogenized and analyzed by LC-MS/MS. We studied the relationship between the urinary levels of total Gb₃/creatinine excretion and four types of mutations in the *GLA* gene (missense, nonsense, frameshift, and splice-site defects) in 32 children and 78 adult patients with Fabry disease.

Results: The mean recoveries of Gb₃ and creatinine from the urine filter paper standards were 91% and 97%, respectively, with precision, reproducibility, and linearity within acceptable ranges. The statistical analysis using the independent variables of sex, age, types of mutations and treatment showed that the mutation factor is statistically significant ($p = 0.0006$). This means that the levels of urinary

excretion of Gb₃/creatinine in children and adults with Fabry disease are directly related to the type of mutation. The same correlation has been found for the sex ($p < 0.0001$) and treatment ($p = 0.0005$).

Conclusions: We found a highly significant correlation between the urinary excretion levels of Gb₃ and the types of mutations in adults and children with Fabry disease. The results also indicate that the urinary excretion of this specific glycosphingolipid biomarker is directly related to sex and treatment, but not age.

Fabry disease (OMIM 301500) is an X-linked lysosomal storage disorder caused by deficiency of the lysosomal hydrolase, α -galactosidase A (EC 3.2.1.22), leading to the accumulation primarily of one glycosphingolipid, globotriaosylceramide (Gb₃), in biological fluids, different organs and vascular endothelium (1-3). The incidence of the disease is difficult to establish with estimations of 1: 55 000 to 1:3 000 male births (4, 5) due to its heterogeneous clinical manifestations (2, 6, 7). This is probably an underestimate of the true frequency, considering milder variants of the disease (1, 5).

Studies have shown that mutations in the *GLA* gene, located at Xq22.1, encoding the lysosomal enzyme α -galactosidase A, are generally restricted to an individual kindred (8). More than 350 mutations have been identified to date (1, 9). The cloning and sequencing of the Fabry disease *GLA* gene, more than 20 years ago, has given way to molecular genetic studies revealing heterogeneous mutations, where major gene rearrangements have been observed in only 5% of the patients, while most of the other patients have several point mutations responsible for single amino acid substitutions (10). The *GLA* gene is approximately 12 kb and comprised of seven exons (varying in size from 92 to 291 base pairs) each carrying a wide variety of molecular lesions (11). The processed message is 1.45 kb and encodes a 50-kDa precursor polypeptide of 429 amino acids (1). Exon 1 contains the entire 5' untranslated region, the sequence encoding the signal peptide, and the first 33 residues of the mature enzyme subunit (12). Point mutations in the α -Gal protein may be sufficient to produce either a classic or severe Fabry phenotype, where no

α -galactosidase activity is detectable, or a milder phenotype showing residual enzyme activity (13). Different substitutions of the same codon may result in markedly different disease phenotypes (14-20). Mutant alleles involving nonsense codons or frameshifts, causing a premature termination of transcription, are usually associated with classic Fabry disease. The relationship between the genotype and phenotype in Fabry disease has been studied (8); however, apart from some generalizations, attempts to identify specific genotype-phenotype correlations have not been very successful (1). Treatment of the disease is now possible with enzyme replacement therapy (ERT) (21-23). An important aspect of ongoing basic and clinical research has been the search for a biomarker for clinical severity to evaluate the effect of ERT in Fabry patients (24-26, 9).

Gb₃ concentrations in urine and blood have been studied as potential biomarkers of Fabry disease severity (27-33). In patients with the disease, Gb₃ levels in urine, derived from glycolipid accumulated in epithelial cells shed by the distal tubules of these patients (3), are increased many times more than the levels in blood (32). Tandem mass spectrometry has been shown to be useful in the study of biomarkers in lysosomal storage disorders and other diseases (28, 31-33). We recently reported a rapid and simple liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method to analyze Gb₃ levels in urine samples collected on filter paper (34). Gb₃ levels were expressed as ratios to creatinine concentrations, which are conventionally measured by a separate, more cumbersome spectrophotometric technique (35). We devised a novel, rapid, multiplex LC-MS/MS method to analyze

Gb₃ and creatinine simultaneously and report Gb₃/creatinine ratios, and we applied it to an examination of the relationship between urinary Gb₃ excretion and the type of mutation in a group of children and adults with Fabry disease.

Materials and methods

This project was approved by the Research Ethics Board of the Faculty of Medicine and Health Sciences and the Sherbrooke Medical Centre.

CHEMICALS, STANDARDS AND CONSUMABLES

A total globotriaosylceramide isoforms standard was purchased from Matreya Inc. (Pleasant Gap, PA, USA); C_{17:0}-Gb₃ isoform internal standard (IS) was provided as a courtesy by Genzyme Corporation; HPLC grade methanol, chloroform, formic acid were obtained from Fisher Scientific (Nepean, Ontario, Canada). Creatinine standards were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Filter papers were Whatman no. 903. Gb₃ isoforms standards were prepared as previously described (34). A stock solution of creatinine, 10 mmol/L in water, was prepared and the following reference standards were used: 0.1, 1, 4 and 10 μmol. Deuterated creatinine methyl-[²H]creatinine (d3-creat) (CDN Isotopes, Pointe-Claire, Quebec, Canada) was the internal standard used for the creatinine quantification at 40 μg/20 μL in water and was stored at 4°C. All other standard solutions were stored at -20°C.

PATIENT AND CONTROL URINE COLLECTION ON FILTER PAPER
SAMPLES

After informed consent was obtained (36), fresh random urine samples were collected from adult hemizygotes and heterozygotes who had been diagnosed with Fabry disease, confirmed by demonstrating marked α -galactosidase A deficiency in leucocytes in males, or by mutation analysis of the α -galactosidase A gene (*GLA*) or pedigree analysis in females. Parents of children were informed of the project and consented to their child's providing urine samples. All samples were received in a coded manner, the key code being kept at each collaborating centre. Urine samples from children and adult patients with Fabry disease, as well as controls, were collected, well mixed and deposited on 10 cm x 10 cm virgin filter papers, until saturation. Mixing the urine sample well before pouring it on filter paper was determined to be an important step in order to suspend all the proteins and debris. The filter papers were dried at room temperature (at least 4-6 hours) and returned to the laboratory by regular postal service. Adult control urine samples (mean age 38.0 +/- 13.0 years old, range 18-79, male/female; ratio 49/51) were obtained from 47 healthy adult individuals. Pediatric control urine samples (mean age 9.7 +/- 4.3 years old, range 3-16, male/female, ratio 52/48) were obtained from 31 healthy children.

In the pediatric Fabry disease group, 32 urine filter paper samples were received with ages varying from 2 to 17 years. In the adult Fabry disease group, 78 urine

filter paper samples were received from patients with ages varying from 18 to 76 years. In all, 41 of 110 patients were receiving ERT. Of those treated, 8 were in the pediatric group and 33 in the adult group.

PROCESSING SAMPLES

A 5-cm diameter filter paper disc was punched from each sample and 1 μg of $\text{C}_{17:0}\text{-Gb}_3$ and 20 μg of d3-creat were added as internal standards. After addition of aliquots of the internal standard, filter papers were left to dry for 30 minutes at room temperature, then folded in half, deposited in glass bottles and eluted by shaking with 4 mL of methanol for one hour at room temperature with a rotary shaker (34). Each sample was poured into 12 x 75 mm glass tubes, homogenized at speed 6 with the PowerGen 125 Homogenizer (Fisher Scientific) for 30 seconds to disrupt any intact epithelial cells, such as distal tubular cells, loaded with Gb_3 . Aliquots of each eluate were deposited in 2 mL glass vials containing 250 μL flat bottom inserts (Chromatographic Specialties Inc., Brockville, Ontario, Canada), and 10 μL were injected into the LC-MS/MS system. Gb_3 deposited on filter paper at different temperature conditions, such as room temperature, 4°C, -20°C and -80°C was evaluated and found to be stable for 7 weeks (34).

LIQUID CHROMATOGRAPHY

For Gb₃ and creatinine analyses, we used an Alliance 2795XE system with stepwise gradient elution with mobile phase A = ammonium acetate 2mM + 0.1% formic acid in water and mobile phase B = ammonium acetate 2mM + 0.1% formic acid in methanol, eluting for 0-0.25 min with 85% A and 15% B, 0.25 to 2.5 min with 100% B; and finally to the end, 80% A and 20% B to recondition the column before the next analysis. The optimum flow rate was found to be 0.5 mL/min to minimize ion suppression, with a column temperature at 45°C. Rapid separation was achieved with a Zorbax Bonus-RP Guard column cartridge (4.6 mm ID x 12.5 mm, Agilent Technologies, USA) before samples entered the mass spectrometer. The total analysis run time between each injection was 2.6 minutes.

MASS SPECTROMETRY

Mass spectrometry of glycosphingolipids and creatinine was carried out using a Quattro micro tandem quadrupole instrument (Waters Micromass, Manchester, UK) with electrospray ionization operated in positive-ion mode (ES+). Three functions were established in the MS tune file: 1) for the creatinine and d3-creat (IS); 2) for the C_{17:0}-Gb₃ IS; 3) for the total Gb₃ isoforms. The following parameters were used for all 3 MS functions: capillary voltage = 4.0 kV; extractor = 3.0 V; RF lens 0.0 V; cone gas flow = 10L/hr; desolvation gas flow = 500 L/hr; multiplier setting = 650 V. For the analysis of creatinine and d3-creat, the following parameters for function 1 were used: cone voltage = 25 V; collision energy = 15 eV; dwell time of 0.25 s. Functions 2 and 3 parameters for the C_{17:0}-Gb₃ IS and total Gb₃ were: cone voltage = 120 V; collision energy = 60 eV; dwell time = 0.08 s.

QUANTIFICATION OF Gb₃ AND CREATININE

The multiple reaction monitoring mode (MRM) was used for the measurements of creatinine, d3-creatinine, C_{17:0}-Gb₃ and total Gb₃ isoforms. For creatinine, data were acquired over a period of 0.0 to 1.8 min. For urinary Gb₃, the TIC was taken as the sum of eight specific isoforms: C_{16:0}, C_{18:0}, C_{20:0}, C_{22:1}, C_{22:0}, C_{24:1}, C_{24:0} and C_{24:OH}. Data for total Gb₃ were acquired over a period of 0.8-2.6 min. For the IS and 8 different Gb₃ isoforms extracted from the TIC peaks at 1.93 and 2.33 minutes, the following MRM transitions corresponded to the loss of a galactosyl residue: m/z 1046→884 (C_{16:0}), 1060→898 (C_{17:0} = IS), 1074→912 (C_{18:0}), 1102→940, (C_{20:0}), 1128→966 (C_{22:1}), 1130→968 (C_{22:0}), 1156→994 (C_{24:1}), 1158→996 (C_{24:0}), 1174→1012 (C_{24:OH}). The creatinine transitions were m/z 114→44 and d3-creatinine transitions were m/z 117→47. Samples were quantified using Waters QuanLynx software, with the C_{17:0}-Gb₃ IS and the d3-creat IS added to each sample, to generate an analyte/IS response ratio to establish the standard curve. The standard curve for total Gb₃ was obtained with 0.25, 2.5, 5 and 20 ug/4 ml of methanol eluted urine filter paper samples; for creatinine, the standard curve was obtained with 0.1, 1, 4 and 10 umoles/4 ml of methanol eluted virgin filter paper samples.

COMPARISON OF TWO QUANTITATIVE CREATININE METHODOLOGIES

A comparison of the quantification of creatinine analyzed by the spectrophotometric method (35) and the multiplex LC-MS/MS method was

performed on 47 eluted urine filter paper samples. After eluting the urine filter paper samples with methanol, an aliquot of the eluate was analyzed according to the Jaffe reaction on a spectrophotometer (Hitachi U-1000 Spectrophotometer, Hitachi Ltd, Tokyo, Japan), and another aliquot was analyzed by the multiplex LC-MS/MS method according to the previously described conditions.

VALIDATION OF METHOD

Gb₃: validation of the method was performed by spiking different concentrations of total Gb₃ isoforms standard solutions on already dried 5-cm diameter disc of normal random urine filter paper samples. Samples were analyzed in triplicate. We assessed the intra-day precision (4 runs in a day) and the inter-day precision (4 different days) by adding 0.125 and 50 µg of total Gb₃ isoforms to provide an assessment of the reproducibility of the method. The linearity of the response was assessed by adding varying amounts of total Gb₃ (0.125 to 50 µg) to urine filter paper samples. The limit of detection (LOD) for total Gb₃ isoforms was determined in order to obtain a signal-to-noise ratio three times higher (>3) than the signal obtained for the urine filter paper samples alone. The limit of quantification (LOQ) was determined for total Gb₃ isoforms, as the lowest quantity of Gb₃ that can be measured within 20% of the target concentration.

Creatinine: We assessed the intra-day precision (4 runs in a day) and the inter-day precision (4 different days) by adding 0.1 and 10 µmoles creatinine on virgin filter

paper samples to provide an assessment of the reproducibility of the method. Samples were analyzed in triplicate. The linearity of the response was assessed by adding varying amounts of creatinine (0.1 to 10 μ moles/) to virgin filter paper samples. The limit of detection (LOD) of creatinine was determined in order to obtain a signal-to-noise ratio three times higher (>3) than the signal obtained for the filter paper samples alone. The limit of quantification (LOQ) was determined for creatinine, as the lowest quantity of creatinine that can be measured within 20% of the target concentration.

MUTATION ANALYSIS AND RELATED FABRY DISEASE PATIENTS' INFORMATION

All coded filter paper samples were received with the following information for each patient: age, sex, symptoms, ERT or not, and mutation results. Characterization of mutations was performed in each collaborating centre after informed consent was obtained.

The main technical procedures to characterize the mutations are presented. Almost all centers used PCR reactions and sequencing of the 7 exons. In one center, sequence reactions for each exon of the *GLA* gene were performed individually using primers that allowed sequence analysis of the exon and intron/exon boundaries. PCR was performed in a 50 μ l reaction volume with 200 ng DNA, 0.4 μ M each forward and reverse primers, 3.0 mM $MgCl_2$ in buffer supplied by the

enzyme manufacturer, 200 μ M each dNTP (Amersham Biosciences) and 1.5 units of Taq DNA polymerase (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems). PCR products were purified with a PCR purification kit (Qiagen Inc, Mississauga, ON) and 1 μ l used in fluorescent dye terminator cycle sequencing following the instructions of the supplier (BigDye Terminator v1.1 kit, Applied Biosystems). Sequencing products were purified using CetriSep columns (Princeton Separations, Adelphia, NJ), separated on a capillary electrophoresis system (Applied Biosystems models 3130 or 3730), and results analyzed using SeqScape software (Applied Biosystems). All samples underwent bidirectional sequence analysis.

In another centre, mutation analysis in DNA derived from fibroblasts or lymphoid cells was done according to Redonnet-Vernhet (37). Briefly, genomic DNA was extracted with 2 cycles of phenol-chloroform, precipitated with ethanol, and resuspended in deionized water for amplification with polymerase reaction (PCR). Amplification was performed in 33 cycles. Each cycle consisted of 1 min denaturation at 94°C, 1 min annealing at 55°C, and 2 minutes extension at 72°C with TAQ polymerase. Amplified fragments were analyzed on 2% agarose gels by electrophoresis. Single strand conformation polymorphism (SSCP) was identified by automated electrophoresis on 12.5% homogeneous PhastGels (Pharmacia-LKB). DNA was visualized by silver staining. Nucleotide sequences were sequenced directly by dideoxy chain termination reactions with a pUC sequencing kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) and the same amplification primers were used for the sequencing reaction.

Another centre performed the mutation analysis according to Eng et al (38), where initial screening for major gene rearrangements (> 50 bp) was done by multiplex amplification of α -Gal A sequences of genomic DNA from whole blood or lymphoblasts. First-strand cDNA was reverse-transcribed from total RNA. The entire α -Gal A cDNA was amplified in two overlapping fragments by using two sets of primers, and then each product was analyzed by double-stranded dideoxy sequencing performed using α -Gal A-specific primers. For genomic amplification, the complete coding region including intron/exon boundaries was amplified from genomic DNA in four fragments. The reaction mixture was incubated at 94°C for 7 min to denature the DNA and inactivate proteases. Amplifications were performed for 30 cycles of denaturation at 92°C for 1 min, annealing at 61°C for 2 min, and extension at 72°C for 2 min. The purified fragments were digested with the appropriate restriction enzymes and were subcloned into pGEM-4Z, and sequenced by the dideoxy chain termination method.

For analysis of the Nova Scotia *GLA* mutation, DNA was extracted from white blood cells. The mutation A143P was detected by PCR amplification of exon 3 of the *GLA* gene followed by digestion with the restriction enzyme *CfoI*. The presence of the Nova Scotia mutation eliminates the normal *CfoI* site in the amplification product. Intronic primers flanking exon 3 were *GLA-F* 5'GCTTCTACAATGGTGACTCTTT3' and *GLA-R* 5'GCTAAATCTCTGGAATGAAACA3' (GenBank accession U78027). Standard PCR conditions were used, with 100 ng DNA and cycling conditions of 20 sec at

95°C/30 sec at 56.2°C/45 sec at 72°C for 30 cycles, finishing with an extension of 2 min at 72°C. Following digestion of the PCR product with the restriction enzyme *CfoI*, the normal allele shows as bands at 145 and 100 bp, while the abnormal allele shows at 244 bp.

For this study, we classified the α -galactosidase A mutations into four types (see Table 1): 1) since most of the mutations are private mutations, correlations with single mutations are not feasible, and 2) the types of mutations are predictive, in a general sense, of the severity of the effect on the gene product, i.e., level of residual α -galactosidase A activity.

Table 1. α -galactosidase A gene mutations in Fabry disease patients classified according types.

Types of mutations in α -galactosidase A gene

Nonsense		Frameshift		Missense		Splice-site defects	
Q386X	(8)	621dupT	(2)	A143P	(30)	IVS 4(-2)	(2)
W204X	(3)	11051delGA	(2)	D316Y	(7)	IVS 6(2)	(2)
W349X	(3)			R112H	(6)		
W81X	(1)			R342Q	(6)		
R220X	(1)			L414S	(5)		
R227X	(1)			A348P	(4)		
R301X	(1)			W236L	(3)		
				A285D	(3)		
				P293T	(3)		
				L89P	(2)		
				I317T	(2)		
				Q321E	(2)		
				F18S	(1)		
				W47G	(1)		
				L54P	(1)		
				R100T	(1)		
				R112C	(1)		
				H125P	(1)		
				R227Q	(1)		
				P259L	(1)		
				N264A	(1)		
				R301Q	(1)		
				Q321L	(1)		
Total	18		4		84		4

In parenthesis = number of patients with the mutation.

Table 2 shows the types of mutations and the sex of children and adults with Fabry disease. The pediatric group consisted of 15 male hemizygotés and 17 female heterozygotés with different types of mutations: 20 had missense mutations, 5 had

nonsense (stop) mutations, 4 had splice-site defects, and 3 had frameshift mutations (1 deletion, 2 duplications). In the adult group, 36 were male hemizygotes, 42 were female heterozygotes with also different types of mutations: 64 had missense mutations and 13 had nonsense mutations, 1 had a frameshift mutation, and no splice-site defects mutation were observed.

Table 2. Types of mutations related to sex in children and adults with Fabry disease.

Types of mutations	Adults		Children	
	Male	Female	Male	Female
Missense	28	36	8	12
Nonsense	8	5	4	1
Frameshift	0	1	1	2
Splice-site defects	0	0	2	2
Total	36	42	15	17

We received urine filter paper samples from 30 adults with Fabry disease who are part of a Nova Scotia kindred with the same missense mutation (A143P) (39, 40).

