



Université de Sherbrooke

**Étude métabolomique pour la découverte de nouveaux biomarqueurs pour la maladie  
de Gaucher de type 1  
et  
Méthode de dépistage urinaire populationnel de glycosaminoglycans**

Par  
Iskren Menkovic  
Programmes de Biochimie

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 biochimie

Sherbrooke, Québec, Canada  
Février 25, 2022

Membres du jury d'évaluation

Christiane Auray-Blais, LL.M., Ph.D., département de pédiatrie, FMSS, USherbrooke

Michel Boutin, Ph.D., département de pédiatrie, FMSS, USherbrooke

Dre Natascia Anastasio, M.D., département de pédiatrie, FMSS, USherbrooke

François Bachand, Ph.D., département de biochimie, FMSS, USherbrooke

Lekha Sleno, Ph.D., département de Chimie, Faculté des sciences, UQAM

© Iskren Menkovic, 2022

*À Snjezana et Ermin*

*À Christiane*

*La science est faite d'erreurs,  
mais d'erreurs qu'il est bon de commettre,  
car elles mènent peu à peu à la vérité*

*Jules Verne*

## RÉSUMÉ

### Études métabolomiques pour la découverte de nouveaux biomarqueurs pour la maladie de Gaucher de type 1 et Méthode de dépistage urinaire populationnel des glycosaminoglycans

Par  
Iskren Menkovic  
Programme de biochimie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de philosophiae doctor (Ph.D.) en Biochimie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

#### Première Partie

La maladie de Gaucher est une maladie de surcharge lysosomale engendrée par une variation pathogénique au niveau du gène *GBA*, ce qui entraîne alors une dysfonction de l'enzyme glucocérébrosidase. Cette enzyme joue un rôle important au niveau du catabolisme du glucosylcéramide (Gb<sub>1</sub>). Ainsi, un défaut au niveau du fonctionnement de cette enzyme résulte généralement en une accumulation de glycolipides au niveau des lysosomes ce qui mène, dans certains cas, à d'importantes manifestations cliniques multisystémiques telles que des organomégalies, des cytopénies, différents types d'atteintes osseuses et, dans les cas les plus sévères de la maladie, soit les types 3 (forme intermédiaire) et type 2 (forme sévère), des atteintes neurologiques. Étant une maladie métabolique très hétérogène au niveau de la sévérité des atteintes, le génotype est souvent utilisé pour des fins de pronostic. Toutefois, il est fréquent que pour un même génotype, le phénotype puisse être très différent. Au niveau des biomarqueurs, le CCL18 ainsi que la chitotriosidase ont des limitations majeures en raison de polymorphisme populationnel, alors que le glucosylcéramide (Gb<sub>1</sub>) et le glucosylsphingosine (lyso-Gb<sub>1</sub>), bien qu'utiles pour le pronostic et le suivi des patients, offrent uniquement une image globale de la sévérité de la maladie, sans toutefois fournir d'informations sur les atteintes spécifiques et leur progression. L'hypothèse de départ est qu'il existe des biomarqueurs présents dans les liquides biologiques des patients atteints de la maladie de Gaucher de type 1 qui pourraient mieux corrélérer avec la sévérité et la progression de la maladie. Ainsi, dans le cadre de la présente étude, l'objectif principal consistait à réaliser une étude métabolomique par spectrométrie de masse à haute résolution dans le plasma et l'urine de patients Gaucher de type 1 afin d'identifier de nouveaux biomarqueurs. Ces études ont permis de détecter 21 biomarqueurs potentiels soit 7 dans le plasma et 14 dans l'urine. Des méthodes de quantification fiables et robustes par spectrométrie de masse en tandem ont été développées, puis validées afin d'étudier la distribution des biomarqueurs chez les patients. De plus, ces études quantitatives ont révélé des corrélations significatives entre certains biomarqueurs potentiels présents dans le plasma et des atteintes viscérales et hématologiques. Pour ce qui est des biomarqueurs potentiels retrouvés dans l'urine, des résultats préliminaires semblent indiquer une corrélation entre la présence des différents marqueurs et la sévérité de la maladie. Toutefois, une cohorte de

patients plus diversifiée et plus large sera requise afin de bien comprendre les liens entre ces métabolites urinaires et les manifestations cliniques observées chez les patients Gaucher de type 1.

## Deuxième Partie

Les mucopolysaccharidoses sont une classe de maladies lysosomales causées par un défaut des enzymes impliquées dans la dégradation des glycosaminoglycans. Ces perturbations dans le processus catalytique de ces macromolécules sont à l'origine d'une accumulation de substrats au niveau des lysosomes. Celles-ci alors entraîneront d'importantes atteintes multisystémiques, qui, dans certains cas, sont irréversibles. Des traitements comme la thérapie enzymatique de remplacement et la transplantation de cellules souches hématopoïétiques sont disponibles pour les patients atteints de MPS. Bien que ces traitements soient efficaces pour altérer la progression naturelle de la maladie, ils ne parviennent pas à guérir le patient. De nombreuses études ont démontré les bienfaits d'une prise en charge rapide et d'un traitement précoce. Malheureusement, au Québec, les MPS ne sont pas dépistées de manière systématique chez les nouveau-nés. Toutefois, avec le transfert technologique potentiel de l'analyse des biomarqueurs par chromatographie sur couche mince vers la spectrométrie de masse du Programme québécois de dépistage néonatal urinaire, il y a lieu de s'interroger sur la possibilité d'inclure le dépistage des MPS pour les nouveau-nés à 21 jours de vie. Cela permettrait donc d'identifier les cas rapidement et d'adapter la prise en charge du patient. Ainsi, ce projet de recherche évaluative consistait à développer et à valider une méthode d'analyse des glycosaminoglycans dans le cadre d'un dépistage populationnel chez les nouveau-nés par la spectrométrie de masse en tandem. Une méthode d'une durée d'une minute permettant la quantification absolue de l'héparan sulfate, du dermatan sulfate et de la créatinine a été développée puis validée. Cette méthode, compatible avec la collecte d'échantillons d'urine sur papier filtre utilisée actuellement au Programme québécois de dépistage néonatal urinaire permet de dépister 5 différents types de MPS, soit la MPS I, II, III, VI et VII. L'analyse de 500 échantillons d'urine de nouveau-nés a permis de fixer les valeurs moyennes à 34,6 +/-6,2 et 17,3 +/-3,9 mg/mmol de créatinine pour l'héparan sulfate et le dermatan sulfate, respectivement. De plus l'analyse d'échantillons de patients atteints de MPS de différents âges a démontré que la méthode pourrait également être utilisée dans le cadre d'un dépistage à haut-risque.

Mots clés : Maladie de Gaucher de type 1, Mucopolysaccharidoses, Spectrométrie de masse à haute résolution, Spectrométrie de masse en tandem, Métabolomique, Quantification, Biomarqueurs, Glucosylsphingosine, Lyso-Gb<sub>1</sub>, Héparan Sulfate, Dermatan Sulfate, Créatinine, Urine, Plasma

## TABLE DES MATIERES

<b>Résumé.....</b>	<b>iv</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>vi</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>ix</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>xiv</b>
<b>1 Introduction .....</b>	<b>1</b>
1 Le lysosome.....	1
1.1 La découverte du lysosome.....	1
1.2 La biogénèse du lysosome.....	2
1.3 L'utilité et les fonctions du lysosome.....	3
2 Les maladies lysosomales.....	4
2.1 La découverte des maladies lysosomales.....	4
2.2 Les maladies lysosomales .....	5
2.3 La classification des maladies lysosomales .....	6
 <b>Partie 1 - Étude métabolomique pour la découverte de nouveaux biomarqueurs pour la maladie de Gaucher de type 1</b>	
3 La maladie de Gaucher.....	11
3.1 Les aspects moléculaires.....	11
3.2 Les aspects biochimiques .....	12
3.3 Les mécanismes pathologiques.....	14
3.4 Les manifestations cliniques .....	16
3.4.1 Les manifestations cliniques de la maladie de Gaucher type 1 .....	16
3.4.2 Les manifestations cliniques de la maladie de Gaucher type 2 .....	17
3.4.3 Les manifestations cliniques de la maladie de Gaucher type 3.....	18
3.5 L'épidémiologie.....	19
3.6 Les biomarqueurs biochimiques de la maladie de Gaucher .....	19
3.7 Les traitements.....	25
3.7.1 La thérapie de remplacement enzymatique.....	25
3.7.2 La thérapie de réduction de substrat.....	27
3.7.3 La thérapie par chaperons pharmacologiques.....	27
3.7.4 Le traitement par inhibiteurs d'histones acétylases.....	28
3.7.5 Le traitement par thérapie génique.....	29
4 La présentation du projet de recherche.....	29
4.1 L'hypothèse .....	31
4.2 Les objectifs .....	31
4.3 Les retombées anticipées.....	31
5 Les matrices à l'étude.....	31
6 La préparation des échantillons .....	33
6.1 Les standards internes.....	37
7 La chromatographie liquide.....	38

7.1	La séparation chromatographique.....	39
7.2	L'effet de matrice.....	48
8	La spectrométrie de masse.....	55
8.1	Les principes de base.....	55
8.2	L'électronébulisation.....	58
8.3	La spectrométrie de masse en temps de vol.....	60
8.4	La spectrométrie de masse en QqQ.....	65
9	L'analyse et le traitement des données.....	72
9.1	L'alignement des données.....	72
9.2	La mise à l'échelle des données.....	75
9.3	Les tests statistiques.....	76
9.3.1	L'analyse de composantes principales (PCA).....	77
9.3.2	L'analyse discriminante par les moindres carrés partiels orthogonaux, le S-plot et le graphique de tendance.....	78
10	La validation d'une méthode d'analyse par spectrométrie de masse.....	80

## **Partie 2 - Méthode de dépistage urinaire populationnel de glycosaminoglycans**

11	Les mucopolysaccharidoses.....	83
12	La structure et les fonction des glycosaminoglycans.....	84
13	Le catabolisme des glycosaminoglycans.....	86
14	Les manifestations cliniques des mucopolysaccharidoses.....	87
15	Les traitements pour les mucopolysaccharidoses.....	89
15.1	Les traitements symptomatiques.....	89
15.2	La thérapie enzymatique de remplacement.....	90
15.3	La transplantation de cellules souches hématopoïétiques.....	90
15.4	La thérapie génique.....	91
15.5	La thérapie de réduction de substrat.....	92
16	La présentation du projet de recherche.....	93
16.1	L'hypothèse.....	94
16.2	Les objectifs du projet de recherche.....	94
16.3	Les retombées anticipées du projet.....	94
17	Le dépistage des MPSs.....	94
18	La préparation des échantillons élués des papiers filtres.....	96
18.1	La méthanolyse.....	97
19	La méthode de séparation chromatographique des analytes.....	99
20	La validation de la méthode et l'établissement des valeurs de référence.....	101
21	<b>Article 1: Identification of a Reliable Biomarker Profile for the Diagnosis of Gaucher Disease Type 1 Patients Using a Mass Spectrometry-Based Metabolomic Approach.....</b>	<b>103</b>
22	<b>Article 2: Quantitation of a Plasma Biomarker Profile for the Early Detection of Gaucher Disease Type 1 Patients.....</b>	<b>137</b>



<b>23 Article 3: Metabolomic Study Using Time-of-Flight Mass Spectrometry Reveals Novel Urinary Biomarkers for Gaucher Disease Type 1.....</b>	<b>182</b>
<b>24 Article 4: Quantitation of a Urinary Profile of Biomarkers in Gaucher Disease Type 1 Patients Using Tandem Mass Spectrometry .....</b>	<b>217</b>
<b>25 Article 5: Neonatal Mass Urine Screening Approach for Early Detection of Mucopolysaccharidoses by UPLC-MS/MS .....</b>	<b>258</b>
<b>26 Discussion.....</b>	<b>276</b>
26.1 Les études métabolomiques.....	276
26.1.1 L'optimisation des paramètres UPLC et MS pour les études métabolomiques.....	276
26.1.2 L'origine des biomarqueurs identifiés lors des études métabolomiques...	277
26.1.3 Les analogues polycycliques: des biomarqueurs inattendus.....	278
26.1.4 Les cohortes des études plasmatiques et urinaires.....	279
26.2 Les méthodes quantitatives .....	280
26.2.1 Les défis et solutions .....	280
26.2.2 Les corrélations entre les biomarqueurs et les manifestations cliniques.....	281
26.2.3 Les biomarqueurs urinaires et les biomarqueurs plasmatiques.....	282
26.2.4 Les méthodes quantitatives et les laboratoires cliniques.....	282
26.3 Le dépistage des MPSs.....	283
26.3.1 Le dépistage des MPSs au Québec et ailleurs.....	283
26.3.2 Les biomarqueurs analysés.....	284
26.3.3 Les valeurs de références.....	285
<b>27 Conclusions .....</b>	<b>286</b>
<b>28 Remerciements.....</b>	<b>287</b>
<b>29 Liste des références.....</b>	<b>289</b>

## LISTE DES FIGURES

### Introduction

Figure 1 Les voies alternatives de dégradation du glucosylcéramide.....	14
Figure 2 Structure chimique du glucosylcéramide et du glucosylsphingosine.....	23
Figure 3 Structure chimique du polymère présent dans les colonnes OASIS MCX (Waters) utilisées dans le cadre du projet afin de purifier les échantillons d'urine et de plasma.....	35
Figure 4 Tentative de séparation du lyso-Gb <sub>1</sub> du galactosylsphingosine avec la colonne CORTECS HILIC et Halo HILIC.....	44
Figure 5 Optimisation de la chromatographie pour l'analogue +16 Da à l'aide de formate d'ammonium.....	46
Figure 6 Effet du changement de la température sur l'apparence des pics chromatographiques correspondant à l'analogue +16 Da mesuré dans le plasma.....	48
Figure 7 Infusion post-colonne de standard de lyso-Gb <sub>1</sub> -( <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ) à une concentration de 1 µg/ml et un débit de 0,15 µl/min simultanée à l'injection d'un échantillon de contrôle.....	50
Figure 8 Composantes principales d'un spectromètre de masse .....	57
Figure 9 Exemple schématisé de l'électronébulisation en mode positif .....	59
Figure 10 Fonctionnement d'un analyseur de masse en temps de vol .....	62
Figure 11 Appareils utilisés dans le cadre du projet de doctorat .....	65
Figure 12 Coupe schématique du triple quadripôle.....	67
Figure 13 Fonctionnement du mode d'analyse en MRM. ....	68
Figure 14 Exemple d'optimisation des paramètres d'énergie de collision et du voltage du cône pour le sphingosylphosphorylcholine et le lyso-Gb <sub>1</sub> .....	70
Figure 15 Optimisation des paramètres de voltage du capillaire et de température de désolvatation.....	71

Figure 16 Capture d'écran de l'étape d'alignement des données.....	72
Figure 17 Variation du temps de rétention et de la masse exacte observés pour le lyso-Gb <sub>1</sub> lors de l'étude métabolomique suite à l'analyse du même échantillon .....	73
Figure 18 S-plot obtenu avec une mise à l'échelle Pareto .....	79
Figure 19 Structure moléculaire de l'héparan sulfate et du dermatan sulfate .....	85
Figure 20 Méthanolyse de l'héparan sulfate et du dermatan sulfate .....	98
Figure 21 Séparation chromatographique des molécules d'intérêt pour la méthode de dépistage des MPS.....	99
 <b>Article 1</b>	
Figure 1 Chromatographic separation of glucosylsphingosine and psychosine .....	109
Figure 2 A principal component analysis (PCA) score plot derived from the metabolomic analysis of plasma samples from untreated Gaucher disease (GD) patients ( $n = 16$ ), age- and gender-matched healthy controls ( $n = 16$ ), and quality control (QC) replicate injections ( $n = 8$ ).....	110
Figure 3 An orthogonal partial least-square discriminant analysis (OPLS-DA) score plot, resulting from the metabolomic analysis of plasma samples from untreated GD patients ( $n = 16$ ) and age- and gender-matched healthy controls ( $n = 16$ ).....	111
Figure 4 S-plot showing the correlation in function of the covariance for the metabolites used to segregate GD patients and age- and gender-matched healthy controls in the OPLS-DA score plot.....	112
Figure 5 Fragmentation test results for compounds with $m/z$ 462.3426 (A), 460.3227 (B), 480.3553 (C) 434.3074 (D), and 76.3633 (E), with a collision energy ramp of 10-30 V.....	114
Figure 6 Fragmentation tests of compounds with $m/z$ 509 with a collision energy ramp of 10-25 V (A) and a fragmentation mechanism previously proposed by Sidhu et al. [30], with theoretical masses and measured mass errors in parts per million (ppm) (B).....	115
Figure 7 Fragmentation test results of compounds with $m/z$ 465, with a collision energy ramp of 15-25 V (A). Fragmentation test results of a standard of sphingosylphosphorylcholine (d18:1) (10 $\mu$ g on column) (B) and a proposed fragmentation mechanism with theoretical and experimental exact mass differences (C).....	117

Figure 8 Bee-plot distribution (A) and cumulative concentrations (B) of potential GD biomarkers highlighted in the current metabolomic study .....	118
Figure A1 Trend plot charts for lyso-Gb <sub>1</sub> (A), lyso-Gb <sub>1</sub> analogs -28 Da (B), -2 Da (C), + 14 Da (D), +18 Da (E), N-palmitoyl-O-phosphocholineserine (F), and sphingosylphosphorylcholine (G).....	135
Figure A2 Areas under the curve are shown for lyso-Gb <sub>1</sub> (A), lyso-Gb <sub>1</sub> analog +18 Da (B), lyso-Gb <sub>1</sub> analog -2 Da (C), lyso-Gb <sub>1</sub> analog -28 Da (D), lyso-Gb <sub>1</sub> analog +14 Da (E), sphingosylphosphorylcholine (F), and N-palmitoyl-O-phosphocholineserine (G).....	136
<b>Article 2</b>	
Figure 1 Chromatographic separation of lyso-Gb <sub>1</sub> and psychosine.....	148
Figure 2 A) Ion chromatograms of lyso-Gb <sub>1</sub> and related analogs. The peaks at analog +16 Da are structural isomers; B) Ion chromatogram showing the post-column infusion of lyso-Gb <sub>1</sub> -( <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ).....	150
Figure 3 Ion chromatograms of the lyso-Gb <sub>1</sub> analog +16 Da with different transitions using collision energies ranging from 12 to 27 V .....	152
Figure 4 Ion chromatograms of SPC and NPOPCS; B) Ion chromatogram showing the post-column infusion of SPC-(D <sub>9</sub> ) .....	153
Figure 5 Distribution of A) Lyso-Gb <sub>1</sub> , SPC, and NPOPCS; B) Lyso-Gb <sub>1</sub> analogs +18, +16, +14, -2, -12, and -28 Da in treated (n=10), untreated with severe (n=10) and attenuated (n=10) GD type 1 adults, and healthy adult controls (n=10).....	157
Figure 6 Correlations between each disease domain and individual biomarker concentration in an untreated adult GD type 1 patient. Scores were based on clinical manifestations and corresponding scores presented in Table 3.....	160
Figure 7 Biomarker reduction following ERT treatment in a 55-year-old female GD type 1 patient.....	165
Supp Figure 1 Biomarker reduction following ERT treatment in a 55-year-old male GD type 1 patient.....	177
Supp Figure 2 Biomarker reduction following ERT treatment in a 18-year-old male GD type 1 patient.....	178
Supp Figure 3 Pie chart distribution of lyso-Gb <sub>1</sub> analogs +18, +14, +16, -2, -12, and -28 Da pre- and post-ERT in a 55-year-old female GD type 1 patient.....	179

Supp Figure 4 Pie chart distribution of lyso-Gb <sub>1</sub> analogs +18, +14, +16, -2, -12, and -28 Da pre- and post-ERT in a 55-year-old male GD type 1 patient.....	180
Supp Figure 5 Pie chart distribution of lyso-Gb <sub>1</sub> analogs +18, +14, +16, -2, -12, and -28 Da pre- and post-ERT in a 18-year-old male GD type 1 patient.....	181
<b>Article 3</b>	
Figure 1 Orthogonal partial least square-discriminant analysis (OPLS-DA) score plot obtained following the analysis of GD patient samples (n = 15) and age- and gender-matched healthy controls (n = 15).....	192
Figure 2 S-plot indicating the correlation in function of the covariance for the metabolites used to differentiate GD patients as well as age- and gender-matched healthy controls.....	193
Figure 3 Proposed structures for polycyclic lyso-Gb <sub>1</sub> analogs 362 Da (A), 366 Da (B), 390 Da (C), and 394 Da (D).....	195
Figure 4 Potential link between sphingosine and newly identified metabolites based on addition and removal of chemical groups previously observed for lyso-Gb <sub>1</sub> analogs.....	196
Figure 5 Distributions of: A) lyso-Gb <sub>1</sub> and related analogs in GD type 1 patients; B) polycyclic lyso-Gb <sub>1</sub> analogs in GD type 1 patients.....	197
Figure S-1 Chromatographic separation of lyso-Gb <sub>1</sub> and psychosine commercial standards analyzed by time-of-flight mass spectrometry (MS-TOF) using positive electrospray ionization (ESI+).....	200
Figure S-2 Trendplot charts for potential biomarkers.....	202
Figure S-3 Fragmentation profile results for A) lyso-Gb <sub>1</sub> as well as the analogs with <i>m/z</i> B) 506.3300, C) 494.3312, D) 492.3159, E) 478.3388, F) 478.3006, G) 476.3199, H) 464.2867, I) 450.3007, and J) 436.2503.....	204
Figure S-4 Fragmentation test results for compounds with <i>m/z</i> A) 394.2062, B) 390.2114, C) 366.1750, and D) 362.1800.....	205
Figure S-5 Proposed fragmentation mechanism for polycyclic lyso-Gb <sub>1</sub> analog 394 with theoretical masses and measured mass errors in parts per million (ppm).....	206
Figure S-6 Proposed fragmentation mechanism for polycyclic lyso-Gb <sub>1</sub> analog 390 with theoretical masses and measured mass errors in parts per million (ppm).....	207
Figure S-7 Proposed fragmentation mechanism for polycyclic lyso-Gb <sub>1</sub> analog 366 with theoretical masses and measured mass errors in parts per million (ppm).....	208

Figure S-8 Proposed fragmentation mechanism for polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> analog 362 with theoretical masses and measured mass errors in parts per million (ppm).....209

#### Article 4

Figure 1 Potential GD biomarkers highlighted in urine specimens .....222

Figure 2 Ion chromatogram obtained by multiple reaction monitoring of 60 ng on-column of lyso-Gb<sub>1</sub> standard and 10 ng on-column of psychosine standard.....229

Figure 3 Chromatographic separation of potential lyso-Gb<sub>1</sub> biomarkers and creatinine with their respective internal standards.....230

Figure 4 Post-column infusion of lyso-Gb<sub>1</sub>-(<sup>13</sup>C<sub>6</sub>) (1 μg/ml; 0.15 μl/min) during the injection of a healthy control plasma sample. ....231

Figure 5 Fragmentation of lyso-Gb<sub>1</sub> analogs +14 Da .....233

Figure 6 Fragmentation of lyso-Gb<sub>1</sub> analogs +16 Da.....235

Figure 7 Distribution of: A) lyso-Gb<sub>1</sub> and analogs +32, +30, +16 (A) and (B), +14, +2, -12 (A) and (B), -26, as well 28 Da; and B) Distribution of polycyclic analogs 394, 390, 366, and 362 Da in untreated, treated, and healthy controls (n=9).....239

Figure 8 Biomarker concentration levels post-ERT treatment in a 55-year-old female GD type 1 patient with p.N370S/D409H mutation.....242

Figure S-1 Trendplot analysis of lyso-Gb<sub>1</sub> analog -12 Da (A) with a retention time of 5.92 min.....255

Figure S-2 Biomarker concentration levels post-ERT treatment in a 55-year-old male GD type 1 patient with p.N370S/D409H mutation.....256

Figure S-3 Biomarker concentration levels post-ERT treatment in a 18-year-old male GD type 1 patient with p.N370S/D409H mutation.....257

#### Article 5

Figure 1 Ion chromatograms of heparan sulfate (HS), dermatan sulfate (DS), and creatinine standards and their deuterated counterparts.....268

Figure 2 HS and DS concentrations expressed in mg/mmol of creatinine measured in five hundred dried urine spots (DUS) from 21-day-old control newborns.....270

## LISTE DES TABLEAUX

### Introduction

Tableau 1 Classification des maladies lysosomales en fonction du substrat accumulé.....	8
Tableau 2 Classification des maladies lysosomales en fonction du substrat accumulé et du défaut moléculaire sous-jacent à la pathologie.....	10
Tableau 3 Optimisation de la solution de resuspension à l'aide de standard de lyso-Gb <sub>1</sub> pour un même échantillon donné.....	36
Tableau 4 Les paramètres qui influencent l'équation de Van Deemter.....	41
Tableau 5 Méthode chromatographique UPLC employée pour la séparation des constituants plasmatiques et urinaires lors des études métabolomiques.....	52
Tableau 6 Paramètres chromatographiques UPLC utilisés pour la méthode de quantification des biomarqueurs urinaires associés à la maladie de Gaucher.....	53
Tableau 7 Paramètres chromatographiques UPLC utilisés pour la méthode de quantification des biomarqueurs plasmatiques associés à la maladie de Gaucher.....	54
Tableau 8 Molécules ciblées comme biomarqueurs potentiels suite aux études métabolomiques dans le plasma et l'urine.....	69
Tableau 9 Paramètres en spectrométrie de masse à optimiser pour augmenter la sensibilité de la méthode.....	71
Tableau 10 Paramètres de l'alignement des données optimisés grâce aux échantillons QC.....	74
Tableau 11 Critères de validation de méthode quantitative en spectrométrie de masse proposés par l'agence gouvernementale américaine Food and Drug Administration .....	81
Tableau 12 Classification des mucopolysaccharidoses selon l'enzyme déficiente et le substrat accumulé pour chacune.....	84
Tableau 13 Signes et manifestations cliniques associés aux différents types de mucopolysaccharidoses .....	88
Tableau 14 Paramètres chromatographiques UPLC employés pour la méthode de quantification des glycosaminoglycans .....	101

## Article 1

Tableau 1 Demographics, mutations, treatment, and signs and symptoms of GD patients .....	121
Tableau 2 Ultra-performance liquid chromatography (UPLC) parameters for the separation of the plasma samples analyzed during the metabolomic study.....	124
Tableau 3 Mass spectrometry (MS) parameters for the quantitation of compounds present in the plasma samples analyzed during the metabolomic study.....	125

## Article 2

Tableau 1 Ultra-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS) Method Parameters .....	145
Tableau 2 Method validation parameters using commercially available standards of lyso-Gb <sub>1</sub> and SPC.....	154
Tableau 3 Scoring table used to assess the GD severity based on clinical manifestations....	156
Tableau 4 Effects of ERT on hematological and visceral complications in a 55-year-old female GD type 1 patient.....	166
Tableau S-1 Low (LQC), Medium (MQC), and High (HQC) quality control samples precision and accuracy results for intra- and interday analyses.....	175
Tableau S-2 Stability of lyso-Gb <sub>1</sub> in plasma samples expressed in bias (%) after 24 hours, 48 hours, 1 week and 1 month at -30°C, 4°C and 22°C.....	175
Tableau S-3 Stability of SPC in plasma samples expressed in bias (%) after 24 hours, 48 hours, 1 week and 1 month at -30°C, 4°C and 22°C.....	175
Tableau S-4 Calculated <i>p</i> -values in treated, untreated severe, and attenuated GD patients as well as healthy controls.....	176

## Article 3

Tableau 1 UPLC-TOF MS parameters for the discovery of novel GD type 1 related metabolites in urine samples.....	188
Tableau 2 Lyso-Gb <sub>1</sub> analogs flagged as potential biomarkers in urine for Gaucher disease.....	194
Tableau S-1 Accurate mass of fragments obtained following collisions tests of the potential biomarker <i>m/z</i> 394.2102 using a collision ramp energy of 10-25 V.....	210



Tableau S-2 Accurate mass of fragments obtained following collision tests of the potential biomarker $m/z$ 390.2113 using a collision ramp energy of 15-30 V.....	210
Tableau S-3 Accurate mass of fragments obtained following collision tests of the potential biomarker $m/z$ 366.1762 using a collision ramp energy of 10-25 V.....	211
Tableau S-4 Accurate mass of fragments obtained following collision tests of the potential biomarker $m/z$ 362.1808 using a collision ramp energy of 15-35 V.....	211
Tableau S-5 Demographics, mutations, and signs and symptoms of GD patients.....	212
<b>Article 4</b>	
Tableau 1 Ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method parameters.....	226
Tableau 2 Method validation parameters using lyso-Gb <sub>1</sub> and creatinine standards.....	238
Tableau 3 Limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) for lyso-Gb <sub>1</sub> as well as lyso-Gb <sub>1</sub> analogs and polycyclic analogs.....	238
Tableau 4 Clinical data for 55-year-old female GD type 1 patient post-ERT. ....	243
Tableau S-1 Creatinine quantification parameters using an Acquity UPLC coupled to a Synapt G1 TOF-MS.....	251
Tableau S-2 MS-TOF Parameters used for fragmentation tests of lyso-Gb <sub>1</sub> analogs -12 and +16 Da .....	252
Tableau S-3 Low (LQC), medium (MQC), and high (HQC) quality control samples precision and accuracy results for intra- and interday analyses.....	253
Tableau S-4 Stability of lyso-Gb <sub>1</sub> in urine samples expressed in bias (%) after 24 hours, 48 hours, 1 week, and 1 month at -30°C, 4°C, and 22°C.....	253
Tableau S-5 Stability of creatinine in urine samples expressed in bias (%) after 24 hours, 48 hours, 1 week, and 1 month at -30°C, 4°C, and 22°C.....	253
Tableau S-6 Calculated biomarker $p$ -values in treated, untreated severe, and attenuated GD patients as well as healthy controls using the non-parametric Mann-Whitney U test.....	254
Tableau S-7 Calculated biomarker $p$ -values in treated, untreated severe, and attenuated GD patients as well as healthy controls using the non-parametric Mann-Whitney U test.....	254

**Article 5**

Tableau 1 Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) parameters for the analysis of heparan sulfate (HS), dermatan sulfate (DS), and creatinine.....	265
Tableau 2 Tandem mass spectrometry (MS/MS) parameters and transitions used for the quantification of DS, HS, creatinine and their respective deuterated internal standards.....	266
Tableau 3 Analysis of dermatan sulfate (DS) and heparan sulfate (HS) in urine samples collected on filter papers from Mucopolysaccharidose (MPS) patients.....	271

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAV	<i>Adeno-Associated Virus</i>
AC	<i>Alternating Current/</i> Courant alternatif
ACE	<i>Angiotensin-Converting Enzyme</i>
ACN	Acétonitrile
Ala	Alanine
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization/</i> Ionisation chimique à pression atmosphérique
APPI	<i>Atmospheric Pressure Photoionization Ionization/</i> Photo-ionisation à pression atmosphérique
Arg	Arginine
ASAH1	N-acylsphingosine amidohydrolase 1
ATK	Protéine kinase B
CCL18	<i>CC Chemokine Ligand 18</i>
CERS	Céramide synthase
CHI3L1	<i>Chitinase-3-like protein 1</i>
Da	Dalton
DC	<i>Direct Current/</i> Courant continu
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EGF	<i>Epidermal Growth Factor/</i> Facteur de croissance épidermal
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ESI	<i>Electrospray Ionization/</i> Ionisation par électronébulisation
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor/</i> Facteurs de croissance des fibroblastes
Gb <sub>1</sub>	Glucosylcéramide
GBA2	Glucosylcéramidase β 2
GC	<i>Gas Chromatography/</i> Chromatographie à phase gazeuse
GCase	Glucocérébrosidase
GlcA	Acide β-d-glucuronique
GlcN	α-d-/β-d-glucosamine
GlcNAc	N-acétyl-D-glucosamine
Glu	Glutamate
Gly	Glycine
HILIC	<i>Hydrophilic Interactions Liquid Chromatography/</i> Chromatographie d'interactions hydrophiles
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography/</i> Chromatographie liquide de haute performance
Hsp90	<i>Heat Shock Protein 90</i>
IC <sub>50</sub>	Constante inhibitrice médiane
IdoA	Acide α-l-iduronic
LAMP	<i>Lysosomal Associated Membrane Protein</i>