We also received samples from 7 children, from the same family, having the D136Y Fabry disease mutation (41).

STATISTICAL ANALYSIS

Gb₃/creatinine values are presented using descriptive statistics, including means and standard deviations (SD). The comparison between the creatinine data obtained from two different methodologies was performed using the Friedmann test. The statistical analysis was performed using the proc mixed procedure of the Statistical Analysis System (SAS) software, version 9.1.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Analyses of variance were performed using the independent variables, age, sex, types of mutations and treatment. The dependent variable was the log of Gb₃/creatinine urinary excretion. Three analyses of variance were done: 1) on data from 110 patients; 2) specifically for 30 patients with the same mutation; 3) to compare Gb₃ excretion in missense mutations in 30 adult patients with the same mutation (A143P) with adult patients carrying the other 23 missense mutations. We have also used the PDIFF function for the pair wise comparison of the least square means which provides a defensible estimate of interesting effects, in this case the types of mutations *versus* the Gb₃ levels.

Results

LC-MS/MS ANALYSIS

Figure 1 shows the total ion chromatogram (TIC) in MRM mode of a 5-year old hemizygote with Fabry disease with the R301Q mutation excreting increased levels of total Gb₃ and a normal control child. Complete analysis time is 2.6 min.

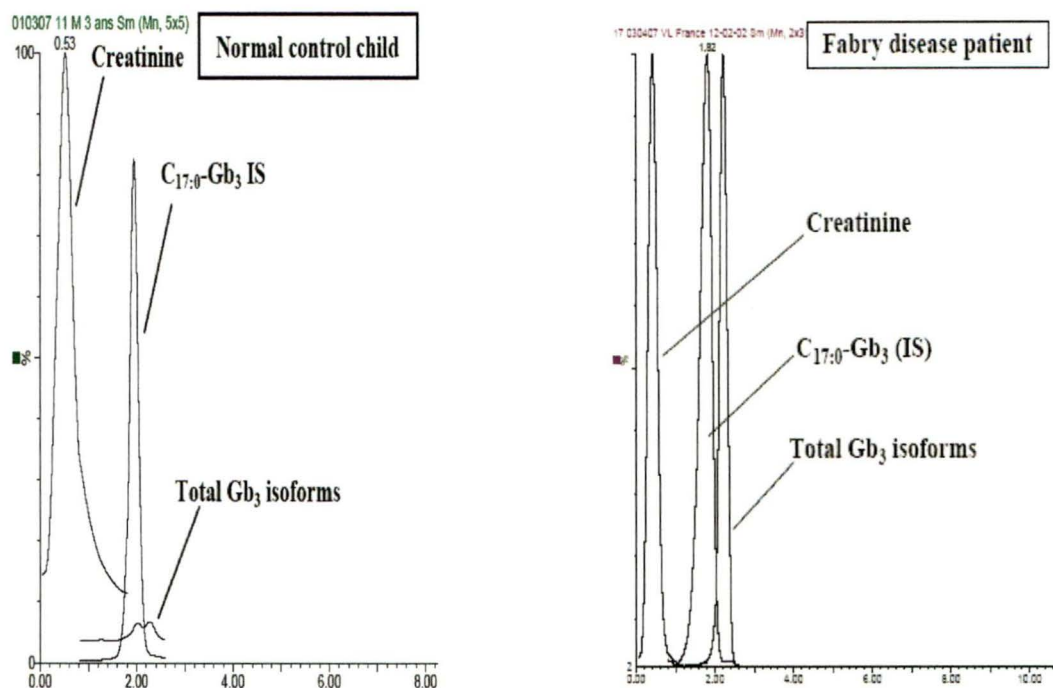


Figure 1. Total ion chromatograms in multiple reaction monitoring mode of a 5-year old hemizygote with Fabry disease (R301Q mutation) showing high levels of total Gb₃ isoforms and a normal control child. C_{17:0}-Gb₃ IS = Internal standard. Vertical axes were linked for each chromatogram.

COMPARISON OF TWO QUANTITATIVE CREATININE METHODOLOGIES

Regarding the comparison between creatinine samples analyzed by the spectrophotometric technique and the multiplex LC-MS/MS method, the Friedmann test shows no difference between the two methods ($\chi^2 = 0.19$, p value = 0.6629) for 47 urine filter paper samples.

VALIDATION OF METHOD

Gb₃: With total Gb₃ isoforms concentrations ranging from 0.125 to 50 $\mu\text{g}/4$ ml of eluted urine filter paper samples, the mean recovery was 91.0%. The linearity of the

response for Gb₃ was quite acceptable at concentrations from 0.125 to 20 µg/4 ml of eluates with a mean correlation coefficient of 0.992. The precision and reproducibility of the method are presented in Table 3 for both Gb₃ and creatinine. The LOD and LOQ attained for total Gb₃ were both 0.05 µg/4mL of eluted urine filter paper samples.

Creatinine: With creatinine concentrations ranging from 0.05 to 30 µmoles/4 ml of eluted urine filter paper samples, the mean recovery was 97.1%. The linearity of the creatinine response at concentrations ranging from 0.1 to 10 µmoles/4 ml of eluates showed a mean correlation coefficient of 0.996. The LOD and LOQ attained for the creatinine were 2.5 ng/4mL of eluted virgin filter paper samples.

Table 3. Precision and reproducibility of the multiplex assays with mean coefficient of variation (%CV) for Gb₃ and creatinine.

Amount added µg/4 ml	Gb ₃		Amount added µmole/4 ml	Creatinine	
	Intra-day %CV	Inter-day %CV		Intra-day %CV	Inter-day %CV
0.125	12.6	8.6	0.1	10.1	7.0
50	9.6	11.3	10	6.5	3.7

Gb₃/CREATININE NORMAL LEVELS

We established normal control values in children and adults. For the pediatric control group, 32 control urine filter paper samples were analyzed with a mean

Gb₃/creatinine value at 7.9 +/- 5.4 µg/mmol creat, the lowest value being 1.7 µg/mmol creat. We established 25 µg/mmol creat (at +3 SD) to be the upper limit of normal value. For the adult group, 47 control urine filter paper samples were analyzed with a mean Gb₃/creatinine value at 6.1 +/- 5.8 µg/mmol creat, the lowest value being 1.5 µg/mmol creat. We have established 25 µg/mmol creat (at +3 SD) to be the upper limit of normal value for adults. These control values are one fourth those we previously published in the Gb₃ technique with the creatinine analyzed by a spectrophotometric technique (34), because all the analyses were obtained from eluted filter papers where 1 ml of urine was precisely deposited by us on a 5-cm diameter disc. Considering that we cannot control the quantity of urine that will be deposited by the patients, and absorbed on each 10 cm x 10 cm filter paper sent to them, we found it more accurate to express the values for the concentration of Gb₃/creatinine as the quantity recovered in 4 ml of methanol eluted from a 5-cm diameter urine filter paper disc.

MUTATION ANALYSIS AND RELATED PATIENT INFORMATION

The Fabry disease patients in our study bore the following mutations: 76.4% were missense, 16.4% were nonsense, 3.6% were frameshift and 3.6% were splice-site defects. Thirty-five mutations were studied in 110 patients.

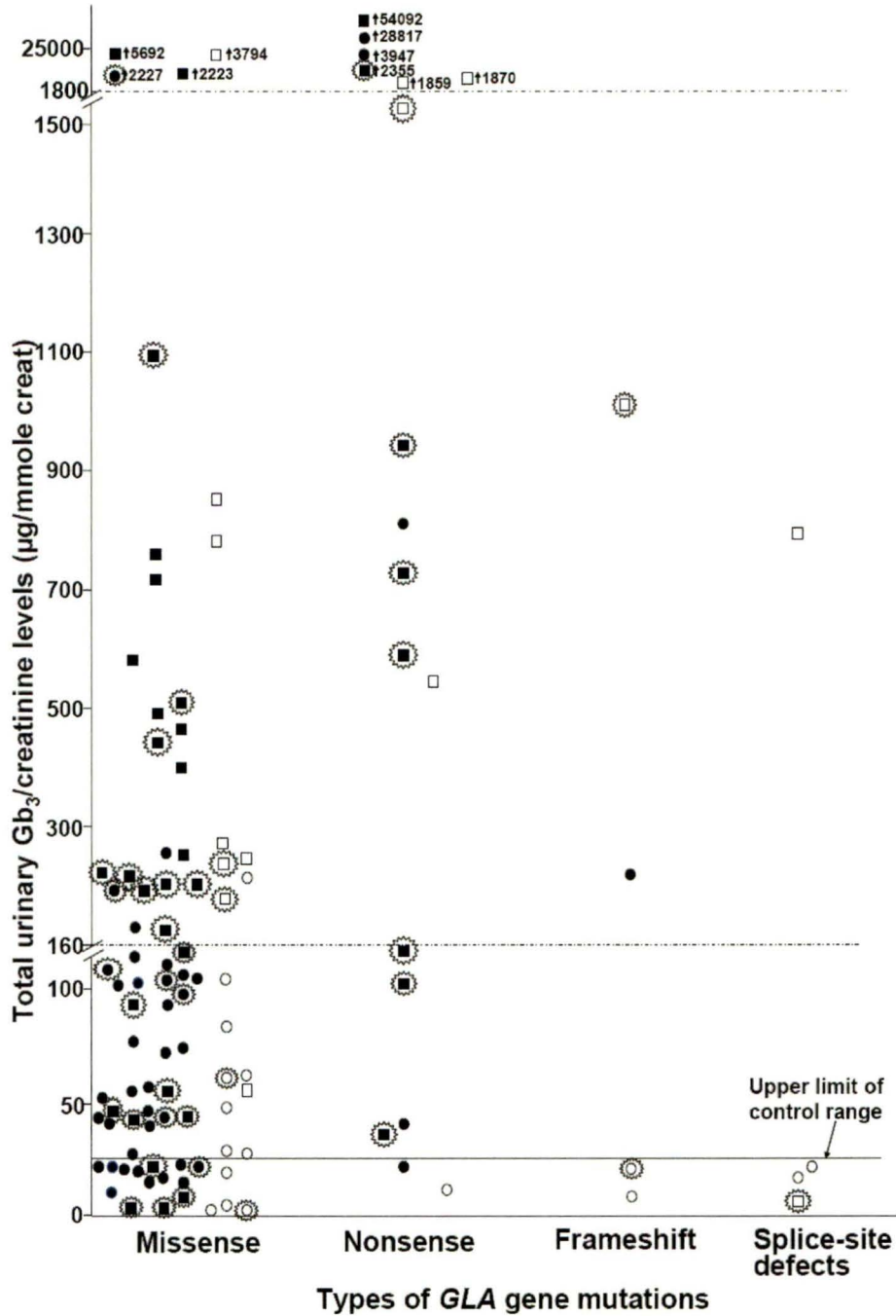


Figure 2. Total urinary Gb₃/creatinine excretion of Fabry disease children and adults in relationship with the types of *GLA* gene mutations. Adult hemizygote = ■; Adult heterozygote = ●; Child hemizygote = □; Child heterozygote = ○; Patients on ERT:

Our results show that in the pediatric group, missense and splice-site defect mutations were equally divided between males and females, while the nonsense mutations were mainly in males. No splice-site defects were observed in adults, with nonsense mutations again more frequent in males. Figure 2 presents the results of the total urinary Gb₃/creatinine excretion in children and adults in relationship with the types of *GLA* gene mutations. Among the patients with nonsense mutations, a wide variation in the excretion pattern was found: from an 11-year old girl with the R220X mutation excreting 14.7 µg/mmol of creatinine (within the normal range) to an affected 43 year old male with the Q386X mutation excreting 54 092 µg/mmol of creatinine. Among the patients with missense mutations, the lowest value was from a 10-year old girl with the R112H mutation excreting 3.0 µg/mmol of creatinine, and the highest value was from an untreated 33-year old male with the A143P mutation excreting 5 691.9 µg/mmol creatinine. Among the patients with frameshift mutations, the lowest value was from a 15-year old girl with the 11051delGA mutation excreting 11.1 µg/mmol creatinine (within normal values) to the highest level found in a 9-year old boy with the 621dupT mutation excreting 1 002.9 µg/mmol creatinine. In the splice-site defect mutations, the lowest excretor was a treated 15-year old male patient excreting 8.5 µg/mmol creatinine and the highest value was from a 12-year old male with the same IVS4(-2) mutation excreting 774.5 µg/mmol creatinine. Attempts were made to elucidate the types of mutations causing the highest urinary excretion of Gb₃. The Q386X nonsense mutation in exon 7, resulting in a truncated protein, caused the highest urinary levels of Gb₃ excretion in one hemizygote (54 092 µg/mmol creatinine),

and in one heterozygote (28 817 $\mu\text{g}/\text{mmole}$ creatinine). Another nonsense mutation in exon 7, the W349X also resulted in high Gb₃ levels (2 355 $\mu\text{g}/\text{mmole}$ creatinine). Missense mutations such as A143P (exon 3), H125P (exon 3), A285D (exon 6), which resulted in single amino acid substitution, also caused high Gb₃ urinary excretion of 5 692, 2 227 and 2 223 $\mu\text{g}/\text{mmole}$ creatinine, respectively.

STATISTICAL ANALYSIS

Table 4 shows that the urinary excretion of Gb₃/creatinine in children and adults with Fabry disease was related to the type of mutation ($p = 0.0006$). The urinary excretion of Gb₃/creatinine in both groups was also directly related to the sex ($p < 0.0001$) and treatment ($p = 0.0005$) of the patients. In contrast, age proved not to have a significant effect on urinary excretion of Gb₃/creatinine ($p = 0.1961$). However, in the pair wise comparison of the types of mutations related to Gb₃/creatinine excretion, we found that there is a significant difference between the nonsense and missense mutations and also between the nonsense and splice junction mutations.

Table 4. Analysis of variance of Gb₃/creatinine urinary excretion in Fabry patients related to age, sex, types of mutation and treatment factors

Type 3 Tests if Fixed Effects				
Effect	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
SEX	1	103	37.03	<.0001
Age	1	103	1.69	0.1961
Types of mutation	3	103	6.20	0.0006
Treatment	1	103	12.99	0.0005

Regarding the 30 Nova Scotia Fabry patients with the same missense mutation (A143P), separate statistical analysis showed that Gb₃ excretion was not different from patients with various other missense mutations from other centers. Also, for the Nova Scotia group, sex ($p = 0.0007$) and treatment ($p = 0.0021$) have a statistically significant effect on urinary Gb₃/creatinine excretion.

Discussion

Previous efforts to analyze total Gb₃ isoforms over the years were both time and labor intensive, necessitating sample dilution, extraction, ultrasonication, centrifugation and evaporation steps (27, 29, 42). Creatinine is most frequently analyzed using the Jaffe method, but this is prone to interference by proteins, bilirubin and ketones (43). On the other hand, specific constituents of blood have been analyzed simultaneously with creatinine (44, 45). We have previously developed a LC-MS/MS technique for Gb₃ analysis, where the creatinine had to be measured in a separate spectrophotometric analysis (34), this being time-consuming. Considering that no other method existed, we thus opted for the development and validation of a multiplex methodology permitting the simultaneous analysis of urinary Gb₃ and creatinine eluted from the same filter paper sample, in a single 2.6 min LC-MS/MS run, without affecting the sensitivity of either biomarkers. An advantage of this filter paper method is that it eliminates the high protein content in liquid urine samples that can compromise Gb₃ extraction. Filter paper is an adsorbent that prevents many unwanted urine proteins from being eluted, while it favors the extraction and transfer of Gb₃ in the methanol

phase when adequate shaking and homogenization are provided. The filter paper samples can also be easily collected by the patients or parents of affected children and sent by regular mail, the stability on filter paper being good for a period of up to 7 weeks (34).

The use of this novel technique was applied to the analysis of Gb₃/creatinine in urine filter paper samples of Fabry disease hemizygote and heterozygote patients, to study the relationship between the excretion of these biomarkers and the genotype of the patients, the main reasons being the complexity and tremendous variability in the clinical phenotype and the large number of mutations in the *GLA* gene causing this disease. In studying independent variables such as age, sex, types of mutations and treatment in relation to the dependent variable of urinary excretion of Gb₃, we found that there was a highly significant correlation between the sex, types of mutations and treatment in the Fabry disease patients studied. But, we found no correlation between the age of the patients in regards to Gb₃ excretion. We also found that the highest excretors among all Fabry patients studied carried the nonsense Q386X mutation. Regarding 30 Fabry disease patients with the same missense mutation (A143P), our results show that the sex ($p = 0.0007$) and treatment ($p = 0.0021$) factors are still statistically significant compared to urinary Gb₃/creatinine excretion.

More than half of over 350 mutations in the *GLA* gene that cause Fabry disease are missense mutations. In fact, the mutation screening performed on a cohort of 121 patients by Schäfer et al revealed that 54.4% were missense, 14.4% were nonsense,

5.6% were splice-site point mutations, 17.8% were deletions or 5.6% insertions/duplications of a few nucleotides and 2.2% were complex rearrangements including larger deletions (46). The distribution of mutations in our study was similar, except for a preponderance of missense mutations among our patients. It is important that patients with atypical clinical manifestations and residual α -galactosidase activity be investigated thoroughly with the characterization of the residual enzyme activity, quantification of total Gb3 and complete sequencing of the entire *GLA* gene (47).

Not surprisingly, sex and treatment status showed a significant effect on urinary Gb₃ excretion. By contrast, excretion of the glycolipid was not significantly affected by age, when the Gb₃ level was normalized to creatinine excretion. The effect was greatest in patients with nonsense mutations, which might be expected to be associated with more severe clinical disease. Multiple disease-causing mutations have been identified in each exon of the gene (12). However, it was recently reported that disease-associated mutations were more common in exons 3 and 7 of the *GLA* gene (48). We found particularly high urinary excretion levels of Gb₃ in patients with a nonsense mutation (Q386X) in exon 7. We observed that the truncated protein resulting from this particular mutation leads to massive excretion of Gb₃ in children, as well as in adults, suggesting that mutations in exons 3 and 7 code for important functional domains or cause unusually marked instability of the gene product (12, 49).

The results also suggest that the effect of missense mutations is unpredictable and variable, since the variability of Gb₃ excretion among people with missense mutations is greater than among people with nonsense mutations. This could be the result of nonconservative mutations among species where the mutated amino acid has a different physico-chemical structure compared to the wild-type.

In conclusion, we have developed a rapid and efficient method to analyze Gb₃ in urine samples collected on filter paper in a multiplex LC-MS/MS analysis. This allowed us to study the correlation between urinary Gb₃ excretion in Fabry disease and four types of mutations. We studied 35 mutations in 110 children and adults with Fabry disease and unexpectedly found a highly significantly correlation between the type of mutation and total Gb₃ excretion. We also found an expected correlation between sex and treatment status and Gb₃ excretion in the Fabry patients.

Acknowledgements

The authors thank the nurse-coordinators, geneticists and genetic counsellors at each collaborating centre: Carolina Azcona, (Toronto), Kaye Lemoine (Halifax), Carole Fortier (Montreal), Nicole Labbé (Quebec), and Dr Karelle Benistan (Paris) and Dr John James Mitchell (Montreal) for their collaboration in providing urine samples from Fabry patients. We would like to acknowledge the assistance of Claude Alie

and Dr René Gagnon for their keen expertise. We are particularly grateful to the patients with Fabry disease for their cooperation. Without them this study would not have been possible. This research was funded in part by a grant-in-aid of research from Genzyme Canada Inc. We are grateful to Waters for their continued scientific support. RD holds the Canada Research Chair in “Genetics, Mutagenesis and Cancer”.