LIMP	<i>Lysosomal Integral Membrane Protein</i>
Lys	Lysine
Lyso-Gb <sub>1</sub>	Glucosylsphingosine
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/Désorption-ionisation laser assistée par matrice</i>
MCX	<i>Mixed Cation Exchange</i>
MeOH	Méthanol
MPS	Mucopolysaccharidose
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring/</i> Monitoring de réactions multiples
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry/</i> Spectrométrie de masse en tandem
<i>m/z</i>	Rapport masse/charge
NB-DNJ	N-butyl-deoxynojirimycine
OPLS-DA	<i>Orthogonal Partial Least Square-Discriminant Analysis</i>
PARC	<i>Pulmonary and Activation-Regulated Chemokine</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
pH	Potentiel hydrogène
ppm	Parties par million
QC	<i>Quality Control/</i> Échantillon de contrôle de qualité
QqQ	Triple quadripôle
QTOF	<i>Quadrupole-Time-of-Fight Mass Spectrometry/Quadripôle couplé à la spectrométrie de masse en temps de vol</i>
RF	Radiofréquence
RUSP	<i>Recommended Uniform Screening Panel</i>
Ser	Sérine
SMS1/2	Sphingomyéline Synthase 1/2
SPE	<i>Solid Phase Extraction/</i> Extraction en phase solide
SPHK1	Sphingosine kinase 1
TER	Thérapie enzymatique de remplacement
TG-β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TNF-α	<i>Tumour Necrosis Factor α/</i> Facteur de nécrose tumorale α
TRAP5b	<i>Tartrate-Resistant Acid Phosphatase 5b</i>
UDP	Uridine diphosphate
UPLC	<i>Ultra-Performance Liquid Chromatography/</i> Chromatographie liquide ultra performante
UV	<i>Unit Variance</i>
Val	Valine



## INTRODUCTION

### 1 Le lysosome

#### *1.1 La découverte du lysosome*

Le médecin et biochimiste belge, Christiane de Duve, a été le premier à observer cette composante cellulaire aujourd'hui connue sous le nom de lysosome lors de ses recherches sur le mécanisme d'action de l'insuline en 1955 (de Duve, 2005). Au cours de ses recherches sur l'enzyme glucose-6-phosphatase, Dr de Duve a observé qu'un pH acide cause une précipitation irréversible de l'enzyme. Cette observation a permis au biochimiste d'émettre l'hypothèse que le glucose-6-phosphatase est agglutiné avec des membranes cytoplasmiques (Sabatini et Adesnik, 2013). Le groupe de recherche du Dr de Duve a donc décidé de tenter d'isoler l'enzyme par fractionnement cellulaire selon un protocole impliquant une homogénéisation douce visant à conserver l'intégrité des organelles (Sabatini et Adesnik, 2013). Au cours de cette procédure, le groupe de recherche décida de considérer l'enzyme phosphatase acide, une enzyme présente dans la majorité des tissus et ayant une très grande variété de substrat comme contrôle positif (Sabatini et Adesnik, 2013). Selon l'hypothèse émise par Dr de Duve, la phosphatase acide aurait dû se retrouver dans le surnageant suite au fractionnement cellulaire à homogénéisation douce, puisque l'enzyme était soluble dans les homogénats préparés à l'aide de mixeur de type Waring blender, soit une homogénéisation plus forte (Sabatini et Adesnik, 2013). Toutefois, au grand étonnement de l'équipe de recherche, l'enzyme était présente dans toutes les fractions cellulaires et particulièrement dans la fraction granulaire contenant les mitochondries (Sabatini et Adesnik, 2013). En plus de cette observation « inusitée », l'équipe de recherche constate également que la somme de l'activité enzymatique présente dans les différentes fractions était significativement supérieure à l'homogénat initial qui, important de le rappeler, était une homogénéisation douce visant à préserver l'intégrité des organelles. En plus de ces deux éléments difficiles à expliquer, Dr de Duve et son équipe constatent lorsque l'expérience est reproduite en utilisant une forte homogénéisation (mixeur de type Waring blender), une activité dans l'homogénat initial fortement augmentée (Sabatini et Adesnik, 2013). Ainsi, l'équipe de recherche du Dr de Duve décide de congeler les différents échantillons pendant qu'ils réfléchissent à une

hypothèse reliée à ces phénomènes. Près d'une semaine plus tard, l'équipe réanalyse les échantillons et, à leur grand étonnement, l'activité enzymatique a fortement augmenté dans la très grande majorité des fractions cellulaires et particulièrement dans l'homogénat initial (Sabatini et Adesnik, 2013). Par la suite, l'équipe du Dr. De Duve a démontré que cet effet de gel/dégel est en réalité une procédure qui a pour effet de détruire les membranes cellulaires (Sabatini et Adesnik, 2013). Ainsi, cette dernière observation entraîne ultimement la conclusion que l'enzyme en question est contenue dans une membrane cellulaire ce qui empêche ladite enzyme d'être en contact constant avec le substrat (Sabatini et Adesnik, 2013). En 1955, Dr de Duve nomme cette composante cellulaire « le lysosome » qui signifie corps digestif en grec. Cette découverte, ainsi que celle du peroxysome, a valu à Christian de Duve le prix Nobel en physiologie/médecine en 1974 (de Duve, 2005).

### ***1.2 La biogénèse du lysosome***

La biogénèse du lysosome débute au niveau du réticulum endoplasmique rugueux où les ribosomes synthétisent les enzymes (hydrolases acides) qui composent le lysosome (Saftig et Klumperman, 2009). Suite à leur synthèse, ces enzymes subiront différentes modifications post-traductionnelles telles que le clivage de la séquence signal ainsi que la glycosylation de certaines asparagines prédéterminées. Ceci aura pour effet de favoriser l'interaction entre les enzymes nouvellement synthétisées et différents chaperons afin de permettre aux enzymes d'atteindre certaine conformation de manière à être apte pour le transport vers le côté cis de l'appareil de Golgi (Saftig et Klumperman, 2009). Une fois arrivées au Golgi, les hydrolases acides qui formeront le futur lysosome se verront ajouter un groupement mannose-6-phosphate en 2 étapes. En premier lieu, sous l'action de l'enzyme l'UDP-N-acétylglucosamine 1-phosphotransférase se produit le transfert d'un groupement UDP-GlcNAc-1-phosphate sur un carbone en position 6. Puis la N-acétylglucosamine-1-phosphodiester  $\alpha$ -N-acétyl-glucosaminidase catalyse le retrait d'un groupement N-acétylglucosamine terminal, ce qui permet d'exposer un groupement mannose-6-phosphate (Braulke et Bonifacino, 2009). Ce groupement mannose-6-phosphate, qui agit alors comme signal de reconnaissance, sera reconnu au niveau du trans-Golgi par les récepteurs mannose-6-phosphate. À ce moment, le complexe comprenant l'hydrolyse acide, le groupement mannose-6-phosphate et son récepteur sera enrobé dans des vésicules de transport puis exporté au niveau du cytoplasme pour fusionner avec des endosomes tardifs (Luzio *et al.*,

2014). En raison du pH acide (4,5-5) au niveau du lumen de l'endosome produit par les pompes à proton ATPase présentes à la surface de celui-ci, il y a une dissociation entre le groupement mannose-6-phosphate et son récepteur (Saftig et Klumperman, 2009). Ce dernier sera de nouveau enrobé dans des vésicules de transport puis transporté vers le Golgi afin d'y être recyclé (Luzio *et al.*, 2014). Ainsi, toutes ces étapes, que ce soit au niveau de la synthèse des pré-enzymes, de la maturation de celles-ci, que du transport et de la fusion avec les endosomes, se doivent de fonctionner adéquatement sans quoi, peuvent survenir d'importantes maladies métaboliques héréditaires connues sous le nom de maladies de surcharge lysosomale (ou maladies lysosomales).

### ***1.3 L'utilité et les fonctions du lysosome***

Les lysosomes sont des organites sphériques de 0,2  $\mu\text{m}$  à 0,5  $\mu\text{m}$  présents en plusieurs copies dans la plupart des cellules végétales et animales (Xu et Ren, 2015; Meyer-Schwesinger, 2021). Seules les hématies, également connues sous le nom de globules rouges, sont dépourvues de lysosomes. Au niveau de la composition, deux classes de protéines sont présentes, soit les enzymes et les protéines membranaires. Premièrement, les enzymes, plus précisément les hydrolases acides, qui sont activées en raison du pH acide du milieu, sont retrouvées au niveau du lumen du lysosome et sont impliquées dans le renouvellement des composantes cellulaires ainsi que dans la dégradation des macromolécules. Les protéines, les polysaccharides et les lipides complexes sont dégradés en unités de base tels que les acides aminés, les monosaccharides et les chaînes d'acide gras libre (Xu et Ren, 2015). À l'aide de ces enzymes, le lysosome peut remplir ses fonctions de digestion intracellulaire et extracellulaire sous la forme d'autophagie, de phagocytose ou d'endocytose (Cooper, 2000). En plus de celles-ci, les enzymes peuvent être impliquées dans de nombreux autres processus cellulaires comme la mort cellulaire programmée (Berruti et Paiardi, 2011 ; Tsukamoto *et al.*, 2013 ; Kavcic *et al.*, 2017 ;). L'autre classe de protéines observables au niveau du lysosome, soit les protéines membranaires, contrôle le passage des composés à l'intérieur et à l'extérieur du lysosome. Parmi ces nombreuses protéines membranaires, les protéines « Lysosomal Integral Membrane Protein » (LIMP) et « Lysosomal Associated Membrane Protein » (LAMP) représentent près de 50 % des protéines membranaires (Schwake *et al.*, 2013). Ainsi, pour s'assurer d'un bon fonctionnement au niveau de la cellule, et par le fait même, de l'organisme, tant les protéines membranaires que les hydrolases acides qui



composent le lysosome doivent être fonctionnelles. Toutefois, lorsqu'une mutation survient et que celle-ci affecte la capacité de l'une des différentes hydrolases à dégrader son substrat ou affecte la signalisation de la cellule, surviennent alors de sérieuses maladies métaboliques (surcharge lysosomale).

## **2 Les maladies lysosomales**

### ***2.1 La découverte des maladies lysosomales***

En 1881, l'ophtalmologue Warren Tay observe ce qui semble être une tache rougeâtre dans l'œil d'un jeune enfant âgé d'un an, qui en plus de cette tache, présente également des signes de dégénérescence du système nerveux central ainsi qu'un retard intellectuel (Kelley, 2010). Puis, en 1886, le neurologue américain Bernard Sachs observe également ces atteintes chez certains patients et conclut qu'il s'agit d'un désordre transmissible de manière héréditaire particulièrement présent chez les individus d'origine juive d'Europe centrale et d'Europe de l'Est (Kelley, 2010). Il observe également que les individus touchés par ce désordre souffrent de cécité précoce, d'importants retards intellectuels et qu'ils décèdent relativement tôt dans l'enfance (Kelley, 2010). Ainsi, sans le savoir pleinement, les Drs Tay et Sachs ont décrit la première maladie lysosomale, soit la maladie de Tay-Sachs (OMIM 272800). Par ailleurs, en 1882, Philippe Gaucher, un médecin français décrit pour la première fois la maladie qui porte aujourd'hui son nom, soit la maladie de Gaucher (OMIM 23800) (Mehta, 2006). Effectivement, dans une publication intitulée « De l'épithélioma primitif de la rate, hypertrophie idiopathique de la rate sans leucémie », le docteur Gaucher a décrit le cas d'une femme de 34 ans souffrant d'une splénomégalie à l'époque qualifiée d'idiopathique (Gaucher, 1882). Il a également noté la présence de cellules de taille et de forme inhabituelles chez cette patiente. Près de 16 ans plus tard, le dermatologue allemand Johannes Fabry décrit le cas d'un enfant de 13 ans présentant des angiokératomes (Fabry, 1898, Mehta *et al.*, 2006). Puis, au cours de la même année, un dermatologue anglais, Dr William Anderson, décrit à son tour le cas d'un patient de 39 ans présentant des angiokératomes, une protéinurie ainsi que des varices. En se basant sur ses observations cliniques, le Dr William Anderson conclut que ces symptômes sont probablement tous reliés et qu'il s'agit d'une atteinte multisystémique dorénavant appelée la maladie de Fabry (301500) (Anderson 1898, Mehta *et al.*, 2006).

Ainsi, malgré le fait que les premières maladies lysosomales ont été décrites vers la fin du 19<sup>e</sup> siècle, le concept de groupe ou classe de maladies n'est apparu qu'en 1963 suite aux travaux du médecin et chercheur belge Henri-Géry Hers. Effectivement, c'est en étudiant les effets d'une déficience au niveau de l'alpha-glucosidase, l'enzyme qui entraîne la maladie de Pompe, que le Dr Hers en est venu à proposer le concept de maladie de surcharge lysosomale en 1963 (Hers, 1963). Actuellement, près de 60 ans après l'apparition du concept de maladie de surcharge lysosomale, c'est plus d'une cinquantaine de maladies qui se retrouvent dans ce groupe (Schielen *et al.*, 2017). Parmi celles-ci, la très grande majorité sont des maladies de transmission autosomique récessive. En fait, seulement trois sont liées à une mutation pathogénique sur le chromosome X soit la maladie de Fabry, la mucopolysaccharidose de type II (MPS II) ou maladie de Hunter (OMIM 309900) ainsi que la maladie de Danon (OMIM 300257) (Tanpaiboon, 2019). Globalement, ces maladies sont rares. Effectivement, la maladie de Gaucher (OMIM 230800), maladie lysosomale ayant l'incidence la plus importante, touche environ 1 personne sur 57 000 (Stirnemann *et al.*, 2017). Toutefois, lorsque considérées en tant que groupe, les maladies lysosomales sont relativement fréquentes avec 1 cas par 7 700 naissances (Tanpaiboon, 2019). En fait, certaines maladies sont particulièrement fréquentes dans certaines régions du monde. Par exemple, une étude de dépistage des nouveau-nés réalisée à Tapei a révélée que l'incidence de la maladie de Fabry était de 1 :1600 (Auray-Blais *et al.*, 2017)

## ***2.2 Les maladies lysosomales***

Les maladies métaboliques héréditaires sont généralement le résultat d'une ou plusieurs mutations d'un gène qui auront pour effets d'altérer le fonctionnement normal d'une protéine. Dans le cas des maladies de surcharge lysosomale, ce sont souvent les enzymes impliquées dans le catabolisme qui sont touchées, ce qui entraîne alors l'accumulation du substrat. Ces substrats ou intermédiaires de réaction peuvent s'avérer toxiques pour la cellule, ce qui est à l'origine des manifestations cliniques (Boyer *et al.*, 2015). Toutefois, bien que ce type de relation semble relativement simple à comprendre, la réalité sous-jacente de chacune des maladies lysosomales est beaucoup plus complexe. Effectivement, les voies métaboliques chez les êtres vivants sont toutes interreliées. Ainsi, une voie métabolique affectée touche souvent plusieurs autres voies secondaires également (Futerman et Meer, 2004). Il est aussi

important de mentionner que ce ne sont pas uniquement des déficiences enzymatiques qui sont à l'origine des maladies lysosomales. Différents défauts tels que des anomalies au niveau de la biogenèse du lysosome, des défauts post-traductionnels des enzymes lysosomales ou même des défauts au niveau des protéines membranaires peuvent être à l'origine d'un fonctionnement inadéquat d'une enzyme lysosomale (Sun, 2018). Pour plusieurs de ces maladies, les liens entre l'accumulation des substrats au niveau du lysosome et les manifestations cliniques demeurent nébuleux. L'une des hypothèses est que l'accumulation des substrats affecte la stabilité, l'intégrité et la perméabilité du lysosome ce qui a pour effet de relâcher les hydrolases ainsi que les substrats accumulés dans le cytosol de la cellule. Bien que les composantes potentiellement cytotoxiques relâchées à partir du lysosome ne représentent qu'une faible proportion du contenu lysosomal, celles-ci seraient tout de même suffisantes pour entraîner des changements dans les processus cellulaires (Lim *et al.*, 2015). Une autre hypothèse suggère qu'une accumulation de substrat au niveau du lysosome affecte le transport cellulaire vers le lysosome ou à partir de celui-ci (Lim *et al.*, 2015). Bref, il existe plusieurs hypothèses, mais pas encore de réponses exactes sur les processus biochimiques sous-jacents de ces maladies caractérisées par une grande variabilité phénotypique et génotypique, de même que des atteintes multisystémiques (Kadali *et al.*, 2014).