References

1. Clarke JTR. Narrative review: Fabry disease. *Ann Intern Med* 2007;146:425-33.
2. Desnick RJ, Brady R, Barranger J, Collins AJ, Germain DP, Goldman M. et al. Fabry disease, an under-recognized multisystemic disorder: expert recommendations for diagnosis, management, and enzyme replacement therapy. *Ann Intern Med* 2003;138:338-46.
3. Desnick RJ, Dawson G, Desnick SJ, Sweeley CC, Krivit W. Diagnosis of glycosphingolipidoses by urinary-sediment analysis. *N Engl J Med* 1971;284:739-44.
4. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *Jama* 1999;281:249-54.
5. Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, Tükel T, Thiagarajan G, Sakuraba H. et al. High incidence of later-onset Fabry disease revealed by newborn screening. *Am J Hum Genet* 2006;79:31-40.

6. Elleder M, Bradova V, Smid F, Budesinsky M, Harzer K, Kustermann-Kuhn B. et al. Cardiocyte storage and hypertrophy as a sole manifestation of Fabry's disease. Report on a case simulating hypertrophic non-obstructive cardiomyopathy. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1990;417:449-55.
7. Nakao S, Kodama C, Takenaka T, Tanaka A, Yasumoto Y, Yoshida A. et al. Fabry disease: detection of undiagnosed hemodialysis patients and identification of a "renal variant" phenotype. *Kidney Int* 2003;64:801-7.
8. Schaefer E, Mehta A, Gal A. Genotype and phenotype in Fabry disease: analysis of the Fabry Outcome Survey. *Acta Paediatr Suppl* 2005;94:87-92; discussion 79.
9. Schiffmann R, Ries M, Timmons M, Flaherty JT, Brady RO. Long-term therapy with agalsidase alfa for Fabry disease: safety and effects on renal function in a home infusion setting. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:345-54.
10. Okumiya T, Ishii S, Kase R, Kamei S, Sakuraba H, Suzuki Y. Alpha-galactosidase gene mutations in Fabry disease: heterogeneous expressions of mutant enzyme proteins. *Hum Genet* 1995;95:557-61.
11. Pastores GM, Lien YH. Biochemical and molecular genetic basis of Fabry disease. *J Am Soc Nephrol* 2002;13 Suppl 2:S130-3.
12. Altarescu GM, Goldfarb LG, Park KY, Kaniski C, Jeffries N, Litvak S. et al. Identification of fifteen novel mutations and genotype-phenotype relationship in Fabry disease. *Clin Genet* 2001;60:46-51.

13. Garman SC, Garboczi DN. The molecular defect leading to Fabry disease: structure of human alpha-galactosidase. *J Mol Biol* 2004;337:319-35.
14. Ashton-Prolla P, Ashley GA, Giugliani R, Pires RF, Desnick RJ, Eng CM. Fabry disease: comparison of enzymatic, linkage, and mutation analysis for carrier detection in a family with a novel mutation (30delG). *Am J Med Genet* 1999;84:420-4.
15. Ashton-Prolla P, Tong B, Shabbeer J, Astrin KH, Eng CM, Desnick RJ. Fabry disease: twenty-two novel mutations in the alpha-galactosidase A gene and genotype/phenotype correlations in severely and mildly affected hemizygotes and heterozygotes. *J Investig Med* 2000;48:227-35.
16. Bernstein HS, Bishop DF, Astrin KH, Kornreich R, Eng CM, Sakuraba H, Desnick RJ. Fabry disease: six gene rearrangements and an exonic point mutation in the alpha-galactosidase gene. *J Clin Invest* 1989;83:1390-9.
17. Cariolou MA, Christodoulides M, Manoli P, Kokkofitou A, Tsambaos D. Novel trinucleotide deletion in Fabry's disease. *Hum Genet* 1996;97:468-70.
18. Eng CM, Niehaus DJ, Enriquez AL, Burgert TS, Ludman MD, Desnick RJ. Fabry disease: twenty-three mutations including sense and antisense CpG alterations and identification of a deletional hot-spot in the alpha-galactosidase A gene. *Hum Mol Genet* 1994;3:1795-9.
19. Germain DP, Shabbeer J, Cotigny S, Desnick RJ. Fabry disease: twenty novel alpha-galactosidase A mutations and genotype-phenotype correlations in classical and variant phenotypes. *Mol Med* 2002;8:306-12.
20. Shabbeer J, Yasuda M, Benson SD, Desnick RJ. Fabry disease: identification of 50 novel alpha-galactosidase A mutations causing the

-
- classic phenotype and three-dimensional structural analysis of 29 missense mutations. *Hum Genomics* 2006;2:297-309.
21. Eng CM, Guffon N, Wilcox WR, Germain DP, Lee P, Waldek S. et al. Safety and efficacy of recombinant human alpha-galactosidase A-replacement therapy in Fabry's disease. *N Engl J Med* 2001;345:9-16.
 22. Germain DP. Clinical development of agalsidase-beta for the treatment of Fabry disease. *Med Sci* 2005;21:57-61.
 23. Germain DP. Enzyme replacement therapies for lysosomal storage disorders. *Med Sci* 2005;21:77-83.
 24. Murray GJ, Anver MR, Kennedy MA, Quirk JM, Schiffmann R. Cellular and tissue distribution of intravenously administered agalsidase alfa. *Mol Genet Metab* 2007;90:307-12.
 25. Ries M, Clarke JTR, Whybra C, Timmons M, Robinson C, Schlaggar BL. et al. Enzyme-replacement therapy with agalsidase alfa in children with Fabry disease. *Pediatrics* 2006;118:924-32.
 26. Schiffmann R. Enzyme replacement in Fabry disease: the essence is in the kidney. *Ann Intern Med* 2007;146:142-4.
 27. Boscaro F, Pieraccini G, la Marca G, Bartolucci G, Luceri C, Luceri F, Moneti G. Rapid quantitation of globotriaosylceramide in human plasma and urine: a potential application for monitoring enzyme replacement therapy in Anderson-Fabry disease. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2002;16:1507-14.
 28. Fauler G, Rechberger GN, Devrnja D, Erwa W, Plecko B, Kotanko P. et al. Rapid determination of urinary globotriaosylceramide isoform profiles by

-
- electrospray ionization mass spectrometry using stearyl-d35-globotriaosylceramide as internal standard. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005;19:1499-506.
29. Fuller M, Sharp PC, Rozaklis T, Whitfield PD, Blacklock D, Hopwood JJ, Meikle PJ. Urinary lipid profiling for the identification of Fabry hemizygotes and heterozygotes. *Clin Chem* 2005;51:688-94.
30. Kitagawa T, Ishige N, Suzuki K, Owada M, Ohashi T, Kobayashi M. et al. Non-invasive screening method for Fabry disease by measuring globotriaosylceramide in whole urine samples using tandem mass spectrometry. *Mol Genet Metab* 2005;85:196-202.
31. Mills K, Johnson A, Winchester B. Synthesis of novel internal standards for the quantitative determination of plasma ceramide trihexoside in Fabry disease by tandem mass spectrometry. *FEBS Lett* 2002;515:171-6.
32. Mills K, Morris P, Lee P, Vellodi A, Waldek S, Young E, Winchester B. Measurement of urinary CDH and CTH by tandem mass spectrometry in patients hemizygous and heterozygous for Fabry disease. *J Inherit Metab Dis* 2005;28:35-48.
33. Roddy TP, Nelson BC, Sung CC, Araghi S, Wilkens D, Zhang XK et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry quantification of globotriaosylceramide in plasma for long-term monitoring of Fabry patients treated with enzyme replacement therapy. *Clin Chem* 2005;51:237-40.
34. Auray-Blais C, Cyr D, Mills K, Giguere R, Drouin R. Development of a filter paper method potentially applicable to mass and high-risk urinary screenings for Fabry disease. *J Inherit Metab Dis* 2007;30:106.

-
35. Chasson AL, Grady HJ, Stanley MA. Determination of creatinine by means of automatic chemical analysis. *Tech Bull Regist Med Technol* 1960;30:207-12.
 36. Auray-Blais C, Patenaude J. A biobank management model applicable to biomedical research. *BMC Med Ethics* 2006;7:E4.
 37. Redonnet-Vernhet I, Ploos van Amstel JK, Jansen RP, Wevers RA, Salvayre R, Levade T. Uneven X inactivation in a female monozygotic twin pair with Fabry disease and discordant expression of a novel mutation in the alpha-galactosidase A gene. *J Med Genet* 1996;33:682-8.
 38. Eng CM, Resnick-Silverman LA, Niehaus DJ, Astrin KH, Desnick RJ. Nature and frequency of mutations in the alpha-galactosidase A gene that cause Fabry disease. *Am J Hum Genet* 1993;53:1186-97.
 39. Thanamayooran S, West ML, Dyack S, Lemoine K, Riddell C, Simms C. A Fabry disease homozygote in the Nova Scotia kindred with a classic hemizygote phenotype. *Acta Paediatr* 2003;Suppl. 443:108.
 40. West ML, Dyack S, Riddell C, Lemoine K, Camfield C, Camfield P. A Nova Scotia kindred with Fabry disease. *Acta Paed* 2002;91:439S:116.
 41. Vedder AC, Linthorst GE, van Breemen MJ, Groener JE, Bemelman FJ, Strijland A. et al. The Dutch Fabry cohort: diversity of clinical manifestations and Gb3 levels. *J Inherit Metab Dis* 2007;30:68-78.
 42. Utsumi K, Mitsuhashi F, Asahi K, Sakurazawa M, Arii K, Komaba Y. et al. Enzyme replacement therapy for Fabry disease: morphologic and histochemical changes in the urinary sediments. *Clin Chim Acta* 2005;360:103-7.

-
43. Owen LJ, Wear JE, Keevil BG. Validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for serum creatinine and comparison with enzymatic and Jaffe methods. *Ann Clin Biochem* 2006;43:118-23.
 44. Carducci C, Santagata S, Leuzzi V, Artiola C, Giovanniello T, Battini R, Antonozzi I. Quantitative determination of guanidinoacetate and creatine in dried blood spot by flow injection analysis-electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 2006;364:180-7.
 45. Keevil BG, Tierney DP, Cooper DP, Morris MR, Machaal A, Yonan N. Simultaneous and rapid analysis of cyclosporin A and creatinine in finger prick blood samples using liquid chromatography tandem mass spectrometry and its application in C2 monitoring. *Ther Drug Monit* 2002;24:757-67.
 46. Schafer E, Baron K, Widmer U, Deegan P, Neumann HP, Sunder-Plassmann G. et al. Thirty-four novel mutations of the GLA gene in 121 patients with Fabry disease. *Hum Mutat* 2005;25:412.
 47. Winchester B, Young E. Biochemical and genetic diagnosis of Fabry disease. In: *Fabry disease Perspectives from 5 years of FOS* (Atul Mehta, Michael Beck, Sunder-Plassmann G, eds), pp 423, Oxford Pharmagenesis Ltd, (2006).
 48. Azcona C, Clarke JTR, Stockley T. Fabry disease: genotype-phenotype studies; epidemiology; screening and management. *Acta Paediatr Suppl* 2007;96:93-7.
 49. Branton MH, Schiffmann R, Sabnis SG, Murray GJ, Quirk JM, Altarescu G. et al. Natural history of Fabry renal disease: influence of alpha-galactosidase

A activity and genetic mutations on clinical course. *Medicine (Baltimore)*
2002;81:122-38.

Chapitre V - Quatrième Article

A biobank management model applicable to biomedical research.

C. Auray-Blais* et J. Patenaude, *BMC Medical Ethics* (2006) 7:4

Christiane Auray-Blais a contribué de façon substantielle à la recherche, à la conception, au design et au développement du modèle de gestion des biobanques. Elle a contribué substantiellement à la rédaction du manuscrit et elle est l’auteure pour la correspondance.

Résumé

Mise en contexte

Le travail des comités d'éthique de la recherche (CÉR) notamment dans la recherche en génétique et les biobanques, comporte des défis sans cesse croissants. Certains CÉR ont même rejeté des projets de recherche demandant l'utilisation de biobanques avec des échantillons codés. La plus grande crainte se situait au niveau de la protection du sujet participant et du manque de contrôle au niveau des échantillons biologiques et de l'information génétique s'y rattachant. Les risques de discrimination et de stigmatisation constituent un problème auquel il faut s'intéresser. Vu l'intérêt grandissant pour la recherche biomédicale et les bénéfices en résultant pour la santé des participants, il est primordial que des solutions pratiques soient trouvées aux problèmes associés à la gestion des biobanques. Il faut en effet protéger l'intégrité des sujets et garantir la sécurité et la confidentialité de l'information génétique.

Méthodes

Notre objectif était d'élaborer un modèle pratique et efficient pour la gestion des biobanques dans la recherche biomédicale, où un archiviste joue un rôle clé de « protecteur de données ». Le modèle devait réduire le fardeau qui incombait aux CÉR responsables de l'évaluation des projets de recherche et en même temps maximiser la protection des sujets participants.

Résultats

Le modèle proposé offre les caractéristiques suivantes : 1) il protège l'information contenue dans les biobanques; 2) il offre la possibilité d'assurer un suivi

d'information qui pourrait être requise pour la santé du sujet participant; 3) il protège la confidentialité; 4) il respecte les principes éthiques reliés aux biobanques.

Conclusions

Il n'existe actuellement au Québec aucun comité de gouvernance gouvernementale pour garantir la protection du sujet participant à un projet de recherche et établir des lignes directrices pour la gestion des biobanques dans la recherche biomédicale. Cette tâche incombe alors au CÉR. Le modèle proposé offre aux chercheurs et aux CÉR une solution pratique au plan quotidien, par l'instauration d'un processus dans lequel un archiviste joue un rôle crucial. Ce modèle garantit la protection de tous les participants qui font don de leurs spécimens biologiques dans le but d'améliorer nos connaissances et de parvenir à de meilleurs diagnostics et traitements médicaux.

A biobank management model applicable to biomedical research

Christiane Auray-Blais^{1§}, Johane Patenaude²

¹Service of Genetics, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, 3001, 12th Avenue North, Sherbrooke, Qc, J1H 5N4, Canada

²Department of Surgery, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, 3001, 12th Avenue North, Sherbrooke, Qc, J1H 5N4, Canada

§Corresponding author

Email addresses:

CAB: christiane.auray-blais@usherbrooke.ca

JP: johane.patenaude@usherbrooke.ca

Abstract

Background

The work of Research Ethics Boards (REBs), especially when involving genetics research and biobanks, has become more challenging with the growth of biotechnology and biomedical research. Some REBs have even rejected research projects where the use of a biobank with coded samples was an integral part of the study, the greatest fear being the lack of participant protection and uncontrolled use of biological samples or related genetic data. The risks of discrimination and stigmatization are a recurrent issue. In light of the increasing interest in biomedical research and the resulting benefits to the health of participants, it is imperative that practical solutions be found to the problems associated with the management of biobanks: namely, protecting the integrity of the research participants, as well as guaranteeing the security and confidentiality of the participant's information.

Methods

We aimed to devise a practical and efficient model for the management of biobanks in biomedical research where a medical archivist plays the pivotal role as a data-protection officer. The model had to reduce the burden placed on REBs responsible for the evaluation of genetics projects and, at the same time, maximize the protection of research participants.

Results

The proposed model includes the following: 1) a means of protecting the information in biobanks, 2) offers ways to provide follow-up information requested

about the participants, 3) protects the participant's confidentiality and 4) adequately deals with the ethical issues at stake in biobanking.

Conclusions

Until a governmental governance body is established in Quebec to guarantee the protection of research participants and establish harmonized guidelines for the management of biobanks in medical research, it is definitely up to REBs to find solutions that the present lack of guidelines poses. The model presented in this article offers a practical solution on a day-to-day basis for REBs, as well as researchers by promoting an archivist to a pivotal role in the process. It assures protection of all participants who altruistically donate their samples to generate and improve knowledge for better diagnosis and medical treatment.

Background

In Canada, Research Ethics Boards (REBs), also known as Research Ethics Committees (RECs), Institutional Review Boards (IRBs), and Ethical Review Boards (ERBs), have the mandate to approve, reject, propose modifications to, or terminate any proposed or ongoing research involving human subjects which is conducted within, or by members of, the institution, using the considerations set forth according to the Tri-Council Policy as the minimum standard. The authority of the REB being delegated through the institution's normal process of governance [1]. In Quebec, most REBs are under the administrative supervision of the Administrative Council of each medical centre. In fact, the everyday realities of life

as a patient and health care provider or research subject and researcher are framed by the institutional settings of health care and research institutions [2].

REBs have, as primary concerns, the protection of the integrity of participants, the need for participants to receive simple but efficient information in order to grant an informed consent, the maintenance of confidentiality of participant's data, and decisions to inform the participants on the research being conducted and the transmission of research results (if applicable). It was accurately stated that "Institutional Review Boards have considerable experience in dealing with issues of recruitment, informed consent, confidentiality, and balancing risks and benefits. The context of commercial biobanking, however is relatively new" [3]. With the advancement of biotechnology and the growth in biomedical research, the role of REBs has become more complex, especially regarding research in genetics and related biobanks. The competence of REBs has been extended "to protocols potentially affecting not only the physical integrity, but also the identity (social and familial) of an individual, bringing psychological and spiritual aspects to the forefront" [4].

Considering that there are no specific regulations in Quebec, nor in the rest of Canada to control the creation and management of biobanks arising from institutional research projects, major ethical issues are on the rise and are often left to be managed by REBs and their affiliated institution. Nevertheless, the Research Ethics Committees appear to be appropriate bodies for evaluating research projects involving biobanks [4]. Recently, in Quebec, a newly-formed Institute for Populations, Ethics and Governance [5] has been created. It is a non-profit

organization with the initial mission of coordinating large-scale research projects related to population genetics, genomics or proteomics taking place in member institutions. It had the initial mandate of managing the CARTaGENE project [6] and other biobanks in Quebec that wish to be so governed [7]. Therefore, every academic or research institution in Quebec with the above interests can become a member [5, 7], but is not obligated to. Presently, there is no governmental governance body, in Quebec, nor in the rest of Canada, to manage biobanks stemming from academic or institutional research projects. In fact, there are no established harmonized guidelines that could give directions to REBs in managing biobanks in order to insure the protection of research participants.

Consequently, the following difficult questions about biobanks are emerging on a daily basis for REBs: 1) How can a REB deal with the growing demands for collecting, processing and storing biological samples and related information in genetic research projects? 2) When a participant in a research project gives his consent for the storage of samples in biobanks, how can the REB provide adequate privacy protection for him? 3) How is it possible to maintain the security and integrity of the research participants with the use of coded samples? (In fact, the demands for coded samples are becoming the rule compared to the use of anonymous samples just a few years ago). 4) How is it possible for REBs to protect the confidentiality and security of genetic information arising from these biobanks? 5) How can the storage of biological materials be managed for an indefinite period of time as often requested by sponsors, funding bodies and pharmaceutical companies? 6) What are the assurances given by REBs to research participants that

their “informed consent” for the storage of their samples in biobanks is fully respected? 7) In the event of a discovery with clinical utility, how is it possible to recontact the research participants while respecting the confidentiality issue?

In light of the increasing interest in biomedical research [3, 4, 8, 9] and the resulting benefits to the health of participants, it is imperative that practical solutions be found to the problems associated with the management of biobanks: namely, the protection of the integrity of the research participants, as well as guaranteeing the security and confidentiality of their information data. REBs also have a dual responsibility: firstly, to safeguard the dignity, rights, safety and well-being of research participants; secondly, to facilitate the good conduct of high quality research [10, 11], without jeopardizing the integrity of research participants.