### ***2.3 La classification des maladies lysosomales***

Nos connaissances entourant les maladies lysosomales, les mécanismes pathologiques ainsi que les aspects moléculaires demeurent relativement limités. Il y a encore beaucoup d'éléments à découvrir et à comprendre. Effectivement, lorsque nous nous intéressons à la chronologie des découvertes des mécanismes moléculaires sous-jacents à la maladie de Gaucher par exemple, une maladie qui a pourtant été décrite pour la première fois il y a près de 140 ans, il est possible d'observer que des éléments majeurs tels que le déficit de la glucocérébrosidase à l'origine de la maladie ou bien le lien entre la maladie de Gaucher et la maladie Parkinson ont été mieux compris que beaucoup plus tard soit en 1965 et en 1996 respectivement (Brady *et al.*, 1965 ; Neudorfer *et al.*, 1996; Do *et al.*, 2019). Ainsi, à partir du moment de la découverte et de la compréhension de la composante génétique et plus précisément des maladies lysosomales comme classe de maladies métaboliques héréditaires, nos connaissances dans ce domaine ont connu une croissance exponentielle. Évidemment, ces nouvelles connaissances impliquent inévitablement des changements ou des

réorientations majeurs en cours de route. C'est notamment le cas au niveau de la classification des maladies lysosomales. À l'origine, ces désordres étaient classifiés en fonction du substrat accumulé (Futerman et Meer, 2004). Ce type de classification séparait donc les maladies lysosomales en 5 groupes distincts soit: 1) les sphingolipidoses qui comprennent notamment la maladie de Gaucher, 2) les mucopolysaccharidoses, 3) les oligosaccharidoses et les glycoprotéinoses, 4) les maladies causées par un défaut des protéines intégrales membranaires et finalement 5) un groupe classifié comme « autres » (Tableau 1) (Futerman et Meer, 2004, Eaton *et al.*, 2019).

**Tableau 1.** Classification des maladies lysosomales en fonction du substrat accumulé

<b>Sphingolipidoses</b>		
<b>Maladies</b>	<b>Protéines déficientes</b>	<b>Substrats accumulés</b>
Maladie de Fabry Maladie de Gaucher Maladie de Niemann-Pick A/B GM1 gangliosides GM2 gangliosides (Tay-Sachs) GM2 gangliosides (Sandhoff)	$\alpha$ -Galactosidase A $\beta$ -Glucosidase Sphingomyélinase $\beta$ -Galactosidase $\beta$ -Hexosaminidase A $\beta$ -Hexosaminidase A/B	Glycosphingolipides Glucosylcéramide Sphingomyéline GM1 ganglioside GM2 ganglioside et glycosphingolipides GM2 ganglioside et glycosphingolipides
<b>Mucopolysaccharidoses</b>		
<b>Maladies</b>	<b>Protéines déficientes</b>	<b>Substrats accumulés</b>
MPS I (Hurler, Scheie, H-S) MPS II (Hunter) MPS IIIA (Sanfilippo) MPS IIID (Sanfilippo) MPS IVA (Morquio-A) MPS IVB (Morquio-B) MPS VI (Maroteaux-Lamy) MPS VII (Sly)	$\alpha$ -Iduronidase Iduronate-2-sulfatase Héparan N-sulfatase N-Acetylglucosamine-6-sulfatase Galactose-6-sulfatase $\beta$ -Galactosidase Arylsulfatase B $\beta$ -Glucuronidase	Dermatan sulfate et héparan sulfate Dermatan sulfate et héparan sulfate Héparan sulfate Héparan sulfate Kératan sulfate et chondroïtine sulfate Kératan sulfate Dermatan sulfate Dermatan sulfate, héparan sulfate et chondroïtine sulfate
<b>Oligosaccharidoses et les glycoprotéinoses</b>		
<b>Maladie</b>	<b>Protéines déficientes</b>	<b>Substrats accumulés</b>
Maladie de Pompe	$\alpha$ -Glucosidase	Glycogène
<b>Défaut des protéines intégrales membranaires</b>		
<b>Maladies</b>	<b>Protéines déficientes</b>	<b>Substrats accumulés</b>
Cystinose Maladie de Danon Niemann-Pick de type C	Cystinosine LAMP2 NPC 1 et 2	Cystine Glycogène Cholestérol et sphingolipides
<b>Autres</b>		
<b>Maladies</b>	<b>Protéines déficientes</b>	<b>Substrats accumulés</b>
Galactosialidose Mucolipidoses type 2  Déficit multiple en sulfatases Céroïde-lipofusinoïse neuronale 1 Céroïde-lipofusinoïse neuronale 2 Céroïde-lipofusinoïse neuronale 3	Cathepsine A N-acétylglucosamine-1-phosphotransférase  FGE Palmitoylthioestérase-1 CLN2 Transporteur d'arginine	Sialyloligosaccharides Oligosaccharides, glycosaminoglycans et lipides Sulfatides Lipofuscine Lipofuscine Lipofuscine

De fait, ce type de classification reflétait en quelque sorte la vision que le lysosome a pour seule et unique fonction de dégrader les macromolécules (Parenti *et al.*, 2021). Ainsi, en se basant sur ce dogme, il était logique que toutes les classes de molécules soient orientées vers les aspects biochimiques des différentes maladies. Bien que cette classification permettait de regrouper un certain nombre de maladies lysosomales ayant des bases moléculaires relativement proches, son défaut principal était lié au fait qu'une quantité trop importante de

maladies, sans aucun lien entre elles et ayant des bases moléculaires complètement différentes se trouvaient dans la classe dite « Autres » (Futerman et Meer, 2004).

Toutefois, en raison d'une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents aux pathologies lysosomales, c'est plutôt un second type de classification, qui tient également en compte les défauts moléculaires, qui est davantage utilisé de nos jours (Winchester, 2012; Parenti *et al.*, 2021). Ainsi, dans cette nouvelle classification, les maladies lysosomales sont plutôt divisées en 8 classes soit les 1) sphingolipidoses ainsi que les défauts d'activation des sphingolipides, 2) les mucopolysaccharidoses, 3) les glycoprotéinoses et les oligosaccharidoses, 4) les autres défauts enzymatiques dont fait partie la pycnodysostose, maladie caractérisée par la déficience d'une protéase impliquée dans le clivage des protéines de la matrice osseuse, 5) les défauts post-traductionnels des enzymes lysosomales, 6) les défauts des membranes lysosomales et défauts de transport, 7) les céroïdes-lipofusinoses neuronales et finalement, 8) les défauts de la biogenèse du lysosome et des organelles reliées au lysosome (Tableau 2) (Aghili *et al.*, 2017).

**Tableau 2.** Classification des maladies lysosomales en fonction du substrat accumulé et du défaut moléculaire sous-jacent à la pathologie.

<b>Sphingolipidoses incluant les défauts des activateurs des sphingolipides</b>		
<b>Maladies</b>	<b>Enzyme/protéine déficiente</b>	<b>Substrats accumulés</b>
Maladie de Fabry Maladie de Gaucher Maladie de Niemann-Pick A/B GM1 gangliosides Maladie de Tay-Sachs Maladie Sandhoff	$\alpha$ -Galactosidase A Glucocérébrosidase Sphingomyélinase $\beta$ -Galactosidase $\beta$ -Hexosaminidase A $\beta$ -Hexosaminidase A/B	Glycosphingolipides Glucosylcéramide Sphingomyéline GM1 ganglioside GM2 ganglioside et glycosphingolipides GM2 ganglioside et glycosphingolipides
<b>Mucopolysaccharidoses</b>		
<b>Maladies</b>	<b>Enzyme/protéine déficiente</b>	<b>Substrats accumulés</b>
Maladie de Hurler, H-S, Scheie Maladie de Hunter Maladie de Sanfilippo Maladie de Morquio-A Maladie de Morquio-B Maladie de Maroteaux-Lamy	$\alpha$ -Iduronidase Iduronate-2-sulphatase Héparan N-sulfatase Galactose-6-sulfatase $\beta$ -Galactosidase Arylsulfatase B	Dermatan sulfate et héparan sulfate Dermatan sulfate et héparan sulfate Héparan sulfate Kératan sulfate et chondroïtine sulfate Kératan sulfate Dermatan sulfate
<b>Oligosaccharidoses et les glycoprotéinoses</b>		
<b>Maladies</b>	<b>Enzyme/protéine déficiente</b>	<b>Substrats accumulés</b>
Maladie de Pompe Aspartylglucosaminémie Fucosidose $\alpha$ -Mannosidose	$\alpha$ -Glucosidase Aspartylglucosaminidase $\alpha$ -L-Fucosidase $\alpha$ -Mannosidase	Glycogène Glycosyl-asparagines Oligos/glycopeptides Oligonucléotides
<b>Autres défauts enzymatiques</b>		
<b>Maladies</b>	<b>Enzyme/protéine déficiente</b>	<b>Substrats accumulés</b>
Pycnodysostose	Cathepsine K	Collagène et protéines du système osseux
<b>Défauts post-traductionnels des enzymes lysosomales</b>		
<b>Maladies</b>	<b>Enzyme/protéine déficiente</b>	<b>Substrats accumulés</b>
Mucopolipidose II $\alpha/\beta$ / III $\alpha/\beta$	N-acétylglucosamine-1-phosphotransférase	Oligonucléotides, GAGs, lipides
<b>Défaut des protéines membranaires</b>		
<b>Maladies</b>	<b>Enzyme/protéine déficiente</b>	<b>Substrats accumulés</b>
Cystinose Maladie de Danon Maladie Niemann-Pick de type C	Cystinosine LAMP2 NPC 1 et 2	Cystine Glycogène Cholestérol et sphingolipides
<b>Céroïde-lipofuscinose neuronale</b>		
<b>Maladies</b>	<b>Enzyme/protéine déficiente</b>	<b>Substrats accumulés</b>
Céroïde-lipofuscinose neuronale 1 Céroïde-lipofuscinose neuronale 2	Palmitoylthioestérase-1 Tripeptidyl peptidase-1	Lipofuscine Lipofuscine
<b>Défaut dans la biogenèse du lysosome et les organelles associées au lysosome</b>		
<b>Maladies</b>	<b>Enzyme/protéine déficiente</b>	<b>Substrats accumulés</b>
Syndrome de Griscelli type 1 Syndrome de Griscelli type 2	Myosine 5A Rab27A	Granules de mélanine Granules de mélanine

Ce type de classification permet donc de regrouper des maladies qui sont plus similaires au niveau mécanistique en plus d'éviter des ambiguïtés dans le cas de maladies qui ne répondent pas totalement aux caractéristiques du groupe auquel elles appartenaient précédemment ou qui pourraient potentiellement appartenir à plusieurs groupes. Effectivement, l'ancienne classification regroupait certaines maladies dont les aspects moléculaires, biochimiques et cliniques étaient significativement différents. Citons l'exemple de deux maladies comme la mucopolysaccharidose type 2 neuronale qui survient en raison d'une déficience enzymatique présente au niveau du Golgi, empêchant alors les hydrolases acides d'être acheminées au niveau du lysosome (Edmiston *et al.*, 2018) et la céréoïde-lipofuscinose neuronale 1 qui est causée par une déficience de la palmitoylthioestérase-1, une enzyme lysosomale impliquée dans la dégradation de groupements thioesters (Chandra *et al.*, 2015) appartenaient à la même classe. Donc, selon l'ancienne classification, une maladie basée sur un défaut post-traductionnel des hydrolases acides au niveau du Golgi se trouve dans la même catégorie qu'une maladie résultant d'un défaut d'une seule enzyme lysosomale. Ainsi, avec la nouvelle classification, la mucopolysaccharidose type 2 (OMIM 252500) appartient au groupe des maladies résultant d'un défaut post-traductionnel des enzymes lysosomales alors que la céréoïde-lipofuscinose neuronale 1 appartient au groupe des céréoïdes-lipofuscinoses neuronales, ce qui est nettement plus représentatif des défauts moléculaires à la base de la pathologie.

## PARTIE 1

### **Étude métabolomique pour la découverte de nouveaux biomarqueurs pour la maladie de Gaucher de type 1**

#### **3 La maladie de Gaucher**

##### ***3.1 Les aspects moléculaires***

La maladie de Gaucher est une maladie héréditaire de transmission autosomique récessive causée par une déficience de l'enzyme glucocérébrosidase suite à une mutation du gène *GBA* (Elstein *et al.*, 2022). Ce gène est localisé sur le chromosome 1 à la position 1q22 et comporte 11 exons entrecoupés par 10 introns sur une longueur de 7,6 kilobases de séquence génétique (Barkhuizen *et al.*, 2017). Au total, plus de 450 variants pathogéniques différents entraînant la maladie de Gaucher ont été observés, incluant des mutations non-sens, des mutations de changement de cadre de lecture, des mutations faux-sens, de même que des insertions et

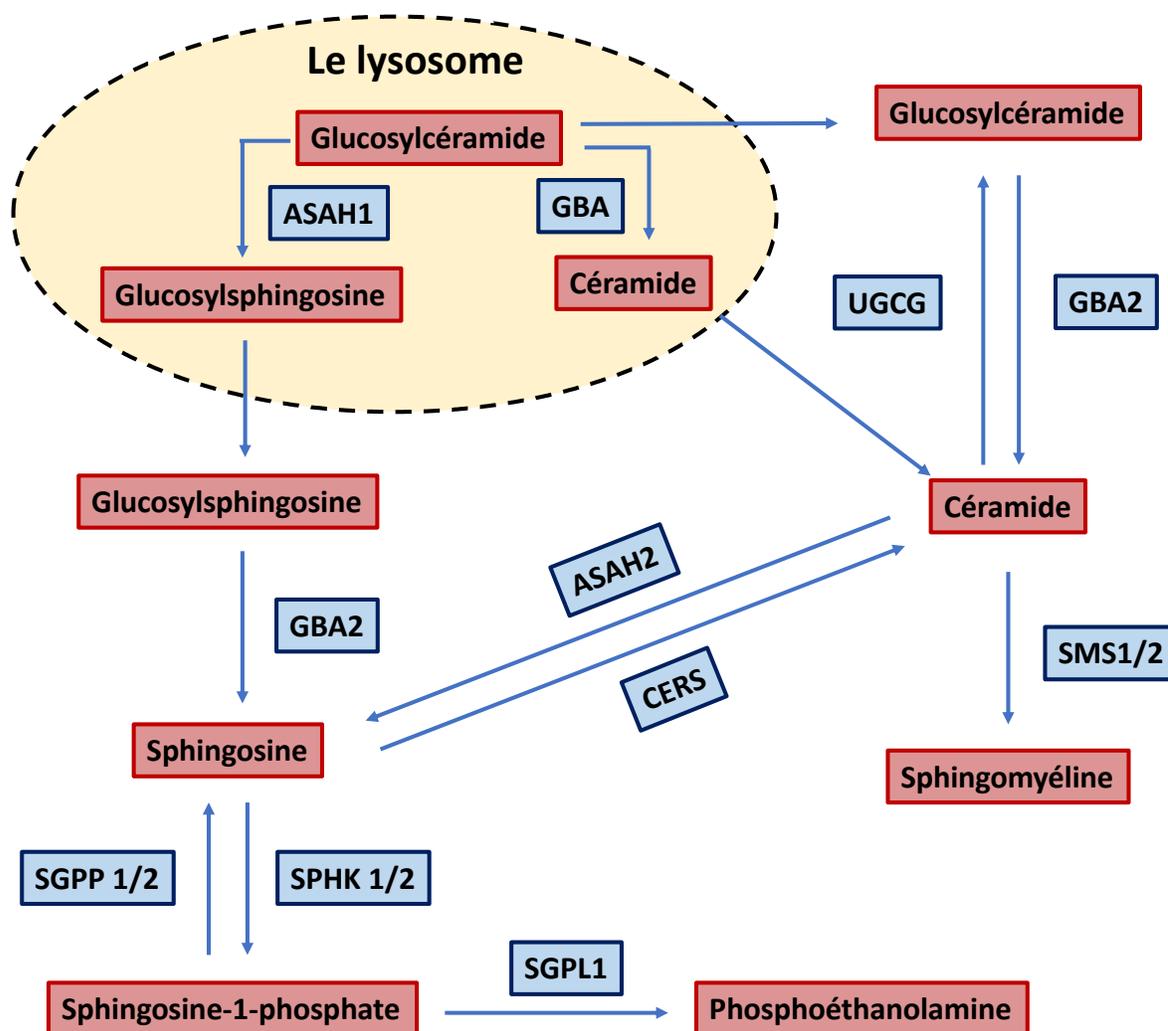


délétions (Phetthong *et al.*, 2021). Toutefois, les mutations faux-sens p.N370S et p.L444P qui sont localisées au niveau des exons 9 et 10 demeurent les substitutions pathogéniques les plus fréquemment observées (Lal et Sidransky, 2017). La mutation p.N370S est particulièrement fréquente aux États-Unis, en Europe ainsi qu'en Israël et est exclusivement associée à un phénotype Gaucher de type 1 (Lal et Sidransky, 2017). La mutation p.L444P quant à elle est retrouvée partout à travers le monde et, lorsque présente de manière homozygote, elle est souvent associée à une forme neuronopathique de la maladie (Do *et al.*, 2019). Toutefois, bien que certaines mutations semblent être associées à un phénotype particulier, il est faux de croire qu'il est possible de prédire le phénotype du patient en se basant uniquement sur le génotype de celui-ci. Effectivement, pour la mutation homozygote p.L444P, bien que celle-ci soit souvent associée à une forme neuronopathique de la maladie, des patients dits atténués (Gaucher type 1) ont également été observés (Goker-Alpan *et al.*, 2005). D'ailleurs, au cours de la même étude, des patients ayant les mêmes mutations avaient pourtant des niveaux d'activité enzymatique différents suggérant la présence de gènes modificateurs qui influencent le phénotype (Goker-Alpan *et al.*, 2005).

### **3.2 Les aspects biochimiques**

La glucocérébrosidase (GCCase) est une enzyme composée de 497 acides aminés synthétisés au niveau du réticulum endoplasmique rugueux et ne devient active qu'une fois arrivée au niveau du lumen acide du lysosome (Elstein *et al.*, 2022). Contrairement à la majorité des hydrolases acides, la GCCase n'est pas dirigée vers les lysosomes via un récepteur mannose-6-phosphate, mais plutôt par la protéine intégrale LIMP2 associée au lysosome (Do *et al.*, 2019). Une fois arrivée au lysosome, la GCCase doit alors interagir avec une protéine activatrice nommée saposine C pour ensuite pouvoir procéder à son activité catalytique visant à hydrolyser des groupements glucidiques à partir du glucosylcéramide afin de produire une molécule de glucose et une céramide (Liou *et al.*, 2019). Toutefois, lorsque le lysosome n'est pas en mesure d'exécuter sa fonction de dégradation du glucosylcéramide en raison de la déficience en GCCase ou de son activateur, la saposine C, deux voies métaboliques s'offrent au lysosome pour tenter de diminuer l'accumulation en glucosylcéramide (Gb<sub>1</sub>). Dans un premier temps, il est possible qu'une certaine quantité de Gb<sub>1</sub> s'échappe du lysosome et se retrouve dans le cytosol. Celui-ci devient alors le substrat d'une glucocérébrosidase cytosolique également connu sous le nom de glucocérébrosidase 2 (GBA2) (Mistry *et al.*,

2014). Cette dernière possède une activité hydrolytique très similaire à la GCCase lysosomale et sera donc en mesure de catalyser l'hydrolyse du Gb<sub>1</sub> en céramide et en glucose (Mistry *et al.*, 2014). Par la suite, selon les besoins de la cellule, la céramide peut être transformée en sphingomyéline sous l'action de la sphingomyéline synthase (SMS1 ou SMS2) (Stirnemann *et al.*, 2017). L'autre option qui s'offre au lysosome pour tenter de réduire la concentration lysosomale de Gb<sub>1</sub> est la déacylation de ce dernier via l'acylsphingosine déacylase 1 (ASAH1), une enzyme lysosomale. Le produit de cette réaction est le glucosylsphingosine ou lyso-Gb<sub>1</sub>. En raison de l'hydrophobicité réduite du lyso-Gb<sub>1</sub>, celui-ci s'échappe plus facilement du lysosome que le Gb<sub>1</sub> pour se retrouver dans le cytosol. Une fois au niveau du cytosol, le lyso-Gb<sub>1</sub> peut être métabolisé en sphingosine sous l'action de la GBA2 (Mistry *et al.*, 2014). Ensuite, selon les besoins cellulaires, cette sphingosine peut être transformée en céramide sous l'action de la céramide synthase (CERS) ou en sphingosine-1-phosphate sous l'action de la sphingosine kinase 1 (SPHK1) (Stirnemann *et al.*, 2017; Kalinichenko *et al.*, 2018). Ainsi, bien qu'il existe différentes alternatives disponibles pour la cellule afin de tenter de réduire les concentrations de Gb<sub>1</sub> suite à une déficience de la GCCase, il est faux de croire que ces autres voies sont suffisantes pour éliminer tout le substrat accumulé (Deevska et Nikolova-Karakashian, 2017; Kalinichenko *et al.*, 2018). Effectivement, malgré l'existence de ces voies alternatives, le Gb<sub>1</sub> demeure augmenté dans les liquides biologiques de patients Gaucher, tout comme le lyso-Gb<sub>1</sub>, la sphingosine et la sphingosine-1-phosphate tel que présenté à la Figure 1. Ainsi, ces voies démontrent que la maladie de Gaucher n'implique pas uniquement une enzyme et un substrat. Cette enzyme déficiente ainsi que l'accumulation de son substrat font en sorte de perturber également d'autres voies métaboliques connexes, démontrant la complexité des maladies métaboliques (Mistry *et al.*, 2014).



**Figure 1.** Les voies alternatives de dégradation du glucosylcéramide. En rouge sont indiqué les substrats des réactions et en bleu les enzymes impliquées. (Deevska et Nikolova-Karakashian, 2017; Kalinichenko *et al.*, 2018).

### 3.3 Les mécanismes pathologiques

Un déficit enzymatique au niveau de la glucocérébrosidase entraîne une accumulation de glycosphingolipides, et plus particulièrement de glucosylcéramide (Gb<sub>1</sub>) dans les lysosomes des cellules du système réticulo-endothélial et plus spécifiquement au niveau des macrophages (Nguyen, 2019). Cette lignée cellulaire est particulièrement touchée puisque les macrophages sont impliqués dans la dégradation des cellules érythroïdes ainsi que les leucocytes qui contiennent d'importantes quantités de glucosylcéramide (Stirnemann *et al.*, 2017). Cette accumulation de Gb<sub>1</sub> dans les macrophages entraîne alors d'importantes modifications physiologiques et morphologiques au niveau de ceux-ci. Ces changements ont

pour conséquence de transformer les macrophages en cellules Gaucher (Stirnemann *et al.*, 2017). Ces cellules sont typiquement élargies, elles possèdent un noyau excentré ainsi qu'une apparence similaire à du papier mâché (Stirnemann *et al.*, 2017). Ces cellules infiltrent différents tissus, dont la moelle osseuse, la rate, ainsi que le foie, ce qui a pour résultat une hépatosplénomégalie, une fragilisation osseuse, une modification du microenvironnement médullaire ainsi qu'une cytopénie (Nguyen, 2019). Bien que les voies de signalisation par lesquelles se produisent ces mécanismes demeurent nébuleuses à l'heure actuelle, l'hypothèse la plus répandue est que suite à l'infiltration des cellules Gaucher au niveau de différents tissus, celles-ci relâchent un ensemble de facteurs, soit des cytokines et des chimiokines qui créent une boucle inflammatoire en continu ce qui altère ultimement le microenvironnement cellulaire. Ceci résulte alors en un déséquilibre des processus cellulaires (Mucci et Rozenfeld, 2015). Ce phénomène a d'ailleurs été démontré dans une étude par Lecourt *et al.* en 2012 au cours de laquelle des cellules souches du mésenchyme et des monocytes ont été exposées à du conduritol- $\beta$ -époxyde, un inhibiteur de glucocérébrosidase. Les auteurs ont alors observé une augmentation de l'activité des ostéoclastes ainsi qu'une augmentation de la résorption osseuse (Lecourt *et al.*, 2012). Cette stimulation de l'activité des ostéoclastes serait due à l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  ainsi qu'à l'activité des cellules T du système immunitaire (Mucci *et al.*, 2012). Une autre hypothèse est que l'accumulation du lyso-Gb<sub>1</sub>, substrat potentiellement toxique produit par une voie alternative de dégradation du Gb<sub>1</sub>, pourrait être à l'origine de l'atteinte des cellules hématopoïétiques et hépatocytaires ainsi que d'une hyperstimulation lymphocytaire entraînant alors une importante réaction immunitaire ainsi qu'une toxicité sur les cellules osseuses (Nguyen *et al.*, 2019). D'ailleurs, il a été observé que le lyso-Gb<sub>1</sub> s'accumule au niveau du cerveau chez les patients atteints de la forme plus sévère de la maladie avec présence d'atteintes neurologiques (Orvisky *et al.*, 2002). À l'inverse, chez les patients atteints de la forme plus atténuée de la maladie sans atteinte neurologique, cette accumulation n'est pas observée (Elstein *et al.*, 2017). Il est également important de mentionner que les cellules Gaucher ne s'infiltrent pas au niveau du cerveau, ce qui semble pointé vers le lyso-Gb<sub>1</sub> comme initiateur d'une cascade pathologique au niveau de l'organisme (Orvisky *et al.*, 2002).

### **3.4 Les manifestations cliniques**

La maladie de Gaucher est une maladie très hétérogène avec un vaste spectre clinique. Certains patients sont atteints d'une forme asymptomatique alors qu'à l'autre extrémité du spectre, la forme infantile de la maladie peut s'avérer létale en période néonatale (Degnan *et al.*, 2019). Il existe 3 formes de la maladie; le type 1 (forme non-neuronopathique) qui correspond à la forme atténuée de la maladie et qui comporte peu ou pas d'atteintes neurologiques, le type 3 (forme neuronopathique chronique) qui correspond à une forme intermédiaire de la maladie avec atteintes neurologiques qui apparaissent de manière plus tardive et finalement le type 2 (forme neuronopathique aiguë), soit la forme sévère de la maladie avec d'importantes manifestations neurologiques très tôt dans la vie de l'enfant (Stirnemann *et al.*, 2017; Schiffmann *et al.*, 2020). Toutefois, ces types ne sont pas tous clairement définis. De fait, dans le cas de la maladie de Gaucher, il s'agit d'une seule maladie, mais avec un continuum entre ces différents phénotypes (Abdelwahab *et al.*, 2017).

#### **3.4.1 Les manifestations cliniques de la maladie de Gaucher type 1**

L'âge médian de l'apparition des premiers symptômes chez les patients atteints de la maladie de Gaucher de type 1 est de 15 ans (0–77 ans) alors que l'âge médian au moment du diagnostic est de 22 ans (0–84 ans) (Stirnemann *et al.*, 2012). L'infiltration de cellules Gaucher au niveau de la rate et du foie résulte souvent en une splénomégalie (près 90% des cas) et une hépatomégalie (près de 80% des cas) (Nguyen *et al.*, 2019). La splénomégalie, souvent associée à un hypersplénisme, combinée à l'infiltration également importante des cellules Gaucher au niveau de la rate entraîne généralement une cytopénie (Linari et Castaman, 2015). La thrombopénie (modérée à grave dans 60% des cas) engendre l'apparition de nombreuses ecchymoses ainsi que des saignements fréquents (Linari et Castaman, 2015). Dans certains cas, il est également possible que cette thrombopénie soit associée à une altération de la fonction des thrombocytes (thrombopathie), ce qui peut aggraver les troubles associés à la thrombopénie (Linari et Castaman, 2015). Les anémies sont également fréquentes chez les patients Gaucher (37% des cas) (Nguyen *et al.*, 2019). En plus de celle-ci, les patients Gaucher présentent souvent d'autres atteintes hématologiques tels qu'une coagulopathie, une déficience en vitamine B<sub>12</sub> ainsi qu'une hyperferritinémie (Baris *et al.*, 2014). Au niveau du système immunitaire, les patients Gaucher sont à risque de développer des gammopathies monoclonales ainsi que des myélomes multiples (Baris *et al.*,

2014). Effectivement, il a aussi été noté que chez les patients Gaucher, le risque de développer des myélomes multiples est augmenté par un facteur de 5,9 (Baris *et al.*, 2014). Des études sur un modèle animal ont également révélé que l'incidence des maladies auto-immunitaires semble augmentée chez les patients Gaucher (Rosenbloom *et al.*, 2005). Au niveau des atteintes osseuses, plus de 63% des patients présentent différents types de douleurs associées à ceux-ci et dans plus de 33% des cas, ces atteintes osseuses se transforment en crises douloureuses (Baris *et al.*, 2014). Des radiographies révèlent souvent une déformation des fémurs en forme de flacon Erlenmeyer en raison d'un élargissement au niveau métaphysodiaphysaire des os longs dus à un défaut de remodelage osseux (Baris *et al.*, 2014). Des atteintes secondaires telles qu'une ostéo-arthrite, un infarctus médullaire, une ostéopénie, l'ostéoporose ou des problèmes de croissance sont tous des complications que peuvent développer les patients Gaucher en raison des atteintes osseuses primaires (Baris *et al.*, 2014). D'ailleurs, il est important de mentionner que même chez les patients asymptomatiques, des atteintes osseuses, bien que non contraignantes, peuvent être observées en imagerie (Baris *et al.*, 2014). Finalement, bien qu'en théorie les patients Gaucher de type 1 ne présentent pas d'atteintes neurologiques, il est tout de même important de mentionner qu'entre 5% à 7% des personnes atteintes développeront la maladie de Parkinson avant l'âge de 70 ans alors que 9% à 12% développeront la maladie avant l'âge de 80 ans (Baris *et al.*, 2014). Ainsi, les patients Gaucher ont donc 26 fois plus de chance de développer la maladie de Parkinson que la population générale (Riboldi et Fonzo, 2019). Il est également important de prendre note que la sévérité de l'atteinte au niveau de chacun des différents organes est très variable d'un patient à l'autre, même pour des patients qui partagent un bagage génétique relativement similaire tels que des frères ou des sœurs (Nguyen *et al.*, 2019).