As members of institutional REBs for many years, we have noticed these growing concerns among our colleagues in trying to find answers to the questions raised above and the overall management of biobanks in genetics research. A recent Canadian survey among 43 REBs has clearly demonstrated the variability of answers and the difficulties arising from a fictional protocol involving the creation, use and management of bioabanks in a genetic study. REBs were asked: Do you think that this protocol is ethically acceptable by your REB? 23% refused the protocol categorically, 26% wanted the protocol to be reviewed by the PI before deciding, 26% refused on condition of certain modifications, 14% stipulated that the protocol was not within their mandate, 9% accepted the protocol but under certain conditions and only 1% approved it without conditions [12]. In another study, 44

Canadian biomedical REBs agreed to review a mock research protocol in functional neuroimaging involving biobanks. The distribution of decisions made by the participating REBs is as follows: 68.2% rejected the protocol because of the creation of a biobank, 22.7% approved the protocol but under certain conditions, 6.8% approved unconditionally and 2.3% preferred not to answer. Interestingly, among the 68.2% of REBs who rejected the protocol, 37% expressed concerns about access to research subjects' medical records, 30% questioned the building of a database and 30% mentioned that the study involving biobanks did not fall under their mandate or area of expertise [13]. These two studies reaffirm the great variability of motives and criteria involved in the decision-making process for REBs. Their difficulties in managing research projects with biobanks often pose barriers to research.

REBs evaluating genetic research projects also have to deal with a dual problematic: first, the samples collected in the principal study are almost always coded by the principal investigator who remains the keyholder; second, there are growing demands from pharmaceutical companies and funding agencies to store residual samples. Also, there are requests for additional samples from the same participants and the storage of these additional samples in biobanks for an indefinite number of years. There is thus an increasing need to deploy adequate measures of confidentiality and protection of the integrity of the research participants without jeopardizing information that could benefit the entire research process and, in the end, be of major importance to the health of the participants.

In this article, we present a practical model for the management of biobanks in biomedical research, which could alleviate the burden placed on REBs who are trying to evaluate genetics projects and at the same time, maximize the protection of research participants. Consequently, we will address the protection of the information related to biobanks, the means to provide follow-up information about the participant without breaching confidentiality, the possibility of recontacting the participants in the event of a clinical utility stemming from the research with biobank samples and the ethical issues at stake for participants in biobanking. But first, let us define the terminology of “biobanks” and the “identifiability of samples” or biological materials stored in biobanks.

Methods

Biobanks

Biobanks refer to organized collections of biological samples and the data associated with them [14]. In the context of genetic research, biobanks are defined as a cluster of biological samples obtained from a group of identified individuals selected according to the clinical or biological characteristics of one or more members of the group, as well as any and all derivatives of these samples [4]. The American National Bioethics Advisory Commission defined a DNA bank as a “facility that stores extracted DNA, transformed cell lines, frozen blood or other tissue, or biological materials, for future DNA analysis”. The same Commission defined a DNA databank as “a repository of genetic information obtained from the analysis of DNA, sometimes referred to as “DNA profiles”. DNA sample

collections are used for various purposes, such as for clinical, research and industrial uses [15]. Human biological samples in biobanks include organs (heart, liver, kidney, lung, pancreas, etc.), tissues, cells (somatic and gonadic), body fluids, hair, nails and body waste products [16]. Thus, biobanks are an important resource for identifying the causes and mechanisms of a large number of diseases, including, in particular, those that are widespread among the population [11]. Our ever greater understanding of the human genome is increasingly making it possible to determine the role, not only of environmental or lifestyle factors, but also of hereditary factors (genes) as the cause or disposition to disease (genetic epidemiology) [11].

Biobanks may be operated under the auspices of public sector institutions, such as university departments, individuals or private bodies - for example, pharmaceutical companies. Irrespective of the responsible institution, they may get funding from public or private sources [11]. In this article, we will address the problems facing biobanks created for institutional or academic research projects only, either publicly or privately funded.

Identifiability of samples for research purposes

Ambiguity is often the case when referring to identifiability of samples for research purposes. A few years ago, the American Society of Human Genetics described four types of identification of samples for research purposes: a) anonymous : biological materials that were originally collected without identifiers and are impossible to link to their sources; b) anonymised: biological materials that were originally identified, but have been irreversibly stripped of all identifiers and are

impossible to link to their sources; c) identifiable or coded or traceable : biological materials that are unidentified for research purposes, but can be linked to their sources through the use of a code. Decoding can only be done by the investigator or another member of the research team; d) identified: biological materials to which identifiers, such as name, patient number, or clear pedigree location, are attached and made available to the researchers [17]. Recently, the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products gave some guidance in dealing with coded samples, adding the category “double-coded samples and results”, where a first code is assigned to the sample and a second code is provided to link it to the results. The keycode linking the double coded pharmacogenomic samples and the information is kept by a third party. The research subject can only be linked with the sample or data obtained from it by bringing the two code keys together [18].

Even taking into account these precise definitions there is a tremendous variability in interpretations among REBs, regarding the four classes of identifiability [19]. So, in this article, we will be focusing mainly on issues concerning identifiable or coded samples in biobanking, also referred to as pseudonymized samples [11].

Procedure for the collection of specimens in institutional research projects

Let us consider the procedure for the collection of biological samples in institutional research projects often requested in the scope of a multi-centric trial by funding bodies, such as pharmaceutical companies. After the approval of the research project by the REB and after a signed informed consent from the participants is obtained, the collection of biological samples is performed by the

principal investigator's nurse coordinator at the clinical research centre affiliated to a medical centre where the patients are usually clinically treated and follow-up occurs. The samples are usually identified or coded with an alphanumeric code under the responsibility of the principal investigator (PI). Only the PI and a designated research coordinator have the keycode related to identifiers such as the name, date of birth, age, sex, disease, treatment, etc. The coded samples are then sent to the pharmaceutical or sponsoring company funding the project where haematological, biochemical, radiobiological, DNA analyses, etc. are done. Some research will look at the genotypic variation, others at the gene expression (at the RNA or protein level), and others still at the viral or tumoral genotype [20]. Often, in these multi-centric or international projects, samples from many collaborating countries are sent to a central lab where the analyses are performed by trained personnel using validated and uniform techniques.

In principle, it is not possible for the funding bodies to access the codes and thus find a link to the source. However, the American Society of Human Genetics (ASHG) recommended that investigators inform individuals that they cannot guarantee absolute confidentiality [21]. The ethics committee of the ASHG recommended that researchers “consider a way of coding samples by a third, independent party, who would keep the codes inaccessible unless there are specific circumstances in which the code needs to be broken” [15].

Also, what is often the case in pharmacogenetics research, a second specimen or residual specimen is requested for molecular genetics studies in order to better

understand the disease, its response to drug and the possible adverse events. These samples are requested for storage in biobanks at the company's facilities, usually for an indefinite period of time. Currently, there is a growing need for coded second-specimen samples (in the past, such request samples were anonymous) and these requests involve serious ethical issues that must be dealt with by REBs.

Ethical issues at stake for research participants in biobanking

There is a pluralism of values at stake as regards to patients, research participants, authorities, the medical profession, scientists and the general public concerning the storage and use of human tissue samples [22, 23], the importance of which may vary according to the individual involved.

1. Informed consent

It is generally accepted that the necessity of “Informed Consent” within the context of research is an absolute imperative [24]. In research involving biobanks, there are two main principles to be respected for the benefit of the participant who agrees to provide samples : obtaining his informed consent and determining the risk/benefit balance by the REB. Putting forward a legal framework for research involving biobanks, the German National Ethics Council, in a recent opinion, states as its first guiding principle, that “the central element of all regulatory proposals must be the donor's right of self-determination. This means that the collection of substances from his body and the gathering of personal data, for subsequent use in biobanks for the purposes of medical research, must be subject to the donor's consent. The consent is effective if the donor has the capacity to give consent, the consent is

given voluntarily and the donor has been appropriately informed of the purposes, nature, significance and implications of the collection and use” [11]. After assessing the voluntary nature of the participation, it is the responsibility of the REBs to evaluate other important issues such as the possibility of stigmatization or discrimination in discrete subpopulations, traditional communities, such as indigenous peoples [11] (even if the research subjects samples are coded) and the possibility of benefit sharing of revenues that could be generated by the research.

It was recently mentioned that, “while it is possible to obtain informed consent to have one’s blood, cells or tissue samples taken by researchers for a specific research project, the very intention of setting up such large data banks precludes giving informed consent for all the possible ways in which the information derived from that sample can be used for future research” [3]. But, given the speed of scientific development in the area of genetics and the vast spectrum of potential research hypotheses that may arise and can legitimately be addressed by such databanks, there is no way to predict possible future uses of donated samples [25]. It is up to the REB to “develop their own guidelines to evaluate research with stored biological materials” [20, 26] to respect the consent of participants. An interesting recent survey revealed that the donor informed consent procedures in tissue-based research should be rethought: perhaps information about research objectives is seen more as a service than a safeguard (i.e., is nice to have but not important), which would imply that bioethicists should work to ensure safeguards other than informed consent. In fact, it has been suggested to focus attention on the establishment of

tissue-trustee infrastructures, rather than consent issues, to ensure the confidence of the donating public [27].

Nevertheless, it is essential for REBs to put in place means for the logistics involved in the uses of donor's specimens stored in biobanks for the purposes of medical research.

2. Confidentiality issue

Areas of concern related to confidentiality in the context of commercial biobanking include handling of identifiers, physical and other kinds of security, and transfer of samples and information [28, 29]. The breach of confidentiality resulting from the mishandling of personal information is an important issue in pharmagenomics (and pharmacogenetics). This informational risk is due to the personal, familial, and social nature of genetic information as well as its potential to discriminate and stigmatize [20]. Points to consider by researchers and Institutional Review Boards (IRBs) have recently been suggested in determining various levels of confidentiality, within the framework of pharmacogenomics research where researchers decide the level of protection best suited for their research protocols [20]. Clearly, both researchers and IRBs will need to work in unison, on a case by case basis, with participant confidentiality as a primary concern. In the end, IRBs will have to evaluate the final acceptable level of confidentiality.

One of the guiding principles of the German National Ethical Council is that donors must be protected by an obligation of confidentiality on the part of all involved in

the establishment and use of biobanks. When not provided by law, this obligation of confidentiality must be imposed by the institution itself, either in its statutes or by contract [11]. A study to determine if REBs provided ethical guidance in research involving stored biological specimens revealed that, although most REBs mention the confidentiality issue, “fewer than 30% suggested steps for protecting confidentiality” [26]. Hence, it is up to each REB to be vigilant in respecting the statutes of its own institution and also in establishing protocols and guidelines (if not already established) to ensure protection of the genetic data information of the research participants.

3. Privacy issue and protection of information

A recent survey in Sweden revealed that in spite of widespread bioethical debate about the presumed sensitivity of genotype information, management of medical records and clinical data appear to remain of great concern to the donating public [30]. Guidelines developed by the Ethics Committee of the Swedish Medical Research Council stress the importance of protecting individual data and advise that codes linking data held in a biobank to an individual should be kept within a public institution such as a university or medical authority [31]. If inadequate attention is paid to security, unauthorized individuals can access electronically stored information and use it for illicit purposes. As a result people are increasingly worried about their privacy and want stricter control over who has access to information about them and under what conditions [19, 32]. Issues of privacy have become entangled with bioinformatics as, increasingly, we rely on technology rather than on human beings to resolve privacy issues [33]. Fears of discrimination

by employers and insurers are definitely of increasing importance for participants in genetic research. Many may fear that their genetic information could be shared with third parties (insurers, employers), who sometimes require that the individual provide a general release of his medical records or information relating to his participation in research projects.

It is essential that operational rules be established by REBs so that the conditions of access to biobanks are clearly determined and are acceptable to the research participants.

Results

A proposed biobank management model for institutional research

We propose a model for the management of biobanks in biomedical research. Figure 1 represents a schematic description of this model, taking into account the administration levels encountered in a medical centre. This model is based on the use of two codes, each being specifically attributed to a definite part of the study: Part 1: collection of samples with a specific code (code 1) for the research project and Part 2: collection of samples with a specific code (code 2) to be stored in a biobank for genetic analyses.

Part 1 (Code 1).- After approval of the research project by the REB and informed consent obtained from willing participants, samples are collected and coded. For this main study, an alphanumeric code (code 1) is given to each sample. The

principal investigator of the project, at the institution, is responsible for keycode no. 1. The coded samples are then usually sent to the pharmaceutical company for analyses, as previously described.

Presently, the PI is the one responsible for managing the schedule of conservation, as well as the destruction and withdrawal of the coded samples. In the model presented herein, the PI has the option of bestowing this responsibility on a medical archivist, who has to respect the law and regulations applicable to managing archives in medical centres, the archivist being a key person in maintaining the confidentiality [34, 35]. Since clinical researchers, in an academic institution, are also practicing physicians, teaching, as well as doing research in many projects (multi-centric or not), they can go on sabbatical, be on vacation, take sick-leave and eventually retire, it could probably be a very interesting option for them to have a professional medical archivist at their medical centre taking care of this very important task of managing coded samples from research projects. Since coded research samples may be kept for a period of time that may vary from a few weeks to many years, depending on the protocol of the funding bodies, a schedule of conservation and management of samples could be established in collaboration with the researcher, upon acceptance of this procedure. Therefore, the archivist would receive the keycode for that particular research project, and effectively manage the samples on a daily basis, always in close cooperation with the PI. We thus propose a collaboration between PI and archivist to maintain an efficient way of managing coded samples necessary for the main study.

Part 2 (Code 2).- The second part of the study represents the collection of samples for the biobank. The responsibilities and obligations of the PI can be divided into 3 important sections in this biobank part of the project: 1) to evaluate whether the ethics principles involved are respected in the creation of the biobank, as well as the need, reasons, objectives and scientific importance for biobanking in the first place; 2) to explain the preceding section to the REB and to provide answers to their questions; 3) upon acceptance of the creation of the biobank by the REB, the PI must explain to the research participants, in the most comprehensible way, the scientific importance of giving their biological samples to the biobank and all circumstances likely to be relevant to their decision to grant or refuse the biobanking, such as the need, the purposes, the nature, the scope and duration of the proposed use, the extent and conditions of a possible transfer of samples and data, the form of data storage and linkage, the possibility of withdrawal of consent at any time, the commercial prospects, the benefit sharing [11], the possibility of being recontacted (or not) in the event of a discovery of medical utility and inform them about the role of the archivist, as the person in charge of the management of the biobank. These are crucial responsibilities and obligations that the PI can not delegate to the archivist.

As mentioned previously, REBs must approve biobanking and set detailed conditions for access to the biobanks and their use. The research participants, after receiving complete information about the biobank and responses to their possible questions, sign a separate consent form in which they agree to donate their biological samples to the biobank. In the proposed model, an alphanumeric code is

then attributed, by a medical archivist, to each sample (code 2). The samples are then sent to the central laboratory of the company, where the analyses are performed. The only person having the keycode no. 2 is the archivist. The archivist, as a third party, has the role of a data-protection officer [11, 36, 37] or trustee [28] who is independent from the research project. However, this role is relatively different from an honest broker system [38]: first, the archivist is appointed by the institution, under the responsibility of the Director of Professional Services of the medical centre and in accordance with the Clinical Research Centre, where the research is performed, not the REB (as often seen with the honest broker system). Secondly, the educational training, role, duty, obligations and responsibilities of the medical archivists are different, in comparison to an honest broker, who can be a nurse, a clinical clerk and/or a computer software system, etc. Also, the archivist has been trained to adequately manage the schedule of retention of charts in a medical centre, so it would be easy to apply the same principles to coded samples in a research project (conservation, destruction, withdrawal). The archivist will ensure the protection of data and supervise the biobank. Hence, it is the responsibility of the archivist to ensure good compliance with the legal requirements applicable when handling personal information and data [34, 35]. Regarding ethics principles involved, the archivist has the obligation to respect the Code of Ethics and politics of confidentiality instigated by the medical centre, and legally, the different laws applicable in Quebec, such as the Archives Act and Regulations [34, 35], the Health services and social services Act [39], the *Civil Code of Quebec* [40], the Access to documents held by public bodies and the protection of personal information Act [41]. The role of the archivist is thus under the governance of ethical and legal

frameworks, that are oriented towards the protection of the integrity of patients, who can also be research participants in biomedical research.

Furthermore, it was recently recommended that the researcher can not have access to keycode no. 2 “so that he cannot by himself link them to the person concerned. In this case, as in that of anonymization, the researchers lack the possibility of relating samples and data to their donors” [11, 36]. The reality of biobanks is such that the role of the PI is very limited. He is not responsible for the genetics research being done at the pharmaceutical company, nor is he implicated in the direction that the research will take. He may however be asked to give information regarding the medical condition of the research participant, the side effects of a specific drug, etc. The role of the archivist as a data-protector is essential in coordinating and answering these particular questions.

Furthermore, in the event of a clinical utility stemming from the research with biobank samples, it could be important to recontact the research participants. The pharmaceutical companies and funding agencies would then have to contact the PI to reveal the importance of the discovery and the need to recontact the participants. After confirming the importance of the discovery and the need of recontacting the participants, the PI would then resubmit this new demand to the REB of his institution. The REB would have the responsibility to evaluate the merits of recontact, the proportionality of risks and benefits involved and even in certain cases, the probable social consequences that could arise. If there is an approval by the REB to recontact the participants, the REB would then inform the archivist who

would verify if the participants have previously agreed in their consent form to be recontacted. If so, the archivist could proceed to recontact the participants and inform them of the particular beneficial situation. A meeting with the PI would then be scheduled for further explanation.

The archivist plays an essential role in this model, since he/she holds the research protocol and the signed consent form from the participant, in order to verify that his wishes are in accord with the agreement established at the start of the project. Apart from being the keyholder of coding no. 2, the archivist will also be responsible for the schedule of conservation, the destruction or for the withdrawal of specimens. Also, a participant who decides to terminate his participation in the project will have the opportunity to withdraw at any time from the study, the samples being coded. In addition, if the pharmaceutical company decides to ask questions relating to the clinical aspects of the project, such as the response of the participant to a specific drug, his current medical situation, etc., the archivist will be able to answer the questions, while ensuring the confidentiality of data.

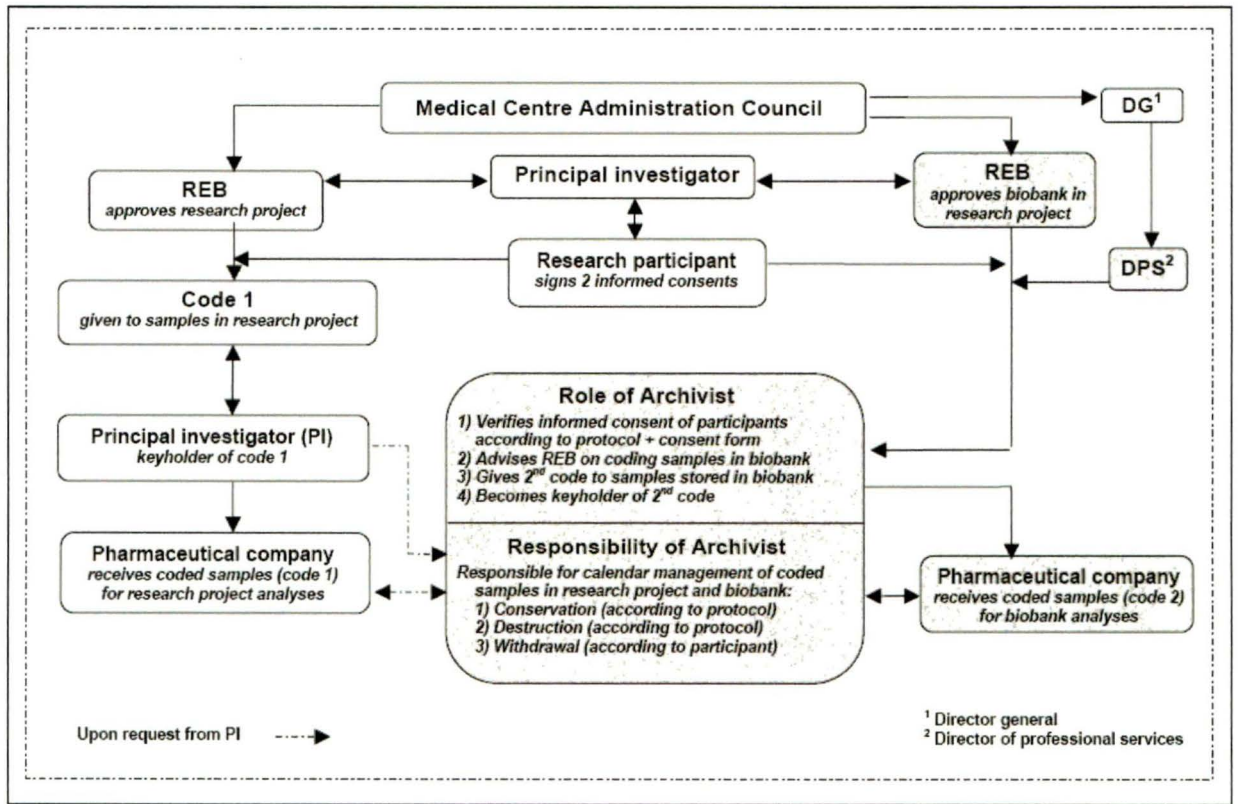


Figure 1 -Schematic diagram of management model for biobanks. (Shaded areas are for biobank management).