#### ***3.4.2 Les manifestations cliniques de la maladie de Gaucher type 2***

Le type 2 de la maladie de Gaucher correspond à la forme périnatale létale de la maladie. Généralement, les nouveau-nés exhibent une importante hépatosplénomégalie, une pancytopénie ainsi que différentes atteintes neurologiques sévères comme une paralysie oculomotrice horizontale ou des troubles de la déglutition (Baris *et al.*, 2014). À ceux-ci peuvent s'ajouter des atteintes musculosquelettiques telles que le trismus (qui est une contraction constante et involontaire des muscles de la mâchoire), une hypertonie pyramidale

(contraction musculaire involontaire des muscles agonistes et antagonistes) ainsi qu'une rigidité extrapyramidale (tremblements ou mouvements rares et généralement lents) (Stirnemann *et al.*, 2017). Les nouveau-nés atteints de cette forme de la maladie décèdent généralement avant la 3<sup>e</sup> année de vie à cause d'une grave atteinte pulmonaire (Nguyen *et al.*, 2019). Dans certains cas exceptionnellement rares de la maladie, les nouveau-nés peuvent décéder à la naissance ou même in utero en raison d'atteinte spécifique telle que l'anasarque fœto-placentaire (Nguyen *et al.*, 2019).

### **3.4.3 Les manifestations cliniques de la maladie de Gaucher type 3**

La maladie de Gaucher de type 3 correspond à une forme intermédiaire de la maladie avec un début des symptômes entre la jeune enfance et l'adolescence (Lal et Sidransky, 2017). Toutefois, étant une maladie très hétérogène et variable d'un cas à l'autre, il est possible que chez certains patients l'apparition des signes et symptômes se produise beaucoup plus tard (Schiffmann *et al.*, 2020). Pour certains patients Gaucher de type 3, il est possible que les seules manifestations cliniques soient une organomégalie faible à modérée combinée à une épilepsie myoclonique alors que d'autres souffriront d'importantes manifestations viscérales, de sévères atteintes osseuses ainsi que de paralysie supranucléaire progressive (Schiffmann *et al.*, 2020). De manière générale, les capacités non verbales sont plus touchées alors que les capacités dites verbales semblent être épargnées par la maladie (Lal et Sidransky, 2017). Ainsi, un syndrome cérébelleux, une encéphalopathie progressive, des troubles du comportement, de la démence, des difficultés d'apprentissage, une capacité intellectuelle sous la moyenne ainsi qu'un retard de développement sont tous des atteintes neurologiques pouvant être observées chez les personnes atteintes de la maladie de Gaucher de type 3 (Lal et Sidransky, 2017). En plus de ces atteintes neurologiques, il est également possible, pour les patients atteints de la forme neuronopathique de la maladie de Gaucher de souffrir d'hypertension pulmonaire ainsi que d'atteintes cardiaques telles que la calcification de l'aorte ou bien la calcification des valves cardiaques (Baris *et al.*, 2014).

### **3.5 L'épidémiologie**

L'incidence de la maladie de Gaucher est très variable à travers le monde. Toutefois, des études épidémiologiques estiment celle-ci aux alentours de 1/40 000 à 1/60 000 naissances, ce qui correspond à l'incidence la plus élevée parmi toutes les maladies lysosomales (Stirnemann *et al.*, 2017; Motta *et al.*, 2021). Ce qui est particulièrement étonnant avec la

maladie de Gaucher est le fait que son incidence peut grimper jusqu'à 1/800 naissances chez les Juifs ashkénazes, une communauté particulièrement touchée par la maladie (Stirnemann *et al.*, 2017). D'ailleurs, le taux de porteur de la maladie dans cette communauté est estimé à 1 :17 (Dinur *et al.*, 2022).

De plus, il existe une forte disparité entre l'incidence de chacune des différentes formes de la maladie. Effectivement, 95% des cas de maladie de Gaucher sont de type 1, près de 5% sont de type 3 et finalement, moins de 1% des patients sont affectés par le type 2 (Stirnemann *et al.*, 2017; Motta *et al.*, 2021).

### ***3.6 Les marqueurs biochimiques de la maladie de Gaucher***

Avant d'élaborer sur les marqueurs biochimiques reliés à la maladie de Gaucher, il est important de saisir ce que sont les biomarqueurs et ce qu'ils nous apportent comme information. Tout d'abord, le terme biomarqueur fait référence à une sous-classe de signes médicaux objectifs pouvant être quantifiés de manière juste et reproductible. Ces marqueurs biologiques peuvent être des indicateurs de plusieurs éléments tels que des procédés biologiques considérés normaux pour l'organisme, des procédés pathologiques ou même des réponses suite à un traitement (Biomarker Working Group, 2001). L'Organisation mondiale de la santé (OMS) quant à elle considère les biomarqueurs comme étant « toute mesure pouvant être le reflet d'une interaction entre un système biologique et un danger potentiel, qu'il soit chimique, physique ou biologique » (OMS, 1993). Certains biomarqueurs sont plus fiables que d'autres puisqu'ils sont plus sensibles, plus représentatifs de la maladie et simples à quantifier. D'ailleurs, certains groupes de recherche se sont interrogés à savoir quelles étaient les caractéristiques d'un biomarqueur idéal. Ceux-ci sont arrivés à la conclusion que le biomarqueur idéal doit pouvoir être quantifié de manière rapide, fiable, reproductible et peu dispendieuse. Il doit être présent à un stade précoce de la maladie et ce, dans une matrice qui peut être facilement accessible et de manière non invasive. Ce biomarqueur idéal doit également corrélérer avec la sévérité de l'atteinte afin de fournir une image juste et représentative de l'état de l'organisme, du tissu ou de la cellule (Cox, 2006). Ce ne sont pas tous les biomarqueurs qui répondent à toutes ces conditions, ce qui fait en sorte que pour certaines maladies, lorsqu'il existe plusieurs biomarqueurs, certains sont davantage utilisés que d'autres. Les biomarqueurs associés à la maladie de Gaucher ne font pas exception à



cette règle. Aussi, il faut se rappeler qu'il existe aussi des biomarqueurs reliés aux organes atteints chez les patients Gaucher (Simpson *et al.*, 2014; Hughes *et al.*, 2019). Mais, dans le cas qui nous concerne et dans le but visé par cette thèse, nous nous attarderons principalement aux biomarqueurs biochimiques de la maladie de Gaucher.

Depuis 1994, le biomarqueur le plus souvent utilisé pour la maladie de Gaucher est la chitotriosidase. Celle-ci est directement sécrétée par les cellules Gaucher (macrophages) qui sont à l'origine de la maladie (Raskovalova *et al.*, 2017). Toutefois, ce biomarqueur comporte de nombreuses lacunes bien documentées notamment au niveau de la spécificité ainsi que de son utilité diagnostique (Smid *et al.*, 2016). Effectivement, dans certaines pathologies, dont l'athérosclérose, les cancers et même le paludisme, la présence de macrophages activés peut entraîner une modification de l'expression de la chitotriosidase (Kaddah *et al.*, 2017; Thein *et al.*, 2017; Yap *et al.*, 2020). Bien que ces niveaux soient généralement plus faibles que chez les patients Gaucher, la présence de ce composé n'est pas spécifique à la maladie de Gaucher. L'autre problématique avec la chitotriosidase provient de la variabilité de l'expression de celle-ci en raison de polymorphismes présents dans la population. Effectivement, certains polymorphismes tels que p.Glu74Lys, p.Gly102Ser, p.Gly354Arg, p.Ala442Val sont connus pour moduler l'activité de la chitotriosidase tout comme la duplication de la région 1049 à 1072 qui lorsque présente de manière homozygote, entraîne la perte intégrale de l'activité enzymatique de celle-ci (Giraldo *et al.*, 2018). D'ailleurs, cette duplication est présente à l'état homozygote chez 6% de la population (Raskovalova *et al.*, 2021). Il existe donc une grande variabilité de l'activité basale de cette enzyme au niveau de la population ce qui limite son utilité diagnostique. Malgré tout, une fois le taux basal établi chez un patient, l'activité de la chitotriosidase peut s'avérer être une aide précieuse pour le suivi des patients (Giraldo *et al.*, 2018).

Le CHI3L1 est un biomarqueur d'inflammation dont la concentration augmente lors de pathologies de types auto-immunes (Jian *et al.*, 2018). Cette glycoprotéine impliquée dans la voie de signalisation ATK stimule l'expression de médiateurs pro-inflammatoires qui pourraient potentiellement être impliqués dans la régulation de certaines fonctions au niveau des macrophages (Jian *et al.*, 2018). Ainsi, le CHI3L1 pourrait être utile pour le suivi des

patients Gaucher en raison de l'inflammation généralisée chez ceux-ci (Jian *et al.*, 2018). Toutefois, en raison de la non-spécificité de l'expression du CHI3L1, le diagnostic s'avère très difficile.

Le « CC chemokine ligand 18 », un autre marqueur d'inflammation initialement nommé « Pulmonary and Activation-Regulated Chemokine » (CCL18/PARC), est une chimiokine produite par les lymphocytes T et les monocytes. Il a été observé que la variation de l'expression du CCL18/PARC est similaire à celle de la chitotriosidase (Boot *et al.*, 2004). Il est toutefois important de mentionner que la chitotriosidase est un biomarqueur plus sensible à refléter les effets d'un traitement que le CCL18/PARC (Giraldo *et al.*, 2018). Effectivement, dans une étude publiée par Giraldo *et al.*, en 2011, les auteurs ont observé que dans un groupe de 23 patients Gaucher, 6 mois après l'arrêt d'un traitement par thérapie enzymatique de remplacement (TER), les niveaux de chitotriosidase avaient augmenté de 135% alors que les niveaux de CCL18/PARC avaient augmenté de seulement 8% (Giraldo *et al.*, 2011). Au cours de la même étude, les auteurs ont observé que chez les patients dont la TER a été réduite de moitié pour une période de 6 mois, les niveaux de chitotriosidase avaient augmenté de 43% alors que les niveaux de CCL18/PARC sont demeurés sensiblement les mêmes (Giraldo *et al.*, 2011). Toutefois, même si la chitotriosidase semble être un meilleur biomarqueur pour évaluer les effets du traitement, le CCL18/PARC aurait l'avantage d'être exprimé chez les patients déficients au niveau de l'activité enzymatique de la chitotriosidase. Également, la mesure du CCL18/PARC par ELISA peut être plus facilement standardisée à travers les différents laboratoires cliniques (Raskovalova *et al.*, 2017).

La ferritine peut également être utilisée comme biomarqueur pour la maladie de Gaucher (Koppe *et al.*, 2016). Cette protéine a pour fonction de réguler le métabolisme du fer dans l'organisme. De manière plus précise, elle emmagasine le fer sous une forme non toxique pour l'organisme, puis le transporte vers les tissus ou les cellules où il est requis (Stein *et al.*, 2010). L'homéostasie du fer est cependant contrôlée par l'hepcidine, une hormone hépatique dont l'expression est contrôlée par des cytokines inflammatoires (Ueda et Takasawa, 2018). Chez les patients Gaucher, l'expression de ces cytokines inflammatoires est perturbée par les

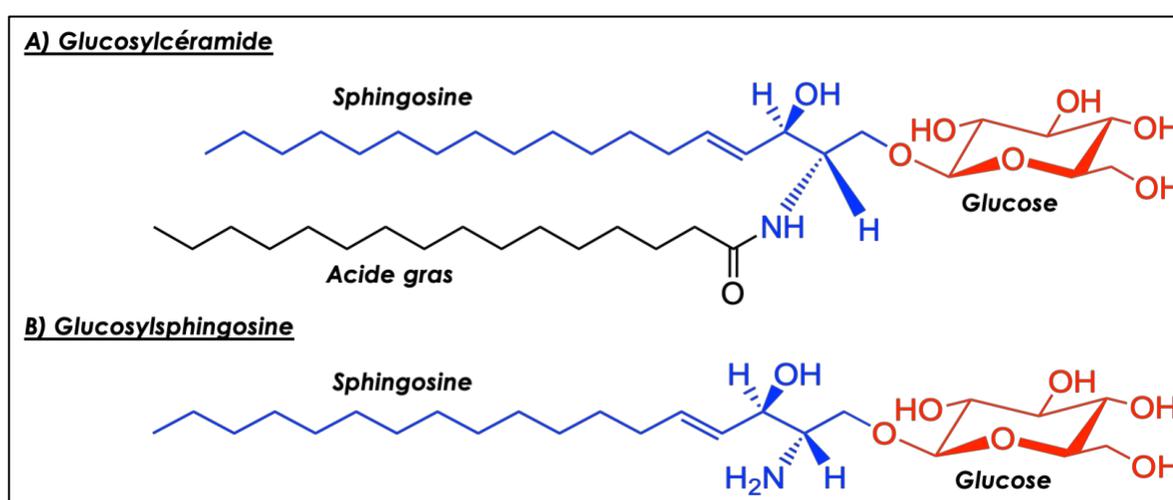
cellules Gaucher ce qui ultimement affecte le métabolisme du fer (Regenboog *et al.*, 2016). Il est donc possible d'observer une forte augmentation du taux de ferritine (hyperferritinémie) chez les patients Gaucher. Toutefois, il est important de mentionner que contrairement au CCL18/PARC ou à la chitotriosidase, l'hyperferritinémie n'est que le résultat sous-jacent du processus inflammatoire observé par la maladie de Gaucher (Giraldo *et al.*, 2018). Il ne s'agit pas d'une composante exprimée par les cellules Gaucher qui sont à l'origine de la pathologie (Giraldo *et al.*, 2018). Il est donc impossible de diagnostiquer la maladie de Gaucher en se basant uniquement sur le taux de ferritine sanguin (Giraldo *et al.*, 2018).

« L'Angiotensin-Converting Enzyme » (ACE) est une protéine membranaire qui joue un rôle important au niveau de l'homéostasie de la pression artérielle (Bernstein *et al.*, 2018). Chez un individu dit sain, cette protéine se retrouve normalement présente au niveau de la surface des cellules endothéliales. Celle-ci peut également se retrouver dans certains liquides biologiques suite à l'activité catalytique de l'enzyme ACE sécrétase (Danilov *et al.*, 2018). Ainsi, les niveaux d'ACE sont relativement stables dans la population saine alors que chez les patients Gaucher, les niveaux d'ACE sont augmentés d'un facteur de 3x à 5x au niveau du plasma. Il est toutefois important de mentionner que comme bien des biomarqueurs pour la maladie de Gaucher, l'ACE n'est pas spécifique à la maladie puisqu'il a été démontré qu'une élévation de celle-ci survient également chez les patients atteints d'autres maladies, dont la sarcoïdose (Danilov *et al.*, 2018).

La « Tartrate-Resistant Acid Phosphatase 5b » (TRAP5b) est quant à elle un biomarqueur lié à l'activité osseuse (van Dussen *et al.*, 2011). Effectivement, cette enzyme joue un rôle important au niveau de la résorption osseuse, plus précisément lors de la dégradation du collagène de type 1 par les ostéoclastes (Lv *et al.*, 2015). Toutefois, les niveaux de cette enzyme augmentent également pour d'autres pathologies telles que la maladie de Niemann-Pick (Giraldo *et al.*, 2018). Également, il est important de mentionner que la réabsorption osseuse peut être affectée par un grand nombre d'éléments tels que l'alimentation, le rythme circadien, le cycle menstruel, l'activité physique ou la médication. Ainsi tous ces éléments peuvent générer une grande variabilité biologique d'un individu à l'autre, ce qui

peut rendre extrêmement complexe l'interprétation des résultats d'analyses (Giraldo *et al.*, 2018).

Finalement, le glucosylcéramide (Gb<sub>1</sub>) ou la forme déacylée de celui-ci, le glucosylsphingosine (lyso-Gb<sub>1</sub>), sont des substrats accumulés suite à la déficience de la glucocérébrosidase. Au niveau de la structure, le glucosylcéramide est composé d'une molécule de glucose attaché à une sphingosine ainsi qu'à une céramide. Pour ce qui est du lyso-Gb<sub>1</sub>, il s'agit d'une molécule de glucose reliée à une sphingosine (Figure 2).



**Figure 2.** Structure chimique du: A) glucosylcéramide (Gb<sub>1</sub>); et B) du glucosylsphingosine (lyso-Gb<sub>1</sub>). Il est à noter que la longueur de la chaîne d'acide gras peut varier.

Contrairement aux biomarqueurs précédemment décrits qui sont majoritairement des biomarqueurs d'inflammation, le Gb<sub>1</sub> ainsi que le lyso-Gb<sub>1</sub> sont des biomarqueurs plus spécifiques de la maladie de Gaucher (Hurvitz *et al.*, 2019). Il a aussi été rapporté qu'en plus de cette spécificité, le lyso-Gb<sub>1</sub> pourrait directement être impliqué dans la pathologie et donc la quantification de celui-ci pourrait fournir un pronostic beaucoup plus précis que les biomarqueurs précédemment décrits (Rolfs *et al.*, 2013; Revel-Vilk *et al.*, 2020; Stiles *et al.*, 2021). Alors que le Gb<sub>1</sub> n'est qu'augmenté de manière modeste au niveau de plasma, les niveaux de lyso-Gb<sub>1</sub> semblent particulièrement élevés dans la même matrice chez les patients Gaucher (Vlugt *et al.*, 2008). De plus, d'autres études comparatives ont révélé qu'il s'agit d'un biomarqueur beaucoup plus sensible et spécifique que le CCL18/PARC et la

chitotriosidase (Revel-Vilk *et al.*, 2020). D'ailleurs, une étude de Rolfs *et al.* publiée en 2013 a révélé que les tests de dosage du lyso-Gb<sub>1</sub> plasmatique avaient une sensibilité et une spécificité à 100% pour une valeur seuil établie à 12 ng/ml alors que la sensibilité et la spécificité du dosage de la chitotriosidase étaient évaluées à 91,7% et 86,1%, respectivement, pour le même groupe d'échantillons. Par ailleurs, le dosage du CCL18/PARC présentait des valeurs de sensibilité et de spécificité de 76.2% et de 79.4%, respectivement, pour les mêmes patients (Rolfs *et al.*, 2013). Des études subséquentes ont également révélé qu'il existe une corrélation entre la concentration du lyso-Gb<sub>1</sub> dans le plasma et la sévérité de la maladie (Hurvitz *et al.*, 2019). Effectivement, tel qu'observé par Hurvitz *et al.* en 2019, il existe une différence significative entre les taux plasmatiques de lyso-Gb<sub>1</sub> chez les patients Gaucher de type 1 avec des manifestations cliniques plus atténuées (en moyenne 64 ng/ml de plasma) et les patients Gaucher de type 3 (100 ng/ml de plasma) (Hurvitz *et al.*, 2019). En comparaison, les niveaux contrôles de lyso-Gb<sub>1</sub> étaient près de 1.5 ng/ml de plasma (Hurvitz *et al.*, 2019). Au cours de la même étude sur le lyso-Gb<sub>1</sub>, Hurvitz *et al.* se sont intéressés au pouvoir pronostic potentiel du lyso-Gb<sub>1</sub>. Ainsi, de manière rétrospective, les auteurs ont consulté les dossiers de patients traités et non traités lors des premières visites de ceux-ci à l'hôpital. Ils ont alors observé que ceux qui ont été traités avaient des taux plasmatiques moyens de lyso-Gb<sub>1</sub> à 262.5 ng/ml alors que les enfants qui finalement n'ont pas eu besoin de traitement avaient un taux plasmatique moyen de lyso-Gb<sub>1</sub> mesuré à 61.5 ng/ml, confirmant alors la pertinence de doser cette molécule lors de l'évaluation clinique des patients (Hurvitz *et al.*, 2019). Ainsi, lorsque comparé aux biomarqueurs précédemment décrits, le lyso-Gb<sub>1</sub> possède un avantage marqué au niveau de la spécificité, puisqu'il est augmenté de manière significative seulement chez les patients Gaucher, il corrèle avec la sévérité de la maladie et la quantification de celui-ci est un outil précieux pour les cliniciens lors du choix du traitement, ainsi que pour le monitoring et suivi de leurs patients. (Murugesan *et al.*, 2016). Des études ont d'ailleurs révélé qu'à la suite du début ou d'une interruption de traitement, les taux plasmatiques de lyso-Gb<sub>1</sub> ont tendance à varier plus rapidement que les taux plasmatiques de chitotriosidase, suggérant que lyso-Gb<sub>1</sub> est un indicateur plus précoce que tous les autres biomarqueurs des variations de l'état de la maladie (Giraldo *et al.*, 2018).

### **3.7 Les traitements**

En raison du large spectre clinique associé à la maladie de Gaucher, ce ne sont pas tous les cas qui seront traités (Degnan *et al.*, 2019). De plus, pour les cas nécessitant un traitement, tous ne seront pas traités de la même façon et aux mêmes doses (Degnan *et al.*, 2019). Effectivement, les médecins se basent sur leur évaluation clinique pour décider si un patient doit recevoir un traitement ou bien si celui-ci n'est pas nécessaire. Les cliniciens se basent typiquement sur le taux de plaquettes (généralement  $\leq 50$  g/dl), le taux d'hémoglobine (généralement  $\leq 10$  g/dl), la sévérité de l'organomégalie et de l'atteinte osseuse (Nguyen *et al.*, 2019). Répondre à ces conditions ne signifie pas systématiquement l'obligation de recevoir un traitement. Il s'agit plutôt de paramètres qui peuvent orienter le médecin traitant (Degnan *et al.*, 2019). Au niveau des patients pour lesquels le traitement s'avère nécessaire, plusieurs options sont offertes telles que la thérapie enzymatique de remplacement, la thérapie de réduction de substrat, la thérapie par chaperons, ainsi que la thérapie par inhibiteurs d'histones déacétylases (Mistry *et al.*, 2017).

#### **3.7.1 La thérapie de remplacement enzymatique**

Avant la disponibilité des thérapies enzymatiques de remplacement, seuls des traitements symptomatiques comme la splénectomie ou la transfusion sanguine étaient disponibles (Hughes *et al.*, 2007). Ces traitements pouvaient alors engendrer d'importantes complications pour le patient. Effectivement, la transfusion sanguine notamment pouvait accélérer la progression naturelle de la maladie en raison de l'accumulation de glycosphingolipides issus de la membrane cellulaire des cellules sanguines infusées (Mistry *et al.*, 2018). Ainsi, les différentes complications résultantes de ces traitements symptomatiques pouvaient entraîner une mortalité précoce (Mistry *et al.*, 2018).

En 1991, la thérapie de remplacement enzymatique, un type de thérapie visant à infuser au patient une enzyme analogue à l'enzyme déficiente afin de dégrader les substrats accumulés et donc d'éliminer les substrats potentiellement toxiques fait son apparition (Zimran et Elstein, 2014; Beshlawy *et al.*, 2019; Oto *et al.*, 2021). L'alglucérase (Ceredase<sup>®</sup>; Genzyme, Cambridge, MA, USA), une version modifiée de la  $\beta$ -glucocérébrosidase extraite à partir de placenta humain, a d'ailleurs été une percée majeure pour le traitement des patients Gaucher. Peu de temps après, l'imiglucérase (Cerezyme<sup>®</sup>; Genzyme, Cambridge, MA, USA), une

enzyme similaire à alglucérase, mais obtenue à partir de cellules eucaryotes génétiquement modifiées (protéine recombinante) a été développée (Mistry *et al.*, 2017). Ainsi, au cours des années 1991 à 2009, l'imiglucérase et l'alglucérase étaient les deux seules thérapies enzymatiques de remplacement approuvées pour le traitement de la maladie de Gaucher (Mistry *et al.*, 2017). Puis, en 2009, en raison d'une pénurie d'imiglucérase suite à une contamination virale du bioréacteur produisant l'enzyme, la compagnie Shire a développé sa propre thérapie enzymatique de remplacement nommée Velaglucérase-alfa (Vpriv®; Shire Human Genetic Therapies, MA, USA) qui est produite à partir d'une lignée cellulaire de fibrosarcome (HT-1080) (Mistry *et al.*, 2017). Puis, peu de temps après, la Taliglucérase (Elelyso®; Protalix Biotherapeutics, Carmiel, Israël), une enzyme qui est exprimée à partir d'une lignée cellulaire de racines de carotte, a été développée (Mistry *et al.*, 2017). Ainsi, l'apparition de la thérapie d'enzyme de remplacement, un type de thérapie visant à infuser au patient une enzyme analogue à l'enzyme déficiente afin de dégrader les substrats accumulés et donc d'éliminer les substrats potentiellement toxiques, a eu un impact majeur pour les patients Gaucher (Zimran et Elstein, 2014; Beshlawy *et al.*, 2019; Oto *et al.*, 2021). Effectivement, lors des essais cliniques réalisés pour évaluer l'efficacité de l'imiglucérase, les cliniciens ont été en mesure d'observer une amélioration significative au niveau de l'état des patients (Brady, 2006; Stirnemann *et al.*, 2015). Parmi les effets positifs, les cliniciens ont observé une diminution importante de l'hépatosplénomégalie, de la cytopénie, et de l'ostéopénie, particulièrement chez les patients plus jeunes (Stirnemann *et al.*, 2015). Cependant, un problème persiste avec ce type de traitement. En effet, étant un composé de taille considérable, l'enzyme infusée ne parvient pas à franchir la barrière hématoencéphalique et donc s'avère inefficace pour les atteintes neurologiques dont peuvent souffrir certains patients Gaucher.

Pour ce qui est de la procédure associée au traitement, le patient reçoit une dose initiale de 60 U par kg de poids de manière intraveineuse sur une période de 1 à 2 heures, à tous les 14 jours (Takeda Pharmaceuticals, 2020). Suite à la stabilisation ou à un changement de l'état du patient, il est possible de modifier le dosage ou le temps entre les infusions (Deegan et Cox, 2012).

### **3.7.2 La thérapie de réduction de substrat**

La thérapie de réduction de substrat vise à inhiber ou à réduire l'activité enzymatique des enzymes impliquées dans la synthèse des substrats accumulés via de petites molécules (Coutinho *et al.*, 2016). Dans le cas de la maladie de Gaucher, l'enzyme ciblée par la thérapie de réduction de substrat est la céramide glucosyltransférase sous l'action de la N-butyl-deoxynojirimycin (NB-DNJ) également connu sous le nom de miglustat (Zavesca®; Actelion, Basel, Suisse), un médicament consommé oralement (Mistry *et al.*, 2017). De manière générale, la thérapie de réduction de substrat est surtout utilisée pour les individus ne pouvant pas avoir recours à la thérapie enzymatique de remplacement en raison notamment de réactions anaphylactiques ou de problèmes au niveau de la tolérance aux médicaments (Revel-Vilk *et al.*, 2018). Il est cependant à noter que la NB-DNJ possède une constante d'inhibition médiane (IC50) assez élevée de 50µM (Mistry *et al.*, 2017). De plus, son action n'est pas spécifique à la céramide glucosyltransférase (Mistry *et al.*, 2017). Effectivement, la NB-DNJ affecte également des disaccharidases intestinaux ce qui peut s'avérer toxique pour l'organisme sur une période prolongée (Mistry *et al.*, 2017). Toutefois, au niveau de l'efficacité du traitement, des études cliniques ont confirmé les bienfaits de la thérapie de réduction de substrat qui atteint globalement les mêmes objectifs thérapeutiques que la thérapie enzymatique de remplacement (Biegstraaten *et al.*, 2018). Cependant, il a été observé que ce ne sont pas tous les patients qui bénéficient des effets thérapeutiques de la thérapie de réduction de substrat, car pour certains patients des manifestations cliniques associées à la maladie ont semblé s'aggraver (Cox *et al.*, 2012). Des compagnies pharmaceutiques ont subséquemment tenté de développer de nouvelles molécules pouvant moduler l'activité des enzymes. Le médicament Eliglustat® en est un exemple. C'est un dérivé du 1-phényl-2-décanoylamino-3-morpholino-1-propanol développé par la compagnie Sanofi Genzyme (Cambridge, MA, USA). L'Éliglustat est également un inhibiteur de céramide glucosyltransférase, mais contrairement au Miglustat, il ne possède que très peu d'interactions non spécifiques. (Mistry *et al.*, 2017)

### **3.7.3 La thérapie par chaperons pharmacologiques**

L'objectif de la thérapie par chaperons pharmacologiques consiste à lier une protéine ou une enzyme spécifique et à stabiliser sa structure tridimensionnelle de manière à augmenter son activité catalytique, éviter sa dégradation précoce ou même modifier sa translocation (Parenti



*et al.*, 2015). Dans le cas de la maladie de Gaucher, l'ambroxol, un médicament également utilisé pour soigner des atteintes respiratoires telles que des bronchites, une toux ainsi que des sinusites, est également un inhibiteur mixte à pH dépendant de la glucocérébrosidase (Istaiti *et al.*, 2021). Bien que cette molécule soit un inhibiteur de la glucocérébrosidase, il est à noter que son activité inhibitrice est optimale à un pH neutre, alors que cette même activité est non détectable dans un environnement acide, comme celui présent au niveau du lysosome (Maegawa *et al.*, 2009). En fait, à un pH de 4.3, l'ambroxol devient plutôt un activateur de la glucocérébrosidase (Maegawa *et al.*, 2009). Contrairement au traitement par thérapie enzymatique de remplacement ou à la thérapie de réduction de substrat, le traitement par chaperons est plus sécuritaire, il comporte moins d'effets secondaires potentiels et il est moins invasif (Han *et al.*, 2020). Également, puisque l'ambroxol est une petite molécule, le composé peut franchir la barrière hématoencéphalique et donc potentiellement augmenter l'activité enzymatique de la glucocérébrosidase au niveau du cerveau (Narita *et al.*, 2016). Ceci peut donc contribuer à retarder l'apparition des atteintes neurologiques (Narita *et al.*, 2016). Cependant, l'utilisation de chaperons pharmacologiques requiert certaines conditions comme une activité enzymatique minimale initiale chez le patient afin d'avoir un effet bénéfique (Narita *et al.*, 2016).

### **3.7.4 Le traitement par inhibiteurs d'histones acétylases**

Des chercheurs ont été en mesure que prouver que pour les deux mutations pathogéniques les plus fréquemment observées chez les patients Gaucher, soit les variants pathogéniques p.Lys444Pro et p.Asn370Ser, l'enzyme résultante n'aurait pas un déficit au niveau de l'activité catalytique de ladite enzyme, mais plutôt un défaut au niveau de la stabilité et de la conformation de celle-ci (Lu *et al.*, 2011). Ainsi, ce type de défaut augmente alors la probabilité que l'enzyme soit reconnue par les ligases E3 puis dégradée via le protéasome (Lu *et al.*, 2011). Des études *in vitro* subséquentes ont toutefois permis de démontrer que de petites molécules pouvaient inhiber l'acétylation du domaine central de Hsp90, un chaperon impliqué dans la reconnaissance de la glucocérébrosidase mutante. Cette inhibition de l'acétylation aurait pour fonction d'affecter les tâches de reconnaissance de Hsp90, résultant ultimement en une diminution de la dégradation de l'enzyme mutante (Yang *et al.*, 2012). Il est toutefois à noter que ce type de traitement n'est que très peu ou pas utilisé pour la maladie de Gaucher malgré les effets bénéfiques potentiels au niveau des atteintes neurologiques.

Actuellement, le médicament Vorinostat (Zolinza<sup>®</sup>; Merck & Co., Kenilworth NJ, USA) un inhibiteur d'histone acétylase, est plutôt utilisé en oncologie pour des lymphomes ainsi que des myélomes multiples (Mistry *et al.*, 2017).