Discussion

The model for managing biobanks presented herein is simple, efficient, and offers interesting practical possibilities for Research Ethics Boards, the researcher and the funding bodies, and mostly, is of major importance for the protection of the integrity of the research participant. The proposed model is novel regarding the fact that it does not require new personnel, committees or training of any kind. In fact, it favours the use of trained medical archivists, who are part of an infrastructure

already in place in a medical centre, and who have proven to be efficient throughout the years in managing charts of patients, under specific laws and a strict code of ethics, to assure the management of the research biobanks. It also answers questions mentioned in the introduction, regarding the day-to-day collection, storage and processing of samples in biobanks. It insures a high degree of confidentiality, security of data information and protection of the integrity of the participants while using coded samples in the biobank that are distinct from that in the main research project. It offers the possibility of managing stored biological samples for a prolonged period of time, allowing research participants to withdraw their samples at any time, by a simple request to the archivist. It also favours the possibility for the funding body of asking information about the medical condition of the participant taking part in the research project, without breaching confidentiality. If a discovery of a medical utility arises, it is also feasible under this model to recontact the research participants.

These aspects are of major importance to the REB enabling it to ensure better protection of the integrity of the research participant. Evidently, the use of two non-related keycodes (keycodes 1 and 2), where the researcher has no access to keycode 2 for the samples and related information for the biobanks (he cannot by himself tie them to the participant), favours the highest level of confidentiality and security of the biobank data for the participant.

The model also respects the informed consent of the research participant, while having a health-care professional, such as an archivist or data-protection officer, in

charge of the biobank and to whom they have entrusted their biological samples, as well as the related information and data. This situation will promote an evolutive, dynamic communication process between the funding body and the data-protection officer, facilitating exchanges of information. In the overall procedure, this model will also permit the sharing of valuable medical information on the participant, since the keycode offers a link to the biobank analyses, this may enhance the repercussions of the research project. The participant can also decide to withdraw his consent for the use of his samples and related data at any time, simply by asking the archivist. It also offers the possibility for the funding body to provide results of the research done to the participants, if they agreed to this in the first place in their informed consent.

Conclusions

As long time members of REBs, we have been able to assess the burden on REBs in trying to evaluate research projects involving the use of storage samples in biobanks. The recurrent problems concerned the assurance of protection of the integrity of the participant, as well as the confidentiality and security of related data. We have presented two surveys clearly demonstrating the difficulties for REBs to manage research projects with biobanks and the high percentage of rejection of protocols involving the use of biobanks where coded samples were an integral part of the study. The greatest fear encountered being the lack of participant protection

and uncontrolled use of biological samples or related genetic data. The risks of discrimination and stigmatization being a recurrent issue.

Until a governmental governance body is established in Quebec to guarantee the protection of research participants and establish harmonized guidelines for the management of biobanks in medical research, it is definitely up to REBs to find solutions. We therefore think that this model of biobanks management in medical research will offer an interesting solution on a day-to-day basis for REBs (hopefully in many countries), as well as for researchers, and in the end, assure protection of all participants who altruistically donate their samples to generate and improve knowledge for better diagnosis and medical treatment.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

CAB contributed substantially to the research, conception, design and development of the biobank management model. JP made substantial contribution to the development of the biobank management model. The two co-authors contributed to the drafting of the manuscript and have approved this final version in view of its publication.

Acknowledgements

The authors are very grateful to Michel Auray, H el ene Dionne and Gerald P. Holmquist for carefully revising the manuscript and Denise Mathieu for her excellent secretarial work. We would like to acknowledge the support of the CIHR.

References

1. Tri-Council Policy Statement: *Ethical Conduct for Research Involving Humans*. Canada; 1998, updates 2000, 2002.
2. McDonald M: **Canadian governance of health research involving human subjects: is anybody minding the store?** *Health Law J* 2001, **9**:1-21.
3. Rothstein MA: **The role of IRBs in research involving commercial biobanks.** *J Law Med Ethics* 2002, **30**(1):105-108.
4. Moutel G, de Montgolfier S, Duchange N, Sharara L, Beaumont C, Herve C: **Study of the involvement of research ethics committees in the constitution and use of biobanks in France.** *Pharmacogenetics* 2004, **14**(3):195-198.
5. IPEG: The Institute for Populations, Ethics and Governance. [<http://Cartagene.qc.ca>]; 2003.
6. CARTaGENE: project. [<http://Cartagene.qc.ca>]; 1999.
7. Desch enes M, Sall ee C: **Accountability in population biobanking: comparative approaches.** *J Law Med Ethics* 2005, **33**(1):40-53.

8. Andrews LB: **Harnessing the benefits of biobanks.** *J Law Med Ethics* 2005, **33**(1):22-30.
9. Webster A, Martin P, Lewis G, Smart A: **Integrating pharmacogenetics into society: in search of a model.** *Nat Rev Genet* 2004, **5**(9):663-669.
10. Beyleveld D: **Law, ethics and research ethics committees.** *Med Law* 2002, **21**(1):57-75.
11. German National Ethics Council, *Opinion on biobanks for research.* [www.ethikrat.org]; 2004.
12. Patenaude J, de Champlain J: **La recherche impliquant la création d'une biobanque publique de données génétiques de type populationnel: problèmes rencontrés chez des comités d'éthique de la recherche au Canada.** *L'Observatoire de la génétique* 2004, Juin. [www.ircm.qc.ca/bioethique/obsgenetique/cadrages/cadr2004/cno170403.htm
1]
13. de Champlain J, Patenaude J: **Review by Canadian Research Ethics Board of a mock research protocol in functional neuroimaging.** *J. Med. Ethics* 2006, **32**:530-534.
14. Cambon-Thomsen A: **The social and ethical issues of post-genomic human biobanks.** *Nat Rev Genet* 2004, **5**(11):866-873.
15. Godard B, Schmidtke J, Cassiman JJ, Aymé S: **Data storage and DNA banking for biomedical research: informed consent, confidentiality, quality issues, ownership, return of benefits. A professional perspective.** *Eur J Hum Genet* 2003, **11 Suppl 2**:S88-122.

-
16. Reymond MA, Steinert R, Escourrou J, Fourtanier G: **Ethical, legal and economic issues raised by the use of human tissue in postgenomic research.** *Dig Dis* 2002, **20**(3-4):257-265.
 17. The American Society of Human Genetics. **ASHG report: Statement on informed consent for genetic research.** *Am J Hum Genet* 1996, **59**: 471-474.
 18. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products: *Position Paper on Terminology in Pharmacogenetics.* [<http://www.emea.eu.int/pdfs/>]; 2004.
 19. Clayton EW: **Informed consent and biobanks.** *J Law Med Ethics* 2005, **33**(1):15-21.
 20. Joly Y, Knoppers BM, Nguyen MT: **Stored tissue samples: through the confidentiality maze.** *Pharmacogenomics J* 2005, **5**(1):2-5.
 21. American Society of Human Genetics (ASHG). Response to National Bioethics Advisory Commission on the ethical issues and policy concerns surrounding research using human biological samples. [www.bioethics.gov]; 1999.
 22. Hansson M: *The use of human biobanks - Report 1. Ethical, Social, Economical and Legal Aspects.* Uppsala University; 2001.
 23. CEST: Commission de l'éthique de la science et de la technologie pour l'Avis ministériel sur : *Les enjeux éthiques des banques d'information génétiques : pour un encadrement démocratique et responsable.* Avis mandaté par le ministre des Finances, de l'Économie et de la Recherche. Gouvernement du Québec, [www.ethique.gouv.qc.ca]; 2003.

24. Sheikh AA: **Genetic research & human biological samples: some legal and ethical considerations.** *Med Law* 2004, **23**(4):897-912.
25. Caulfield T, Upshur RE, Daar A: **DNA databanks and consent: a suggested policy option involving an authorization model.** *BMC Med Ethics* 2003, **4**(1):E1.
26. Wolf LE, Lo B: **Untapped potential: IRB guidance for the ethical research use of stored biological materials.** *IRB* 2004, **26**(4):1-8.
27. Hoeyer K, Olofsson BO, Mjorndal T, Lynoe N: **The ethics of research using biobanks: reason to question the importance attributed to informed consent.** *Arch Intern Med* 2005, **165**(1):97-100.
28. Anderlik MR: **Commercial biobanks and genetic research: ethical and legal issues.** *Am J Pharmacogenomics* 2003, **3**(3):203-215.
29. Network of Applied Genetic Medicine, *Statement of Principles on the Ethical conduct of Human Gene Research Involving Populations.* Montreal, Qc. [<http://www.rmga.qc.ca/en/index.htm>]; 2003.
30. Hoeyer K, Olofsson BO, Mjorndal T, Lynoe N: **Informed consent and biobanks: a population-based study of attitudes towards tissue donation for genetic research.** *Scand J Public Health* 2004, **32**(3):224-229.
31. Abbott A: **Sweden sets ethical standards for use of genetic 'biobanks'.** *Nature* 1999, **400**(6739):3.
32. Hansson SO: **The ethics of biobanks.** *Camb Q Healthc Ethics* 2004, **13**(4):319-326.

-
33. Knoppers BM, Chadwick R: **Human genetic research: emerging trends in ethics**. *Nat Rev Genet* 2005, **6**(1):75-79.
 34. Archives Act, R.S.Q. c. A-21.1, Quebec. [www.canlii.org/qc/laws/sta/a-21.1/20050616/whole.html]; 1983.
 35. Retention schedules, transfer, deposit and disposal of public archives, Regulation respecting, R.Q. c. A-21.1, r.1, Quebec. [www.canlii.org/qc/laws/sta/a-21.1/20050616/whole.html]; 1985.
 36. Knoppers BM: **Biobanks: simplifying consent**. *Nat Rev Genet* 2004, **5**(7):485.
 37. Knoppers BM: **Biobanking: International norms**. *J Law Med Ethics* 2005, **33**(1):7-14.
 38. University of Pittsburgh: **IRB guidance on research limited to retrospective medical record reviews**, [www.irb.pitt.edu]; 2005.
 39. Health services and social services, An Act respecting, R.S.Q. c. S-4.2 Quebec. [www.canlii.org/qc/laws/sta/s-4.2/]; 1991.
 40. *Civil code of Quebec*, S.Q., 1991, c. 64, Quebec. [www.justice.gouv.qc.ca/english/sujets/glossaire/code-civil-a.htm]
 41. Access to documents held by public bodies and the protection of personal information, An Act respecting, R.S.Q., chapter A-2.1, Quebec. [www.cai.gouv.qc.ca/index-en.html]; 1982.

Chapitre VI - Cinquième Article

Biobanking Primer: Down to basics

Christiane Auray-Blais* et Johane Patenaude,

Science. 2007 May 11;316(5826):830.

Christiane Auray-Blais a élaboré les idées, conçu la structure et développé les stratégies mentionnées dans cette publication. Elle a rédigé l'article et est l'auteure pour la correspondance.

Résumé

Les conséquences de l'utilisation de biobanques pour la recherche ne se limitent pas à l'individu, puisque les répercussions peuvent toucher la famille toute entière, de même que différentes ethnies faisant partie de projets de recherche. Les membres de l'équipe de recherche et le comité d'éthique de la recherche (CÉR) travaillent conjointement pour mener à bien l'obtention d'un consentement éclairé et assurer la protection des participants et la confidentialité de l'information génétique, médicale et socio-démographique qui s'y rattachent. Comment peuvent-ils respecter les responsabilités qui leur incombent? Ont-ils l'expertise nécessaire? Nous présentons une stratégie à 3 volets impliquant les chercheurs, les membres des comités d'éthique et l'institution. Cette stratégie devrait faire partie de bonnes pratiques éthiques de chaque institution afin de garantir un processus efficace et cohérent dans l'obtention d'une participation informée.

Science

Letter

Biobanking Primer: Down to basics

Christiane Auray-Blais^{1*} and Johane Patenaude²

One sentence summary: In light of increasing interest in biobanking, ongoing training of members of REBs and research personnel should be part of the good ethical practice of every institution in order to ensure a more efficient and coherent process in obtaining an informed participation.

Abstract

The implications of biobanking for research go well beyond the participant to the family and include general findings about discrete subpopulations. Research personnel and members of Research Ethics Boards (REBs), share responsibility for obtaining informed consent and ensuring the protection of participants and the confidentiality of genetic and other medical and socio-demographic information. How is it possible for them to fulfill their responsibilities? Do they have the necessary expertise? We present a three-pronged strategy for researchers and members of REBs which should be part of good ethical practice in every institution in order to ensure a more efficient and coherent process in obtaining informed participation.

Collection and storage of biological samples for genetic research are increasing (1). The implications of biobanking go well beyond the participant to the family and include general findings about discrete subpopulations (2). Research personnel and members of Research Ethics Boards (REBs) share responsibility for obtaining informed consent and ensuring the protection of participants and the confidentiality of personal genetic and other medical and sociodemographic information (3). Do they have the necessary expertise to fulfill these responsibilities? They need to be aware of new normative frameworks that address ethical issues in population-based genetics research (4) and to understand that guiding principles in traditional medical ethics might not be sufficient (5). Several studies have noted variability in the way REBs evaluate a given research protocol, running the gamut from approval without condition to refusal (3, 6, 7). Ongoing training for those involved in biobanks should be a fundamental institutional priority to obtain appropriate informed consent from participants.

Three essential elements must be addressed. First, the principal investigator (PI) must ensure that research personnel are competent to provide simplified, yet complete, information when recruiting participants for biobanking studies.

Secondly, REBs must provide training specific to biobanking. Institutions should provide funds permitting this ongoing training for researchers, as well as REBs, where the requirement for expertise is essential. Those needing biobanks should contribute financially to relevant ethics training. This could be made mandatory for research personnel.

Thirdly, the study population should be involved. The PI, working with the REB, needs to ensure that they are well informed about the research and biobanks. This partnership would help to bridge the gap between two entities that are often more like adversaries, rather than partners with the same objectives. This three-pronged strategy underpins the principles of the 2003 *International Declaration on Human Genetic Data* of UNESCO, article 24 (8).

In light of the increasing interest in biobanking, training of REBs and research personnel should be part of the mission of every institution to ensure a more coherent process in obtaining informed participation. Such training would be applicable to many similar innovative initiatives.

CHRISTIANE AURAY-BLAIS^{1*} AND JOHANE PATENAUDE²

¹ **Service of Genetics, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Qc, Canada J1H 5N4**

² **Department of Surgery, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Qc, Canada J1H 5N4**

***To whom correspondence should be addressed. E-mail: christiane.auray-blais@usherbrooke.ca**

References and links

1. Creation and Governance of Human Genetic Research Databases (OECD Publishing, Paris, 2006) (www.oecd.org/dataoecd/61/49/37647362.pdf).

2. German National Ethics Council, Opinion on biobanks for research (2004) (see www.ethikrat.org).
3. C. Auray-Blais, J. Patenaude, *BMC Med. Ethics* 7,1 (2006).
4. B.M. Knoppers, R. Chadwick, *Nature Rev. Genet.* 6, 75 (2005).
5. J.E. Lunshot, *Nature Rev. Genet.* 7, 162 (2006).
6. P. Glasziou, I. Chalmers, *Br. Med. J* 328, 121 (2004).
7. J. de Champlain, J. Patenaude, *J. Med. Ethics* 32, 530 (2006).
8. UNESCO, International Declaration on Human Genetic Data, (2003), (see www.unesco.org/confgen/2003/genetic/).

Chapitre VII - Discussion générale**VII.1 Pourquoi procéder au développement d'une méthode d'analyse par LC-MS/MS du biomarqueur Gb₃ à partir de l'urine prélevée sur papier filtre chez des patients atteints de la maladie de Fabry?**

Les concentrations du Gb₃ urinaire et sanguin ont été étudiées comme biomarqueurs potentiels de la sévérité de la maladie de Fabry (Boscaro et al., 2002; Fauler et al., 2005; Fuller et al., 2005; Kitagawa et al., 2005). Le Gb₃ urinaire, provenant de l'accumulation de glycolipides accumulés dans les cellules épithéliales rénales, est le biomarqueur excrété en plus grande quantité chez les patients atteints de la maladie de Fabry. En fait, l'excrétion du Gb₃ est 66 fois plus élevée comparée aux contrôles normaux et ce, en comparaison avec le sang dont l'excrétion est de seulement 2.6 fois la valeur des contrôles (Mills et al., 2005b). Ceci en fait donc un indicateur de choix pour ladite maladie.

Plusieurs techniques existantes de l'analyse du Gb₃ urinaire rapportées dans la littérature étaient longues et fastidieuses, car elles nécessitaient plusieurs étapes d'extraction, de centrifugation, d'évaporation et de sonication. Une trop grande quantité de protéines et d'autres débris urinaires représentait aussi une problématique majeure. Cette accumulation de protéines et de débris nécessitait des étapes supplémentaires de traitement de la matrice, c'est-à-dire une extraction avec des solvants organiques, le brassage pendant une période de 30 minutes et une filtration à travers une colonne spécifique, pour ensuite procéder à l'injection sur le MS/MS (Kitagawa et al., 2005). Comme il est reconnu que les patients ayant la

maladie de Fabry ont souvent une excrétion importante de protéines urinaires (Nakao et al., 2003; Mehta et al., 2004; Ries et al., 2004; Sunder-Plassmann, 2006), la procédure d'extraction de l'urine devenait essentielle d'un patient à l'autre.

Notre longue expérience de travail avec des urines déposées sur papier filtre, dans le cadre du dépistage de maladies métaboliques héréditaires, nous a incité à orienter nos expériences vers la faisabilité d'éluer une macromolécule, en l'occurrence un glycosphingolipide, à partir de l'urine séchée sur papier filtre. Au départ nous étions sceptiques, considérant que la procédure d'élution faite dans le cadre du Programme de dépistage avait été appliquée à de plus petites molécules, telles les acides aminés et les acides organiques. Évidemment, le processus d'élution ne s'est pas fait sans heurts. Plusieurs essais ont dus être tentés pour en arriver à une récupération acceptable du Gb₃ de plus de 90%. Quant au processus nécessaire pour extraire le Gb₃ des débris urinaires (en faisant éclater les cellules épithéliales rénales, comme les cellules tubulaires distales qui en sont gorgées), nous avons opté pour comparer la sonication et l'homogénéisation. En procédant au processus d'homogénéisation, nous avons obtenu une récupération supérieure de 16 à 52% comparé à la sonication et ce, pour des concentrations de Gb₃ variant de 0.125 à 50 µg/ml respectivement.

Le fait d'utiliser des échantillons prélevés sur papier filtre pour procéder aux analyses par spectrométrie de masse en tandem nous a aussi grandement facilité la tâche. En effet, le papier filtre agit comme un « adsorbant » qui retient les protéines indésirables mais permet l'élution du Gb₃ lorsqu'on applique un brassage rotatif adéquat avec un solvant organique. Ceci s'est avéré particulièrement révélateur en

comparaison aux essais tentés avec l'urine « liquide », où des quantités importantes de protéines se retrouvaient au fond des tubes. Aussi, les échantillons d'urine séchée sur papier filtre sont facilement prélevés par les patients et expédiés par la poste à un moindre coût que les prélèvements d'urine liquide.

La technique présentée est simple, spécifique et intéressante pour les laboratoires de dépistage à haut risque qui reçoivent une multitude d'échantillons. En effet, elle peut être appliquée dans le cadre du dépistage d'un patient chez qui la maladie de Fabry est soupçonnée ou dans l'orientation du diagnostic d'une maladie suite à des symptômes cliniques révélateurs ou encore dans le monitoring des patients qui sont sous thérapie enzymatique de remplacement, afin de mieux suivre l'évolution de la maladie sur le plan biochimique.

VII.2 Pourquoi associer l'analyse du Gb₃ total urinaire au Programme de dépistage urinaire de maladies métaboliques héréditaires?

La maladie de Fabry est l'une des maladies de surcharge les plus fréquemment rencontrées, après la maladie de Gaucher (Fuller et al., 2006). Elle présente une grande hétérogénéité tant au niveau des symptômes cliniques et de leur sévérité que de l'âge d'apparition des symptômes, ce qui mène souvent à des diagnostics erronés ou à un retard considérable dans la confirmation de ceux-ci. De fait, il a été rapporté que plus d'une dizaine d'années peuvent s'écouler entre le début des consultations auprès de différents spécialistes et la confirmation du diagnostic de la maladie (Sunder-Plassmann et Födinger, 2006).

Les critères pour un dépistage populationnel traditionnel ont été établis il y a près de 40 ans (Wilson et Jungner, 1968). Un des critères importants est celui du traitement précoce, qui devient possible suite à un dépistage populationnel et qui doit prévenir la morbidité et la mortalité de l'individu. Le dépistage de la maladie de Fabry a suscité de l'intérêt au cours des dernières années, car un traitement est maintenant disponible. Le dépistage sanguin de la maladie de Fabry par l'analyse de l'activité de l' α -galactosidase A élue à partir du sang séché a été offert à une population de nouveau-nés de sexe masculin en Italie, où l'incidence de la maladie chez cette population est élevée, à 1 :3 100 (Spada et al., 2006). Ce test sanguin qui est basé sur une diminution de l'activité de l' α -galactosidase A ne permet l'identification que de 67% des hétérozygotes femelles, ce qui implique un taux élevé de faux-négatifs (Linthorst et al., 2005). Aussi, une prévalence 10 fois plus élevée de la maladie de Fabry a été retrouvée chez les patients dialysés en phase terminale de maladie rénale. De façon similaire, les cardiologues ont montré une prévalence élevée de la maladie de Fabry chez des patients présentant une hypertrophie ventriculaire gauche (Sunder-Plassmann et Födinger, 2006).

La présente publication fait donc un lien entre les résultats du Programme de dépistage urinaire de petites molécules qui existe actuellement et la possibilité d'une étude de faisabilité au niveau des macromolécules chez les nouveau-nés du Québec, par l'étude du Gb₃ total urinaire par LC-MS/MS. Un diagramme de l'infrastructure actuelle du Programme de dépistage offre la possibilité de l'ajout d'un nouveau test sans problème. Cette étude de faisabilité pourrait nous permettre d'évaluer l'incidence de la maladie de Fabry au Québec et ce, après avoir obtenu un

consentement libre et éclairé de la part des parents et la signature d'un formulaire de participation informée. Rappelons-nous que ce sont les parents qui prélèvent et expédient le prélèvement d'urine de leur enfant à 21 jours de vie. Nos résultats montrent une stabilité du Gb₃ sur papier filtre pour une période d'au moins 7 semaines à 4 températures différentes. Ceci garantit une qualité de conservation du prélèvement et ce, de la collecte urinaire à sa réception au laboratoire. De plus, la spécificité et la sensibilité de l'analyse par LC-MS/MS permettent la détection d'un patient atteint de la maladie de Fabry face à un contrôle normal dans des urines prélevées sur papier filtre.

Plus de 72 000 échantillons d'urine de nouveau-nés sont reçus annuellement de tous les coins du Québec et aussi de la population du Nunavut, soit une collaboration parentale de 90%. Nous sommes le seul endroit au monde à bénéficier d'une collaboration volontaire d'une telle envergure.

Nous croyons donc qu'il serait important de pouvoir établir une étude de faisabilité de l'analyse du Gb₃ urinaire dans une population de nouveau-nés suite à l'obtention d'un consentement libre et éclairé de la part des parents. Afin d'assurer une participation informée des parents, nous procéderions de la même façon que pour le projet-pilote du dépistage du neuroblastome entrepris il y a quelques années : nous fournirions aux parents un dépliant expliquant le but de l'étude de faisabilité, la nature et la description complète de la maladie, sa grande hétérogénéité au niveau des symptômes cliniques et de leur apparition, la description du traitement et ses conséquences, la possibilité de participer ou non à l'étude, la possibilité de recevoir ou non les résultats, les avantages, les risques et les inconvénients et ce, afin de leur permettre de prendre une décision éclairée

(Auray-Blais et al., 1989; Lemieux et al., 1989; Auray-Blais et Patenaude, 2006).

Un formulaire de consentement devrait être signé par les parents pour participer à l'étude.

VII.3 Comment évaluer l'excrétion urinaire du rapport Gb₃/créatinine en fonction de différents types de mutations, de l'âge, du sexe et du traitement des patients atteints de la maladie de Fabry?

Le premier objectif qui se posait était de trouver une méthode multiplex pour une analyse urinaire du Gb₃ et de la créatinine. En réponse à ceci, nous avons développé et validé une méthode d'analyse de la créatinine et du Gb₃ total dans l'urine prélevée sur papier filtre, par une seule analyse simultanée par LC-MS/MS. Aussi, la durée totale d'analyse a été écourtée de plus de la moitié par rapport à la méthode précédente, soit 2.6 minutes par échantillon. En comparant la méthodologie de la créatinine utilisée depuis de nombreuses années, soit une technique spectrophotométrique, à celle utilisée par la spectrométrie de masse, nous pouvons conclure qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les deux méthodes d'analyse.

Le développement de cette méthode a permis d'analyser les urines prélevées sur papier filtre de 110 patients atteints de la maladie de Fabry, divisés en deux groupes, soit un groupe pédiatrique de 32 enfants (47% hémizyotes) et 78 adultes (46% hémizyotes). En tout, 41 patients, dont 8 enfants, étaient sous thérapie d'enzyme de remplacement.

L'analyse du Gb₃/créatinine de tous ces patients nous a permis d'atteindre des conclusions intéressantes. L'étude de 4 variables indépendantes, telles les types de mutations, le sexe, le traitement et l'âge des patients face à la variable dépendante du niveau d'excrétion du rapport urinaire Gb₃ /créatinine a montré: 1) qu'il existe une corrélation entre le niveau d'excrétion urinaire du Gb₃/créatinine et le type de mutations étudiées, c'est-à-dire les mutations faux-sens, non-sens, du décalage du cadre de lecture et de jonction d'épissage et ce, avec une valeur $p = 0.0006$ pour un niveau de confiance de 99%; 2) qu'il existe une corrélation entre le niveau d'excrétion urinaire du Gb₃/créatinine et le sexe des patients, avec une valeur $p < 0.0001$ pour le même niveau de confiance; 3) qu'il existe une corrélation entre le niveau d'excrétion urinaire du Gb₃/créatinine et le traitement des patients, avec une valeur $p = 0.0005$ pour le même niveau de confiance; 4) qu'il n'existe pas de corrélation entre le niveau d'excrétion urinaire du Gb₃/créatinine et l'âge des patients, avec une valeur $p = 0.1961$.

Nous avons également pu observer une grande variabilité entre les niveaux d'excrétion de Gb₃ et certaines mutations non-sens. Cette variabilité a été retrouvée chez une fillette de 11 ans avec la mutation R220X qui excréta du Gb₃/créatinine à 14.7 µg/m mole de créatinine (donc à l'intérieur des limites de la normale) et chez un hémizygote de 43 ans avec la mutation Q386X située sur le 7^e exon du gène *GLA*, qui excréta du Gb₃/créatinine à 54 092 µg/m mole de créatinine.

Nous avons aussi noté une grande différence d'excrétion du Gb₃ chez des patients qui ont la même mutation. Ceci s'explique probablement par une activité enzymatique résiduelle différente chez ces patients.

Sept personnes d'une même famille, 2 hétérozygotes et 5 hémizygotés dont l'âge varie entre 8 ans et 20 ans et qui ont la mutation faux-sens D136Y ont été évaluées. De ceux-ci, 5 étaient sous thérapie enzymatique de remplacement (soit 1 femelle et 4 mâles). Leur niveau d'excrétion urinaire du Gb₃/créatinine est présenté au Tableau VII.1 suivant.

Tableau VII.1 Personnes d'une même famille ayant la mutation faux-sens D136Y du gène *GLA* pour la maladie de Fabry.

Age	Sexe	Traité	Non traité	Gb ₃ /créatinine (µg/mmole créat.)
8	F		X	27.1
12	M		X	268.3
15	F	X		59.4
16	M	X		184.5
17	M	X		261.5
18	M	X		205.3
20	M	X		194.6

Le niveau d'excrétion de la fillette de 8 ans (27.1 µg/mmole créat.) est juste au-dessus de la limite supérieure de la normale des contrôles, qui est à 25 µg/mmole créat. Par contre, le garçon hémizygoté de 12 ans qui est non traité présente une augmentation qui est plus de 10 fois supérieure à la normale, à 268.3 µg/mmole créat. En ce qui concerne les patients sous traitement, sauf la femelle hétérozygote, tous les hémizygotés ont des niveaux d'excrétion passablement similaires.

Un autre cas intéressant mais non inclus dans le groupe pédiatrique est celui d'un jeune garçon de 7 ans ayant la mutation D313Y. La famille a signé un

formulaire de consentement et a accepté que l'on procède à l'analyse du Gb₃ sur l'urine du papier filtre qui avait été prélevée sept ans auparavant, à 21 jours de vie, dans le cadre du Programme de dépistage urinaire de maladies métaboliques héréditaires (Auray-Blais et al., 2003). Nous avons trouvé du Gb₃ à 115.4 ug/m mole créat., soit près de 5 fois la valeur normale chez les enfants. Nos résultats corroborent les études publiées antérieurement qui parvenaient aux mêmes conclusions (Philippart et al., 1969; Tsutsumi et al., 1984; Vedder et al., 2006). Nous poursuivrons l'investigation de cet enfant et des membres de la famille.

VII. 4 Pourquoi évaluer les enjeux éthiques et élaborer un modèle pour gérer les biobanques dans la recherche en génétique en institution?

Nous retrouvons un nombre croissant de projets de recherche impliquant des biobanques partout à travers le monde (OECD, 2006). Il existe une problématique majeure pour les comités d'éthique, soit celle d'assurer la gestion de ces informations génétiques et des prélèvements biologiques qui touchent non seulement l'individu mais aussi sa famille, afin d'assurer la protection de l'intégrité des sujets qui participent à la recherche et qui acceptent de donner leurs prélèvements biologiques pour constituer une biobanque.

Un exemple concret de cette problématique est retrouvé dans la situation mentionnée au point VII.3: nous avons un prélèvement d'urine qui nous a été expédié par les parents à 21 jours de vie dans le cadre du Programme de dépistage urinaire (un service de médecine génétique préventive offert à la population des nouveau-nés du Québec) pour que nous puissions analyser des acides aminés et des

acides organiques urinaires. Nous avons donc une base de données et de spécimens d'urine qui sont codés par un numéro de formulaire spécifique à chaque bébé. Nous sommes les détenteurs de la clé des codes qui mènent à des données nominalisées, ce qui est essentiel pour que nous puissions contacter les parents lorsque nous dépistons un enfant avec une maladie métabolique héréditaire. La gestion de la base de données est effectuée par une personne indépendante (dans le cas particulier et unique du Programme de dépistage urinaire, un informaticien), qui assure la confidentialité des bases de données par des codes d'accès et des mots de passe.

Parallèlement, nous avons un projet de recherche sur l'étude du Gb₃ urinaire chez des patients atteints de la maladie de Fabry. Nous apprenons par le médecin généticien traitant qu'un enfant masculin de 7 ans est possiblement atteint de la maladie de Fabry. Il serait intéressant de pouvoir analyser le prélèvement d'urine à 21 jours de vie, conservé à -20°C, afin de vérifier le niveau d'excrétion du Gb₃. Dans le cadre de ce projet de recherche qui a été soumis au Comité d'éthique de la recherche sur l'humain, nous avons élaboré un formulaire de consentement qui s'adresse aux parents et aux enfants atteints de maladies de surcharge, telle la maladie de Fabry. Afin d'assurer la protection de l'intégrité de l'enfant et la confidentialité de ses renseignements personnels, le médecin-généticien traitant de l'enfant a communiqué avec ses parents. Des explications leur ont été fournies sur les points suivants : le but, la nature et la durée du projet de recherche, la méthode utilisée, les tests faits, le lieu et la conservation des données et des échantillons, les mesures de confidentialité instaurées, les inconvénients de même que les risques et les bénéfices, les limites du projet, le droit de retrait, le droit de refuser de participer ou de recevoir les résultats, et finalement, s'ils acceptaient que nous puissions

utiliser le papier filtre d'urine pour procéder à l'analyse du Gb₃. Les parents ayant donné leur accord, l'informaticien a recherché dans la banque de données, selon les renseignements fournis par le médecin-traitant, le numéro de formulaire et la date de l'analyse à 21 jours, ce qui nous a permis de retrouver le prélèvement et de procéder à l'analyse.

Parallèlement, nous avons élaboré un modèle similaire simple et efficient pour l'ensemble des projets de recherche institutionnels impliquant des biobanques soumis au CÉR, où une personne indépendante, soit une archiviste médicale, relevant de la direction des services professionnels du centre hospitalier, devient la gestionnaire des codes des spécimens et des données qui s'y rattachent. Ce modèle est donc intégré à l'intérieur de l'infrastructure de l'institution et vise la protection des sujets participants. Le double-codage utilisé, où les codes sont non reliés et où l'investigateur principal n'a pas la clé du 2^e code, vise à assurer un niveau élevé de confidentialité et la sécurité des données de la biobanque pour le sujet participant. Le modèle proposé institue un mécanisme de transmission d'information dans le cas où l'organisme subventionnaire qui exécute la recherche avec les biobanques trouve un renseignement d'utilité clinique majeure pour le sujet participant. Selon notre modèle, l'organisme subventionnaire peut communiquer directement avec l'investigateur principal, qui transmet l'information à son tour au CÉR. En dernier lieu, le CÉR doit établir la pertinence de donner cette information aux sujets participants, en assurant un processus de communication transparente des renseignements transmis, de même qu'un encadrement adéquat pour lesdits sujets.

Finalement, la source de financement pour assurer ce modèle de gestion des biobanques provient directement des compagnies pharmaceutiques ou autres organismes qui sont eux-mêmes à l'origine de la création des biobanques.

VII.5 Comment élaborer un processus efficace et cohérent afin d'assurer une participation informée des sujets qui participent à un projet de recherche?

L'obtention d'une participation informée et la protection de l'intégrité du sujet participant à un projet de recherche avec des biobanques s'avèrent d'une importance capitale. En effet, le sujet peut investir beaucoup de temps et d'énergie dans la participation altruiste à un projet de recherche. Il est impératif que tout soit mis en œuvre pour garantir la protection et le respect de la confidentialité ainsi que la protection des renseignements personnels qui le concernent, en particulier en ce qui a trait aux biobanques. Considérant que la création de biobanques pour la recherche en génétique est devenue monnaie courante, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, le processus de fonctionnement qui est représenté à la Figure VII.1 vise: 1) à assurer que l'investigateur principal évalue la compétence des connaissances de son personnel au niveau des biobanques; 2) à ce que les objectifs de formation continue sur les biobanques pour tous les intervenants (personnel de recherche et membres du CÉR) soient atteints, tout le processus étant chapeauté par l'institution qui en assure le financement; et 3) à impliquer la population pour qu'elle soit bien informée et ce, par l'investigateur principal et par le CÉR qui doivent travailler dans un partenariat convivial, ce qui exige un processus de communication continu entre eux. De plus, le support financier pour assurer ladite

formation continue provient de ceux qui demandent la création des biobanques, soit les compagnies pharmaceutiques, soit d'autres organismes subventionnaires.

Ce processus devrait faire partie de bonnes pratiques éthiques de recherche, ce qui nécessite de « revenir aux principes de base », c'est-à-dire, d'assurer une formation continue sur le sujet des biobanques auprès du personnel de recherche et des membres du CÉR afin de garantir la participation informée du sujet participant.

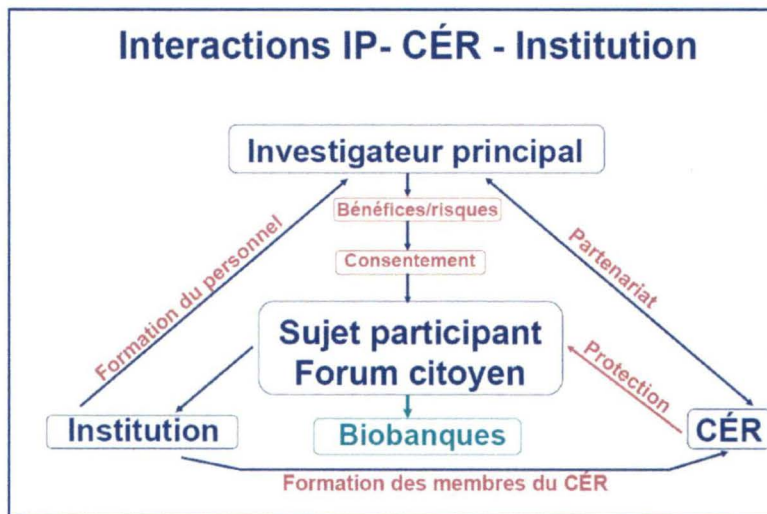


Figure VII.1 Modèle interactionnel des différents intervenants impliqués dans la recherche en génétique utilisant des biobanques.

Chapitre VIII - Conclusion

Nous avons tout au long de ce travail de recherche tenté de poursuivre un cheminement débuté il y a plusieurs années, soit mieux comprendre les particularités de certaines maladies métaboliques héréditaires reliées aux micromolécules pour aider les patients qui en sont atteints. La même philosophie peut dès lors s'appliquer pour mieux comprendre la pathophysiologie de maladies reliées aux macromolécules, et en particulier, la maladie de Fabry. La poursuite de nos travaux de recherche nous a permis de constater l'immense travail qui reste à accomplir pour expliquer la très grande variabilité du phénotype clinique, tant chez les hémizygotés que chez les hétérozygotés atteints de cette maladie.

Nous avons développé une méthodologie simple, rapide et efficace pour l'analyse d'un biomarqueur excrété de façon prédominante chez les patients atteints de la maladie de Fabry, le Gb₃ urinaire et ce, simultanément avec l'analyse de la créatinine par LC-MS/MS. Nous avons innové en utilisant des urines de patients et de contrôles qui ont été prélevées sur papier filtre. Ceci a permis d'éliminer plusieurs étapes laborieuses en termes de temps et de travail technique, de faciliter le transport et l'entreposage des échantillons, et de diminuer le coût de l'envoi postal de ces échantillons. Cette méthodologie offre des possibilités cliniques intéressantes pour les laboratoires de dépistage à haut risque de même que pour le suivi et le monitoring des patients sous thérapie enzymatique de remplacement. Suite à l'obtention d'un consentement libre et éclairé de la part des parents, l'applicabilité de cette méthodologie sera possible dans le cadre d'une étude de

faisabilité pour l'analyse urinaire d'une population de nouveau-nés, afin, entre autres, de déterminer l'incidence de la maladie de Fabry au Québec.

Cette méthodologie par spectrométrie de masse en tandem nous a ensuite permis d'évaluer des corrélations entre le niveau d'excrétion urinaire du Gb₃/créatinine et différents types de mutations chez des adultes et des enfants atteints de la maladie de Fabry. Aussi, nous avons examiné la corrélation entre le niveau de Gb₃ et l'âge des patients, le sexe et le traitement par la thérapie d'enzyme de remplacement. Nous avons trouvé une corrélation hautement significative entre les 4 types de mutations étudiés et l'excrétion urinaire du Gb₃/créatinine. De même, nous avons trouvé qu'il existait une corrélation entre le traitement et l'excrétion urinaire du Gb₃/créatinine. La même corrélation s'applique pour le sexe des patients. Par contre, aucune corrélation n'a été retrouvée au niveau de l'âge des patients et de l'excrétion du Gb₃.

Cette étude a ultimement permis de mieux comprendre certains aspects biochimiques de la maladie de Fabry en relation avec 4 types de mutations retrouvées chez les patients. Une étude statistique (analyse de variance) nous a permis de constater qu'il n'existait pas de différence significative entre 30 patients qui avaient la même mutation faux-sens provenant d'un groupe de patients de la Nouvelle-Écosse et tous les autres patients provenant de plusieurs endroits à travers le monde avec plusieurs autres mutations faux-sens.

En conclusion, les perspectives d'analyses sont intéressantes avec la fine pointe de la technologie retrouvée avec la spectrométrie de masse en tandem. Par contre, beaucoup reste à faire pour mieux comprendre la sévérité des manifestations cardiaques chez les patients atteints de la maladie de Fabry. Le Gb₃ et d'autres

biomarqueurs sanguins, cette fois, pourraient faire partie de perspectives d'étude à court terme.

Quant à la composante éthique, le fait de travailler nous-mêmes avec des biobanques nous a incitées à proposer un modèle de gestion des biobanques dans la recherche biomédicale institutionnelle. Considérant que la problématique des biobanques a souvent représenté un frein à la recherche scientifique, nous croyons que ce modèle, visant à protéger l'intégrité du sujet participant et à assurer la protection de la confidentialité des données génétiques, peut être implanté dans tous les établissements soucieux d'instaurer de bonnes pratiques d'éthique de la recherche.

Enfin, et dans un même ordre d'idées, il faut revenir aux principes de base et assurer la formation du personnel de recherche et des membres des Comités d'éthique afin d'assurer une participation informée des sujets participant à des projets impliquant des biobanques. Aussi, un processus de communication dynamique doit exister entre les CÉR et l'investigateur principal pour assurer une cohésion de tout le processus.

Références

1. Altarescu GM, Goldfarb LG, Park KY, Kaneski C, Jeffries N, Litvak S, Nagle JW, Schiffmann R. Identification of fifteen novel mutations and genotype-phenotype relationship in Fabry disease. *Clin Genet* 60:46-51 (2001).
2. Anderlik M. Commercial biobanks and genetic research: ethical and legal issues. *Am J Pharmacogenomics* 3:203-215 (2003).
3. ASHG The American Society of Human Genetics. ASHG report: Statement on informed consent for genetic research. In: *Am J Hum Genet*, pp 471-474 (1996).
4. Ashton-Prolla P, Ashley GA, Giugliani R, Pires RF, Desnick RJ, Eng CM. Fabry disease: comparison of enzymatic, linkage, and mutation analysis for carrier detection in a family with a novel mutation (30delG). *Am J Med Genet* 84:420-424 (1999).
5. Ashton-Prolla P, Tong B, Shabbeer J, Astrin KH, Eng CM, Desnick RJ. Fabry disease: twenty-two novel mutations in the alpha-galactosidase A gene and genotype/phenotype correlations in severely and mildly affected hemizygotes and heterozygotes. *J Investig Med* 48:227-235 (2000).
6. Auray-Blais C, Cyr D, Mills K, Giguere R, Drouin R. Development of a filter paper method potentially applicable to mass and high-risk urinary screenings for Fabry disease. *J Inherit Metab Dis* 30:106 (2007).

7. Auray-Blais C, Giguere R, Draper P, Shapcott D, Lemieux B. Simple and rapid system for screening and identification of reducing sugars in urine. *Clin Biochem* 11:235-237 (1978).
8. Auray-Blais C, Giguère R, Girard JG, Lemieux B. Le Programme de dépistage urinaire des nouveau-nés du Québec et la collaboration des parents. In: *Diagnostic et dépistage génétiques. Aspects cliniques, juridiques, éthiques et sociaux*. p. 43, Les Presses de l'Université Laval (1999).
9. Auray-Blais C, Giguere R, Lemieux B. Thin-layer chromatography of urinary homovanillic acid and vanillylmandelic acid for large-scale neuroblastoma mass screening. *Med Pediatr Oncol* 17:364-367 (1989).
10. Auray-Blais C, Giguere R, Lemieux B. Newborn urine screening programme in the province of Quebec: an update of 30 years' experience. *J Inherit Metab Dis* 26:393-402 (2003).
11. Auray-Blais C, Giguere R, Paradis D, Lemieux B. Rapid thin-layer chromatographic method for the detection of urinary methylmalonic acid. *Clin Biochem* 12:43-45 (1979).
12. Auray-Blais C, Patenaude J. A biobank management model applicable to biomedical research. *BMC Med Ethics* 7:E4 (2006).
13. Azcona C, Clarke JTR, Stockley T. Fabry disease: genotype-phenotype studies; epidemiology; screening and management. *Acta Paediatr Suppl* 96:93-97 (2007).
14. Banikazemi M, Bultas J, Waldek S, Wilcox WR, Whitley CB, McDonald M, Finkel R, Packman S, Bichet DG, Warnock DG, Desnick RJ.

- Agalsidase-beta therapy for advanced Fabry disease: a randomized trial. *Ann Intern Med* 146:77-86 (2007).
15. Bernstein HS, Bishop DF, Astrin KH, Kornreich R, Eng CM, Sakuraba H, Desnick RJ. Fabry disease: six gene rearrangements and an exonic point mutation in the alpha-galactosidase gene. *J Clin Invest* 83:1390-1399 (1989).
 16. Boscaro F, Pieraccini G, la Marca G, Bartolucci G, Luceri C, Luceri F, Moneti G. Rapid quantitation of globotriaosylceramide in human plasma and urine: a potential application for monitoring enzyme replacement therapy in Anderson-Fabry disease. *Rapid Commun Mass Spectrom* 16:1507-1514 (2002).
 17. Brady RO, Schiffmann R. Enzyme-replacement therapy for metabolic storage disorders. *Lancet Neurol* 3:752-756 (2004).
 18. Branton MH, Schiffmann R, Sabnis SG, Murray GJ, Quirk JM, Altarescu G, Goldfarb L, Brady RO, Balow JE, Austin Iii HA, Kopp JB. Natural history of Fabry renal disease: influence of alpha-galactosidase A activity and genetic mutations on clinical course. *Medicine (Baltimore)* 81:122-138 (2002).
 19. Cambon-Thomsen A. The social and ethical issues of post-genomic human biobanks. *Nat Rev Genet* 5:866-873 (2004).
 20. Carducci C, Santagata S, Leuzzi V, Artiola C, Giovannello T, Battini R, Antonozzi I. Quantitative determination of guanidinoacetate and creatine in dried blood spot by flow injection analysis-electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 364:180-187 (2006).

21. Cariolou MA, Christodoulides M, Manoli P, Kokkofitou A, Tsambaos D. Novel trinucleotide deletion in Fabry's disease. *Hum Genet* 97:468-470 (1996).
22. Carpenter KH, Wiley V. Application of tandem mass spectrometry to biochemical genetics and newborn screening. *Clin Chim Acta* 322:1-10 (2002).
23. Chace DH. Mass spectrometry in the clinical laboratory. *Chem Rev* 101:445-477 (2001).
24. Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin Chem* 49:1797-1817 (2003).
25. Chamberlin BA, Sweeley CC. Metabolic profiles of urinary organic acids recovered from absorbent filter paper. *Clin Chem* 33:572-576 (1987).
26. Chasson AL, Grady HJ, Stanley MA. Determination of creatinine by means of automatic chemical analysis. *Tech Bull Regist Med Technol* 30:207-212 (1960).
27. Clarke JTR. Narrative review: Fabry disease. *Ann Intern Med* 146:425-433 (2007).
28. Clements P. Mass spectrometry as a platform for the diagnosis of lysosomal disorders. *Clin Chem* 50:1723-1724 (2004).
29. Cox TM. Biomarkers in lysosomal storage diseases: a review. *Acta Paediatr Suppl* 94:39-42; discussion 37-38 (2005).

30. Cox TM. Biomarkers in lysosomal storage diseases. In: *Fabry disease. Perspectives from 5 years of FOS* (Atul Mehta, Michael Beck, Sunder-Plassmann, G. eds), pp 423, Oxford Pharmagenesis Ltd, Oxford (2006).
31. Cunico R, Gooding K, Wehr T. *Basic HPLC and CE of biomolecules*. Bay Bioanalytical Laboratory, Inc., Richmond, CA (1998).
32. Cyr D, Giguere R, Tuchman M, Lemieux B. Stability of urinary HVA and VMA on filter paper. *Early Hum Dev* 49:149-152 (1997).
33. de Duve C. From cystases to lysosomes. *Fed. Proc.* 23:1045 (1964).
34. de Duve C. The lysosome turns fifty. *Med Sci (Paris)* 21:12-15 (2005).
35. de Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmans F. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J* 60:604-617 (1955).
36. de Hoffmann E, Stroobant V. *Mass spectrometry. Principles and applications*. Wiley and Sons Inc., New York (2003).
37. Deegan PB, Baehner AF, Barba Romero MA, Hughes DA, Kampmann C, Beck M. Natural history of Fabry disease in females in the Fabry Outcome Survey. *J Med Genet* 43:347-352 (2006).
38. Desnick RJ, Brady R, Barranger J, Collins AJ, Germain DP, Goldman M, Grabowski G, Packman S, Wilcox WR. Fabry disease, an under-recognized multisystemic disorder: expert recommendations for diagnosis, management, and enzyme replacement therapy. *Ann Intern Med* 138:338-346 (2003).

39. Desnick RJ, Dawson G, Desnick SJ, Sweeley CC, Krivit W. Diagnosis of glycosphingolipidoses by urinary-sediment analysis. *N Engl J Med* 284:739-744 (1971).
40. Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM. Alpha-galactosidase A deficiency: Fabry disease. In: *The metabolic and molecular basis of inherited disease* (Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. eds), p. 3733-3774, McGraw-Hill, New York (2001).
41. Elleder M, Bradova V, Smid F, Budesinsky M, Harzer K, Kustermann-Kuhn B, Ledvinova J, Belohlavek K, Kral V, Dorazilova V. Cardiocyte storage and hypertrophy as a sole manifestation of Fabry's disease. Report on a case simulating hypertrophic non-obstructive cardiomyopathy. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 417:449-455 (1990).
42. Eng CM, Guffon N, Wilcox WR, Germain DP, Lee P, Waldek S, Caplan L, Linthorst GE, Desnick RJ. Safety and efficacy of recombinant human alpha-galactosidase A-replacement therapy in Fabry's disease. *N Engl J Med* 345:9-16 (2001).
43. Eng CM, Niehaus DJ, Enriquez AL, Burgert TS, Ludman MD, Desnick RJ. Fabry disease: twenty-three mutations including sense and antisense CpG alterations and identification of a deletional hot-spot in the alpha-galactosidase A gene. *Hum Mol Genet* 3:1795-1799 (1994).
44. Eng CM, Resnick-Silverman LA, Niehaus DJ, Astrin KH, Desnick RJ. Nature and frequency of mutations in the alpha-galactosidase A gene that cause Fabry disease. *Am J Hum Genet* 53:1186-1197 (1993).

45. Fabry H. An historical overview of Fabry disease. *J Inherit Metab Dis* 24 Suppl 2:3-7 (2001).
46. Fauler G, Rechberger GN, Devrnja D, Erwa W, Plecko B, Kotanko P, Breunig F, Paschke E. Rapid determination of urinary globotriaosylceramide isoform profiles by electrospray ionization mass spectrometry using stearoyl-d35-globotriaosylceramide as internal standard. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19:1499-1506 (2005).
47. Fuller M, Meikle PJ, Hopwood JJ. Epidemiology of lysosomal storage diseases: an overview. In: *Fabry disease. Perspectives from 5 years of FOS* (Atul Mehta, Michael Beck, Sunder-Plassmann, G. eds), pp 423, Oxford PharmaGenesis Ltd. (2006).
48. Fuller M, Sharp PC, Rozaklis T, Whitfield PD, Blacklock D, Hopwood JJ, Meikle PJ. Urinary lipid profiling for the identification of Fabry hemizygotes and heterozygotes. *Clin Chem* 51:688-694 (2005).
49. Futerman AH, van Meer G. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:554-565 (2004).
50. Garman SC, Garboczi DN. The molecular defect leading to Fabry disease: structure of human alpha-galactosidase. *J Mol Biol* 337:319-335 (2004).
51. Germain DP. Fabry disease: recent advances in enzyme replacement therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 11:1467-1476 (2002).
52. Germain DP. Clinical development of agalsidase-beta for the treatment of Fabry disease. *Med Sci* 21:57-61 (2005a).
53. Germain DP. Enzyme replacement therapies for lysosomal storage disorders. *Med Sci* 21:77-83 (2005b).

54. Germain DP. Fabry disease : from the discovery of lysosomes to enzyme replacement therapy. *Med Sci* 21:5-7 (2005c).
55. Germain DP, Shabbeer J, Cotigny S, Desnick RJ. Fabry disease: twenty novel alpha-galactosidase A mutations and genotype-phenotype correlations in classical and variant phenotypes. *Mol Med* 8:306-312 (2002).
56. Germain DP, Waldek S, Banikazemi M, Bushinsky DA, Charrow J, Desnick RJ, Lee P, Loew T, Vedder AC, Abichandani R, Wilcox WR, Guffon N. Sustained, long-term renal stabilization after 54 months of agalsidase Beta therapy in patients with fabry disease. *J Am Soc Nephrol* 18:1547-1557 (2007).
57. German National Ethics Council, Opinion on biobanks for research. *E-mail: Kontakt@ethikrat.org, web site: www.ethikrat.org*, (2004).
58. Guffon N. Clinical presentation in female patients with Fabry disease. *J Med Genet* 40:e38 (2003).
59. Gupta S, Ries M, Kotsopoulos S, Schiffmann R. The relationship of vascular glycolipid storage to clinical manifestations of Fabry disease: a cross-sectional study of a large cohort of clinically affected heterozygous women. *Medicine (Baltimore)* 84:261-268 (2005).
60. Guthrie R, Susi AA. Simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 32:338-343 (1963).
61. Hager D, Dovichi N, Klassen J, Kebarle P. Droplet electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* 66:3944-3949 (1994).

62. Heare T, Alp NJ, Priestman DA, Kulkarni AB, Qasba P, Butters TD, Dwek RA, Clarke K, Channon KM, Platt FM. Severe endothelial dysfunction in the aorta of a mouse model of Fabry disease; partial prevention by N-butyldeoxynojirimycin treatment. *J Inherit Metab Dis* 30:79-87 (2007).
63. Hers HG alpha-Glucosidase deficiency in generalized glycogen storage disease (Pompe's disease). *Biochem J* 86:11-16 (1963).
64. Hoeyer K, Olofsson BO, Mjorndal T, Lynoe N. Informed consent and biobanks: a population-based study of attitudes towards tissue donation for genetic research. *Scand J Public Health* 32:224-229 (2004).
65. Joly Y, Knoppers BM, Nguyen MT. Stored tissue samples: through the confidentiality maze. *Pharmacogenomics J* 5:2-5 (2005).
66. Jones PM, Bennett MJ. The changing face of newborn screening: diagnosis of inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 324:121-128 (2002).
67. Kebarle P. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 35:804-817 (2000).
68. Keevil BG, Tierney DP, Cooper DP, Morris MR, Machaal A, Yonan N. Simultaneous and rapid analysis of cyclosporin A and creatinine in finger prick blood samples using liquid chromatography tandem mass spectrometry and its application in C2 monitoring. *Ther Drug Monit* 24:757-767 (2002).
69. Kinter M, Sherman N. *Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry*. Wiley Interscience, New York, pp 301 (2000).

70. Kitagawa T, Ishige N, Suzuki K, Owada M, Ohashi T, Kobayashi M, Eto Y, Tanaka A, Mills K, Winchester B, Keutzer J. Non-invasive screening method for Fabry disease by measuring globotriaosylceramide in whole urine samples using tandem mass spectrometry. *Mol Genet Metab* 85:196-202 (2005).
71. Kloepfer A, Quintana JB, Reemtsma T. Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples. *J Chromatogr A* 1067:153-160 (2005).
72. Larger PJ, Breda M, Fraier D, Hughes H, James CA. Ion-suppression effects in liquid chromatography-tandem mass spectrometry due to a formulation agent, a case study in drug discovery bioanalysis. *J Pharm Biomed Anal* 39:206-216 (2005).
73. Lee K, Jin X, Zhang K, Copertino L, Andrews L, Baker-Malcolm J, Geagan L, Qiu H, Seiger K, Barngrover D, McPherson JM, Edmunds T. A biochemical and pharmacological comparison of enzyme replacement therapies for the glycolipid storage disorder Fabry disease. *Glycobiology* 13:305-313 (2003).
74. Lemieux B, Auray-Blais C, Giguere R, Scriver CR. Neuroblastoma screening: the Canadian experience. *Med Pediatr Oncol* 17:379-381 (1989).
75. Lemieux B, Auray-Blais C, Giguere R, Shapcott D. Prolidase deficiency: detection of cases by a newborn urinary screening programme. *J Inherit Metab Dis* 7 Suppl 2:145-146 (1984).

76. Lemieux B, Auray-Blais C, Giguere R, Shapcott D, Scriver CR. Newborn urine screening experience with over one million infants in the Quebec Network of Genetic Medicine. *J Inherit Metab Dis* 11:45-55 (1988).
77. Lesser AJ. Phenylketonuria and the Guthrie Test. *Pediatrics* 32:940 (1963).
78. Linthorst GE, Vedder AC, Aerts JM, Hollak CE. Screening for Fabry disease using whole blood spots fails to identify one-third of female carriers. *Clin Chim Acta* 353:201-203 (2005).
79. Luciano CA, Russell JW, Banerjee TK, Quirk JM, Scott LJ, Dambrosia JM, Barton NW, Schiffmann R. Physiological characterization of neuropathy in Fabry's disease. *Muscle Nerve* 26:622-629 (2002).
80. Lyon MF. X-chromosome inactivation and human genetic disease. *Acta Paediatr Suppl* 91:107-112 (2002).
81. Marguery MC, Giordano F, Parant M, Samalens G, Levade T, Salvayre R, Maret A, Calvas P, Bourrouillou G, Cantala P, et al. Fabry's disease: heterozygous form of different expression in two monozygous twin sisters. *Dermatology* 187:9-15 (1993).
82. Masson C, Cisse I, Simon V, Insalaco P, Audran M. Fabry disease: a review. *Joint Bone Spine* 71:381-383 (2004).
83. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations. *Anal Chem* 70:882-889 (1998).
84. Mehta A, Ricci R, Widmer U, Dehout F, Garcia de Lorenzo A, Kampmann C, Linhart A, Sunder-Plassmann G, Ries M, Beck M. Fabry disease defined:

- baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey. *Eur J Clin Invest* 34:236-242 (2004).
85. Mehta A, Widmer U. Natural history of Fabry disease. In: *Fabry disease. Perspectives from 5 years of FOS* (Atul Mehta, Michael Beck et Sunder-Plassmann, G. eds), pp 423, Oxford PharmaGenesis Ltd. (2006).
86. Meikle PJ, Fietz MJ, Hopwood JJ. Diagnosis of lysosomal storage disorders: current techniques and future directions. *Expert Rev Mol Diagn* 4:677-691 (2004a).
87. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *Jama* 281:249-254 (1999).
88. Meikle PJ, Ranieri E, Simonsen H, Rozaklis T, Ramsay SL, Whitfield PD, Fuller M, Christensen E, Skovby F, Hopwood JJ. Newborn screening for lysosomal storage disorders: clinical evaluation of a two-tier strategy. *Pediatrics* 114:909-916 (2004b).
89. Mills K, Eaton S, Ledger V, Young E, Winchester B. The synthesis of internal standards for the quantitative determination of sphingolipids by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19:1739-1748 (2005a).
90. Mills K, Johnson A, Winchester B. Synthesis of novel internal standards for the quantitative determination of plasma ceramide trihexoside in Fabry disease by tandem mass spectrometry. *FEBS Lett* 515:171-176 (2002).
91. Mills K, Morris P, Lee P, Vellodi A, Waldek S, Young E, Winchester B. Measurement of urinary CDH and CTH by tandem mass spectrometry in

- patients hemizygous and heterozygous for Fabry disease. *J Inherit Metab Dis* 28:35-48 (2005b).
92. Mills K, Vellodi A, Morris P, Cooper D, Morris M, Young E, Winchester B. Monitoring the clinical and biochemical response to enzyme replacement therapy in three children with Fabry disease. *Eur J Pediatr* 163:595-603 (2004).
93. Moore DF, Altarescu G, Ling GS, Jeffries N, Frei KP, Weibel T, Charria-Ortiz G, Ferri R, Arai AE, Brady RO, Schiffmann R. Elevated cerebral blood flow velocities in Fabry disease with reversal after enzyme replacement. *Stroke* 33:525-531 (2002a).
94. Moore DF, Altarescu G, Pursley R, Campia U, Panza JA, Dimitriadis E, Schiffmann R. Arterial wall properties and Womersley flow in Fabry disease. *BMC Cardiovasc Disord* 2:1 (2002b).
95. Morrone A, Cavicchi C, Bardelli T, Antuzzi D, Parini R, Di Rocco M, Feriozzi S, Gabrielli O, Barone R, Pistone G, Spisni C, Ricci R, Zammarchi E. Fabry disease: molecular studies in Italian patients and X inactivation analysis in manifesting carriers. *J Med Genet* 40:e103 (2003).
96. Moutel G, De Montgolfier S, Duchange N, Sharara L, Beaumont C, Herve C. Study of the involvement of research ethics committees in the constitution and use of biobanks in France. *Pharmacogenetics* 14:195-198 (2004).
97. Murray GJ, Anver MR, Kennedy MA, Quirk JM, Schiffmann R. Cellular and tissue distribution of intravenously administered agalsidase alfa. *Mol Genet Metab* 90:307-312 (2007).

98. Nakao S, Kodama C, Takenaka T, Tanaka A, Yasumoto Y, Yoshida A, Kanzaki T, Enriquez AL, Eng CM, Tanaka H, Tei C, Desnick RJ. Fabry disease: detection of undiagnosed hemodialysis patients and identification of a "renal variant" phenotype. *Kidney Int* 64:801-807 (2003).
99. OECD Creation and Governance of Human Genetic Research Databases, OECD Publishing, Available at www.oecd.org/dataoecd/61/49/37647362.pdf (2006).
100. Okumiya T, Ishii S, Kase R, Kamei S, Sakuraba H, Suzuki Y. Alpha-galactosidase gene mutations in Fabry disease: heterogeneous expressions of mutant enzyme proteins. *Hum Genet* 95:557-561 (1995).
101. Owen LJ, Wear JE, Keevil BG. Validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for serum creatinine and comparison with enzymatic and Jaffe methods. *Ann Clin Biochem* 43:118-123 (2006).
102. Pastores GM, Lien YH. Biochemical and molecular genetic basis of Fabry disease. *J Am Soc Nephrol* 13 Suppl 2:S130-133 (2002).
103. Patenaude J, de Champlain J. La recherche impliquant la création d'une biobanque publique de données génétiques de type populationnel: problèmes rencontrés chez des comités d'éthique de la recherche au Canada. *L'Observatoire de la génétique, Juin*, http://www.ircm.qc.ca/bioethique/obsgenetique/cadrages/cadr2004/c_no17_04/c_no17_04_03.html (2004).
104. Philippart M, Sarlieve L, Manacorda A. Urinary glycolipids in Fabry's disease. Their examination in the detection of atypical variants and the pre-symptomatic state. *Pediatrics* 43:201-206 (1969).

105. Pitt JJ, Eggington M, Kahler SG. Comprehensive screening of urine samples for inborn errors of metabolism by electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 48:1970-1980 (2002).
106. Platt F, Walkley S. Lysosomal defects and storage. In: *Lysosomal disorders of the brain, Recent Advances in Molecular and Cellular Pathogenesis and Treatment.*, pp 447, Oxford University Press, New York (2004).
107. Redonnet-Vernhet I, Ploos van Amstel JK, Jansen RP, Wevers RA, Salvayre R, Levade T. Uneven X inactivation in a female monozygotic twin pair with Fabry disease and discordant expression of a novel mutation in the alpha-galactosidase A gene. *J Med Genet* 33:682-688 (1996).
108. Réseau de médecine génétique appliquée. Énoncé de principes sur la conduite de la recherche en génétique humaine concernant des populations. Montréal. Québec. In: <http://www.rmga.qc.ca/en/index.htm>, (2003).
109. Ries M, Bettis KE, Choyke P, Kopp JB, Austin HA, 3rd, Brady RO, Schiffmann R. Parapelvic kidney cysts: a distinguishing feature with high prevalence in Fabry disease. *Kidney Int* 66:978-982 (2004).
110. Ries M, Clarke JTR, Whybra C, Timmons M, Robinson C, Schlaggar BL, Pastores G, Lien YH, Kampmann C, Brady RO, Beck M, Schiffmann R. Enzyme-replacement therapy with agalsidase alfa in children with Fabry disease. *Pediatrics* 118:924-932 (2006).
111. Ries M, Gupta S, Moore DF, Sachdev V, Quirk JM, Murray GJ, Rosing DR, Robinson C, Schaefer E, Gal A, Dambrosia JM, Garman SC, Brady RO, Schiffmann R. Pediatric Fabry disease. *Pediatrics* 115:e344-355 (2005).

112. Roddy TP, Nelson BC, Sung CC, Araghi S, Wilkens D, Zhang XK, Thomas JJ, Richards SM. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry quantification of globotriaosylceramide in plasma for long-term monitoring of Fabry patients treated with enzyme replacement therapy. *Clin Chem* 51:237-240 (2005).
113. Rothstein MA. The role of IRBs in research involving commercial biobanks. *J Law Med Ethics* 30:105-108 (2002).
114. Sachs B. On arrested cerebral development, with special reference to its cortical pathology. *J. Nervous Mental Dis.* 1 30:13 (1903).
115. Schaefer E, Mehta A, Gal A Genotype and phenotype in Fabry disease: analysis of the Fabry Outcome Survey. *Acta Paediatr Suppl* 94:87-92; discussion 79 (2005).
116. Schaefer E, Baron K, Widmer U, Deegan P, Neumann HP, Sunder-Plassmann G, Johansson JO, Whybra C, Ries M, Pastores GM, Mehta A, Beck M. Gal A Thirty-four novel mutations of the GLA gene in 121 patients with Fabry disease. *Hum Mutat* 25:412 (2005).
117. Schiffmann R. Enzyme replacement in Fabry disease: the essence is in the kidney. *Ann Intern Med* 146:142-144 (2007).
118. Schiffmann R, Floeter MK, Dambrosia JM, Gupta S, Moore DF, Sharabi Y, Khurana RK, Brady RO. Enzyme replacement therapy improves peripheral nerve and sweat function in Fabry disease. *Muscle Nerve* 28:703-710 (2003).

119. Schiffmann R, Kopp JB, Austin HA, 3rd, Sabnis S, Moore DF, Weibel T, Balow JE, Brady RO. Enzyme replacement therapy in Fabry disease: a randomized controlled trial. *Jama* 285:2743-2749 (2001).
120. Schiffmann R, Rapkiewicz A, Abu-Asab M, Ries M, Askari H, Tsokos M, Quezado M. Pathological findings in a patient with Fabry disease who died after 2.5 years of enzyme replacement. *Virchows Arch* 448:337-343 (2006a).
121. Schiffmann R, Ries M. Fabry's disease-an important risk factor for stroke. *Lancet* 366:1754-1756 (2005).
122. Schiffmann R, Ries M, Timmons M, Flaherty JT, Brady RO. Long-term therapy with agalsidase alfa for Fabry disease: safety and effects on renal function in a home infusion setting. *Nephrol Dial Transplant* 21:345-354 (2006b).
123. Schulze A, Lindner M, Kohlmuller D, Olgemoller K, Mayatepek E, Hoffmann GF. Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications. *Pediatrics* 111:1399-1406 (2003).
124. Shabbeer J, Yasuda M, Benson SD, Desnick RJ. Fabry disease: identification of 50 novel alpha-galactosidase A mutations causing the classic phenotype and three-dimensional structural analysis of 29 missense mutations. *Hum Genomics* 2:297-309 (2006).
125. Shapcott D, Lemieux B, Shapoglu A. A semi-automatic device for multiple sample application to thin-layer chromatography plates. *J Chromatogr* 70:174-178 (1972).

126. Siuzdak G. *Mass spectrometry for biotechnology*. Academic Press, London, pp.161, (1996).
127. Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, Tükel T, Thiagarajan G, Sakuraba H, Ponzzone A, Desnick RJ. High incidence of later-onset Fabry disease revealed by newborn screening. *Am J Hum Genet* 79:31-40 (2006).
128. Stengel C. Account of a singular illness among four siblings in the vicinity of Rorass. *Etr Christiania, I*, 47-352 (1826).
129. Sunder-Plassmann G. Renal manifestations of Fabry disease. In: *Fabry disease. Perspectives from 5 years of FOS* (Atul Mehta, Michael Beck, Sunder-Plassmann, G. eds), pp 423, Oxford PharmaGenesis Ltd. (2006).
130. Sunder-Plassmann G, Födinger M. Diagnosis of Fabry disease: the role of screening and case-finding studies. In: *Fabry disease. Perspectives from 5 years of FOS* (Atul Mehta, Michael Beck, Sunder-Plassmann, G. eds), pp 423, Oxford PharmaGenesis Ltd. (2006).
131. Tay W. Symmetrical changes in the region of the yellow spot in each eye of an infant. *Trans Ophthalmol Soc U.K.* 1 (1881).
132. Thanamayooran S, West ML, Dyack S, Lemoine K, Riddell C, Simms C. A Fabry disease homozygote in the Nova Scotia kindred with a classic hemizygote phenotype. *Acta Paediatr Suppl.* 443:108 (2003).
133. Thurberg BL, Rennke H, Colvin RB, Dikman S, Gordon RE, Collins AB, Desnick RJ, O'Callaghan M. Globotriaosylceramide accumulation in the Fabry kidney is cleared from multiple cell types after enzyme replacement therapy. *Kidney Int* 62:1933-1946 (2002).

134. Trois Conseils. Énoncé de politique des trois Conseils. Éthique de la recherche avec des êtres humains, (1998, mises à jour 2000, 2002).
135. Tse KC, Chan KW, Tin VP, Yip PS, Tang S, Li FK, Ho YW, Lai KN, Chan TM. Clinical features and genetic analysis of a Chinese kindred with Fabry's disease. *Nephrol Dial Transplant* 18:182-186 (2003).
136. Tsutsumi A, Uchida Y, Kanai T, Tsutsumi O, Satoh K, Sakamoto S. Corneal findings in a foetus with Fabry's disease. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 62:923-931 (1984).
137. UNESCO Déclaration internationale sur les données génétiques humaines, (2003).
138. Utsumi K, Mitsunashi F, Asahi K, Sakurazawa M, Arii K, Komaba Y, Katsumata T, Katsura K, Kase R, Katayama Y. Enzyme replacement therapy for Fabry disease: morphologic and histochemical changes in the urinary sediments. *Clin Chim Acta* 360:103-107 (2005).
139. Vedder AC, Linthorst GE, van Breemen MJ, Groener JE, Bemelman FJ, Strijland A, Mannens MM, Aerts JM, Hollak CE. The Dutch Fabry cohort: diversity of clinical manifestations and Gb3 levels. *J Inherit Metab Dis* 30:68-78 (2007).
140. Vedder AC, Strijland A, vd Bergh Weerman MA, Florquin S, Aerts JM, Hollak CE. Manifestations of Fabry disease in placental tissue. *J Inherit Metab Dis* 29:106-111 (2006).
141. Venditti LN, Venditti CP, Berry GT, Kaplan PB, Kaye EM, Glick H, Stanley C. A Newborn screening by tandem mass spectrometry for medium-

- chain Acyl-CoA dehydrogenase deficiency: a cost-effectiveness analysis. *Pediatrics* 112:1005-1015 (2003).
142. Vernez L, Hopfgartner G, Wenk M, Krahenbuhl S. Determination of carnitine and acylcarnitines in urine by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 984:203-213 (2003).
143. von Scheidt W, Eng CM, Fitzmaurice TF, Erdmann E, Hubner G, Olsen EG, Christomanou H, Kandolf R, Bishop DF, Desnick RJ. An atypical variant of Fabry's disease with manifestations confined to the myocardium. *N Engl J Med* 324:395-399 (1991).
144. West M, Dyack S, Riddell C, Lemoine K, Camfield C, Camfield P. A Nova Scotia kindred with Fabry disease. *Acta Paed* 91:439S:116 (2002).
145. Whitfield PD, Calvin J, Hogg S, O'Driscoll E, Halsall D, Burling K, Maguire G, Wright N, Cox TM, Meikle PJ, Deegan PB. Monitoring enzyme replacement therapy in Fabry disease-role of urine globotriaosylceramide. *J Inherit Metab Dis* 28:21-33 (2005).
146. Wilcox WR. Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. *J Pediatr* 144:S3-14 (2004).
147. Wilson J, Jungner F. Principles and practice of screening for disease. Screening criteria, Public Health Papers, no.34, Geneva World Health Organization, (1968).
148. Winchester B, Young E. Biochemical and genetic diagnosis of Fabry disease. In: *Fabry disease. Perspectives from 5 years of FOS* (Atul Mehta,

- Michael Beck, Sunder-Plassmann., G. eds), pp 423, Oxford Pharmagenesis Ltd, Oxford (2006).
149. Winchester BG. Lysosomal membrane proteins. *Eur J Paediatr Neurol* 5 Suppl A:11-19 (2001).
 150. Wolf LE, Lo B. Untapped potential: IRB guidance for the ethical research use of stored biological materials. *IRB* 26:1-8 (2004).
 151. Wraith JE. The clinical presentation of lysosomal storage disorders. *Acta Neurol Taiwan* 13:101-106 (2004).
 152. Zeidner KM, Desnick RJ, Ioannou YA. Quantitative determination of globotriaosylceramide by immunodetection of glycolipid-bound recombinant verotoxin B subunit. *Anal Biochem* 267:104-113 (1999).
 153. Zeleny J. Instability of electrified liquid surfaces. *Phys. Rev.*, 10:1-6 (1917).
 154. Zytковicz TH, Fitzgerald EF, Marsden D, Larson CA, Shih VE, Johnson DM, Strauss AW, Comeau AM, Eaton RB, Grady GF. Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: a two-year summary from the New England Newborn Screening Program. *Clin Chem* 47:1945-1955 (2001).

Remerciements

J'aimerais remercier très sincèrement mes trois co-directeurs : Régen Drouin, Darel Hunting et Johane Patenaude :

- Tout d'abord, un grand merci, Régen pour m'avoir offert la possibilité de poursuivre ce beau défi, avoir toujours cru en moi et m'avoir permis de pousser mes capacités au maximum et ce, depuis le tout début.

- Un grand merci, Darel, pour m'avoir ouvert les portes de ce département aussi dynamique que sympathique et pour les nombreuses discussions scientifiques enrichissantes.

- Un grand merci, Johane, pour toutes les discussions éthiques agrémentées de conversations si éclatées, mais toujours aussi productives, même le samedi matin...

À toi, Jean-François, pour m'avoir offert ton soutien indéfectible, ta patience et ton amour tout au long de ce périple rempli de rebondissements, mille mercis.

À mes deux enfants, Jean-Christian et Catherine-Marie, qui sont ma fierté et mon bonheur, merci pour votre appui, votre gentillesse et votre encouragement si précieux. Sans vous deux, ce beau défi n'aurait pas été relevé...

À mes parents, Edna et Sarto, qui ont toujours su m'encourager et me donner ce positivisme qui m'habite depuis toujours et dont le dicton a toujours été : « Quand on veut, on peut ». Merci d'être toujours là pour moi.

À ma sœur Louise, qui a le don de lire mes « thèses » avec un empressement et une minutie hors du commun, merci de toujours être là et de m'appuyer dans mes projets d'étude. À mon frère Michel, toujours prêt à m'offrir son expertise scientifique de chimiste et à Hélène pour son expertise dans la langue de Shakespeare.

Un grand merci à mon ami Joe Clarke, pour qui la passion de la science et de la découverte scientifique nous a menés à des discussions enlevantes et enrichissantes.

À Denise, ma grande amie, toujours présente, merci pour ton amitié, ton aide, ta compréhension et ton excellente écoute.

À Denis, pour avoir découvert ensemble la spectrométrie de masse en tandem dans un climat amical et détendu, pour nos échanges scientifiques et ton support, je te remercie très sincèrement. À Claude, qui m'a toujours offert son support afin d'éviter que je sois trop souvent en mode « Search » en informatique, mille mercis! À Jocelyne, mon amie et ma collègue depuis 30 ans au Programme de dépistage, toi qui a toujours été là avec ta douceur et ta générosité, merci de ton support de tous les instants.

À Marie-Chantal, Caroline, Diane, Johane, Jean, Marcelle, Doris, Sylvie, Nathalie, Isabelle, René, Sandrine, Jean-Guy, Tommy, Marc, Éric, Macoura, Oumar, Aimé et tous les autres, merci pour votre amitié!

À Roger Knoll et Denis Lacoste de la compagnie Genzyme, un grand merci pour avoir cru en l'importance de notre projet sur la maladie de Fabry et nous avoir fait confiance!

Un grand merci à tous les patients qui ont généreusement collaboré à ce projet. Sans eux, cette étude n'aurait pas été possible.