### **3.7.5 Le traitement par thérapie génique**

Actuellement, la thérapie génique AVR-RD-02 pour les patients Gaucher est au stade des essais cliniques chez les humains (clinicaltrials.gov, 2019). Le concept de la thérapie génique consiste à : 1) Prélever des cellules souches chez le patient; 2) Enrichir les cellules extraites afin d'être en mesure de sélectionner un type cellulaire en particulier soit les cellules CD34+; 3) Introduire un vecteur viral qui va corriger les mutations présentes sur le gène du patient; et 4) Infuser au patient ses propres cellules CD34+ corrigées (Dahl *et al.*, 2015). Comme pour de nombreuses atteintes d'origine génétique, ce type de traitement constitue en quelque sorte le traitement novateur « idéal » puisque l'objectif est de corriger le problème à la base, c'est-à-dire là où sont les mutations à l'origine de la pathologie. Ce type de traitement pourrait avoir des effets bénéfiques pour les atteintes neurologiques s'il n'avait pas d'effets secondaires ou de réactions immunitaires indésirables (Dahl *et al.*, 2020). De plus, cette approche thérapeutique serait plus simple et rapide pour le patient, car il n'aurait pas besoin de se rendre à l'hôpital fréquemment pour recevoir son traitement ou recevoir à toutes les 2 semaines à la maison la thérapie enzymatique de remplacement (Dahl *et al.*, 2020). D'autres thérapies sont à l'étude comme l'édition génomique qui vise à corriger le gène directement dans les cellules du patient à l'aide du système CRISPR/Cas 9 (Pavan *et al.*, 2020)

## **4 La présentation du projet de recherche**

Actuellement, de nombreuses molécules peuvent être dosées afin de confirmer ou d'infirmer les suspicions d'un clinicien face à un cas potentiel de la maladie de Gaucher. L'ACE, le TRAP5b, le CCL18/PARC ainsi que la ferritine sont des molécules qui peuvent fournir des informations intéressantes sur l'état général du patient, mais ne sont malheureusement pas spécifiques à la maladie de Gaucher. En particulier, l'expression de la chitotriosidase est sujette à une grande variabilité au sein de la population. Heureusement, des études ont permis d'identifier le lyso-Gb<sub>1</sub>, un biomarqueur sensible et spécifique à la maladie dont l'expression semble corrélée à la sévérité de la maladie de Gaucher (Dinur *et al.*, 2022). Cependant, en raison de la grande hétérogénéité génotypique et phénotypique de la maladie, il est impossible, en se basant uniquement sur le taux plasmatique de lyso-Gb<sub>1</sub>, de déterminer le

type d'atteintes et les manifestations cliniques précises. En s'appuyant sur les caractéristiques d'un biomarqueur idéal, il est possible de conclure qu'il reste encore place à de la recherche scientifique pour arriver à trouver un biomarqueur ou un profil de biomarqueurs probants pour la maladie de Gaucher. Effectivement, les biomarqueurs actuels manquent de spécificité, c'est-à-dire qu'ils sont présents pour de nombreuses autres pathologies que la maladie de Gaucher ou bien ils manquent de sensibilité. Alors que le lyso-Gb<sub>1</sub> est probablement le composé qui se rapproche davantage de la définition d'un biomarqueur idéal, il est possible qu'une sous-classe de métabolites reliés au lyso-Gb<sub>1</sub> puisse apporter un complément d'information clinique essentiel aux médecins traitants.

Effectivement, des études métabolomiques réalisées par l'équipe de la professeure Auray-Blais sur la maladie de Fabry, une sphingolipidose dont le mécanisme est relativement similaire à la maladie de Gaucher, ont révélé la présence de nouveaux biomarqueurs, soit les analogues du lyso-Gb<sub>3</sub> (Auray-Blais *et al.*, 2012). De fait, le lyso-Gb<sub>3</sub> représente la forme déacylée du substrat principal, le globosylcéramide ou Gb<sub>3</sub>, qui est accumulé suite à la déficience enzymatique de l'alpha-galactosidase A. Ces analogues du lyso-Gb<sub>3</sub> sont très similaires au lyso-Gb<sub>3</sub> présentant certaines modifications chimiques au niveau de la sphingosine. Ces modifications peuvent être des ajouts ou des pertes de différents groupements représentés par les formules empiriques suivantes: +H<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, +H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, +H<sub>2</sub>O, +O, -H<sub>2</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>. Des études quantitatives subséquentes de ces analogues ont permis d'établir des associations entre la concentration de certains de ceux-ci, plus précisément les analogues +O, +H<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et +H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et des atteintes cardiaques chez les patients Fabry (Auray-Blais *et al.*, 2017). La découverte des analogues du lyso-Gb<sub>3</sub> a donc suscité un intérêt chez des groupes de recherche travaillant sur d'autres maladies, dont la maladie de Gaucher. Un groupe de recherche a d'ailleurs mis en évidence la présence de certains analogues du lyso-Gb<sub>1</sub> dans le plasma de patients Gaucher. Il s'agit ici des analogues -H<sub>2</sub>, +CH<sub>2</sub> et +OH (Mirzaian *et al.*, 2015). À notre connaissance, aucune étude de corrélation entre la présence d'analogues du lyso-Gb<sub>1</sub> et des atteintes spécifiques de la maladie n'a été faite à ce jour. Également, puisque relativement peu d'études métabolomiques ont été réalisées pour la maladie de Gaucher, il est possible que de nouvelles molécules pas nécessairement associées au Gb<sub>1</sub> ou au lyso-Gb<sub>1</sub> s'avèrent être des biomarqueurs plus robustes et fiables que ceux actuellement connus.

#### ***4.1 L'hypothèse***

L'hypothèse du présent projet de recherche est qu'il existe des biomarqueurs dans les liquides biologiques de patients Gaucher de type 1 qui pourraient mieux corrélérer avec les manifestations cliniques et la progression de la maladie.

#### ***4.2 Les objectifs***

L'objectif principal du projet de recherche consiste à procéder à des études métabolomiques non ciblées dans les liquides biologiques de patients Gaucher utilisant une approche en spectrométrie de masse en temps de vol afin de découvrir de nouveaux biomarqueurs qui corrélerent avec la sévérité et la progression de la maladie. De manière plus précise, nous souhaitons réaliser une étude métabolomique dans deux types de matrices différentes, soit l'urine et le plasma. Ainsi, un total de deux études métabolomiques distinctes seront produites dans le cadre de ce projet visant la découverte de nouveaux biomarqueurs. Les objectifs secondaires consistent à: 1) élucider la structure des biomarqueurs qui seront identifiés suite aux études métabolomiques; 2) développer et valider des méthodes de quantification sensibles et robustes pour ces molécules par spectrométrie de masse en tandem; et 3) analyser des échantillons de patients Gaucher traités et non traités afin d'étudier la distribution desdits biomarqueurs et d'établir de potentielles corrélations entre la concentration de ceux-ci et les manifestations cliniques de la maladie.

#### ***4.3 Les retombées anticipées***

L'identification de nouveaux biomarqueurs permettra de développer des méthodes d'analyses rapides et fiables pour aider au diagnostic précoce et assurer un meilleur monitoring et suivi des patients atteints de la maladie de Gaucher. Les nouveaux biomarqueurs permettront potentiellement aux cliniciens d'avoir un meilleur portrait clinique de leurs patients ce qui pourra ultimement les orienter plus rapidement vers un choix de traitement approprié. En plus du développement de méthodes utilisables en clinique, le projet offrira un apport au niveau fondamental puisqu'il permettra d'orienter et de potentiellement cibler d'autres voies métaboliques affectées par la maladie. Le projet permettra donc d'approfondir les connaissances de la biochimie sous-jacente à la maladie de Gaucher.

### **5 Les matrices à l'étude**

À l'heure actuelle, les analyses en laboratoire clinique associées à la maladie de Gaucher reposent uniquement sur le sang. Considérant la nature des atteintes et plus particulièrement

les cytopénies souvent associées à la maladie, de même que la présence des biomarqueurs tels que le lyso-Gb<sub>1</sub>, l'ACE, le TRAP5b, le CCL18/PARC, la chitotriosidase ainsi que la ferritine, il est logique d'utiliser le sang comme matrice principale. Ainsi, avec un seul prélèvement, il est possible d'évaluer une multitude de paramètres cliniques. Cependant, bien qu'un seul prélèvement permette d'analyser ces différents paramètres, le prélèvement sanguin demeure un procédé invasif dont plusieurs ne sont pas friands. À l'opposé, l'urine s'avère être une matrice facile à collecter et ce, de manière non invasive. Des études ont d'ailleurs révélé qu'il est possible de mesurer l'activité ainsi que la concentration de la glucocérébrosidase à partir d'échantillons d'urine de patients (Aerts *et al.*, 1991). Lors de ces études, Aerts *et al.*, ont été en mesure d'observer une différence significative entre l'activité de la glucocérébrosidase des contrôles (n=86) et des patients Gaucher (n=34) (Aerts *et al.*, 1991).

Une récente étude a révélé la possibilité de doser le lyso-Gb<sub>1</sub> et ses analogues dans l'urine grâce à une méthode rapide d'analyse par spectrométrie de masse en tandem (Mirzaian *et al.*, 2015). D'ailleurs, au niveau de l'urine, la distribution des différents analogues était différente de celle dans le plasma (Mirzaian *et al.*, 2015). Effectivement, les chercheurs ont observé qu'au niveau du plasma, lorsque le lyso-Gb<sub>1</sub> et les analogues sont regroupés en une classe de molécules, le lyso-Gb<sub>1</sub> représente à lui seul près de 92% du groupe « lyso ». Après celui-ci, les analogues les plus abondants étaient l'analogue -H<sub>2</sub> (3%), suivi de l'analogue +H<sub>2</sub>O (2%) et finalement les analogues -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> et -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> +O qui représentent quant à eux moins de 1% du lyso-Gb<sub>1</sub> plasmatique total (Mirzaian *et al.*, 2015). À l'opposé, le lyso-Gb<sub>1</sub> au niveau urinaire ne représente que 3% du total. L'analogue le plus abondant est le +CH<sub>2</sub> (près de 50% du lyso-Gb<sub>1</sub> + analogues totaux) suivi de l'analogue +OH (40%), -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> +O (6%), -H<sub>2</sub> (3%), -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (1%) et finalement l'analogue +H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui représente quant à lui environ 0,5% du lyso-Gb<sub>1</sub> urinaire total (Mirzaian *et al.*, 2015). Ainsi, pour une même maladie avec des échantillons plasmatiques et urinaires provenant des mêmes patients, un profil totalement différent d'expression des biomarqueurs est observé. Tel que mentionné précédemment, il est possible que la présence ou l'absence de certains de ces analogues oriente le clinicien responsable vers une atteinte plus spécifique. Également, il est logique de s'interroger à savoir si des biomarqueurs autres que le lyso-Gb<sub>1</sub> peuvent être présents dans un type de

matrice et absent dans l'autre. Il est donc important dans le cadre de ce projet de recherche visant à trouver de nouveaux biomarqueurs pour la maladie de Gaucher de considérer diverses matrices possibles. Considérant que le sang est actuellement utilisé pour procéder aux analyses requises pour les patients Gaucher et puisque l'urine est une matrice facilement accessible de manière non invasive qui est fréquemment utilisée dans le cadre de différentes analyses cliniques pour un grand nombre de maladies, il fut logique de considérer ces deux matrices dans le cadre de ce projet de recherche.

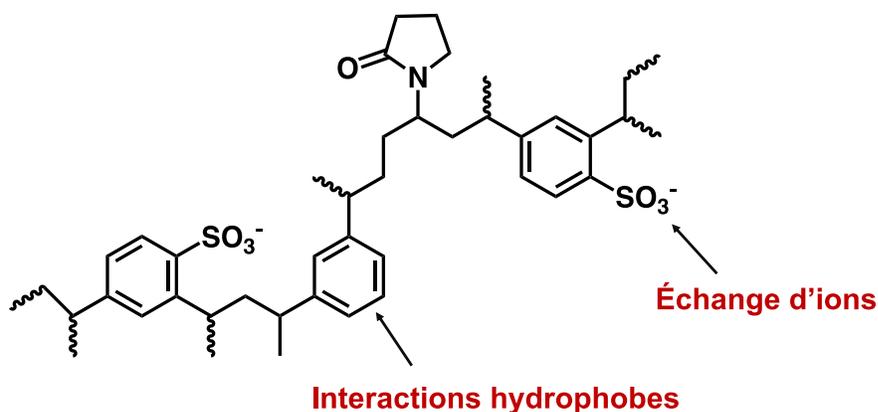
## **6 La préparation des échantillons**

De nombreuses composantes telles que l'albumine, les globulines, le fibrinogène, les protéines inflammatoires et les acides aminés sont entre autres présents de manière abondante dans les échantillons de plasma (Benjamin et McLaughlin, 2012). Ainsi, malgré le fait qu'à la base le plasma soit une matrice obtenue par une centrifugation des échantillons de sang à 2 000g pour une période de 10 minutes, il n'en demeure pas moins que le plasma est une matrice très riche (Söderström *et al.*, 2016). Aussi, l'urée, les enzymes, les glucides, les hormones, les acides gras, les phospholipides ainsi que les protéines sont tous des composantes qui contribuent à faire de l'urine une matrice riche en biomarqueurs (Sarigul *et al.*, 2019). Une étape de préparation des échantillons est donc nécessaire afin de concentrer les analytes, réduire l'effet de matrice et éviter des blocages dans le système de chromatographie liquide à ultra performance couplée à la spectrométrie de masse en temps de vol (UPLC-QTOF) ou en tandem (UPLC-MS/MS). Avant de poursuivre sur la préparation des échantillons, il est important de bien définir ce qui constitue l'effet de matrice puisqu'il s'agit là d'une notion importante à laquelle font face toutes personnes qui utilisent un spectromètre de masse couplé à un chromatographe liquide.

L'effet de matrice est un phénomène pour lequel les différentes composantes endogènes d'une matrice de l'échantillon altèrent l'ionisation d'une molécule d'intérêt (Raposo et Barcelo, 2021). Les notions d'effets de matrice seront davantage discutées dans la section sur la chromatographie et les effets de matrice. Par contre, ce qui est toutefois important de se rappeler est qu'une matrice purifiée est souvent synonyme d'un effet de matrice réduit. Afin de démontrer ce phénomène, il est possible de regarder comment se comporte un analyte dans une matrice complexe telle qu'un tissu et une matrice purifiée à 100%, c'est-à-dire un

solvant ou un mélange de solvants purs. Lors d'une étude récente portant sur la distribution de l'héparan sulfate et du dermatan sulfate dans les tissus de souris MPS II, l'effet de matrice lors de la quantification de l'héparan sulfate et du dermatan sulfate dans les tissus engendrait une suppression du signal variant de 15 à 85% lorsqu'un standard interne deutéré n'était pas utilisé (Menkovic *et al.*, 2019). Évidemment, pour les échantillons préparés sans matrice, c'est-à-dire dans l'eau, cet effet n'était pas observable (Menkovic *et al.*, 2019). Ultiment, les auteurs ont dû avoir recours à une purification physique par filtres à seringue pour éviter les blocages au niveau de l'appareil. Toutefois, cette étude démontre à quel point une matrice peut avoir un effet important non seulement sur les molécules à doser, mais également sur les appareils analytiques.

Ainsi, dans le cadre de la présente étude afin de réduire l'effet de matrice, une purification par extraction en phase solide (SPE) a été employée. Bien qu'il existe différentes méthodes pour la purification des échantillons pour une étude métabolomique, la purification par SPE est rapide, simple et reproductible. Le lyso-Gb<sub>1</sub> est une molécule faiblement basique composée d'une unité de sucre et d'une sphingosine (Rolfs *et al.*, 2013). Cette molécule, de même que d'autres ayant des propriétés physico-chimiques similaires, c'est-à-dire une molécule faiblement basique avec une région hydrophobe, peuvent facilement être purifiées à l'aide de colonne de type « *Mixed Mode Strong Cation Exchange* » (OASIS MCX, Waters Corp.). Effectivement, cette colonne d'extraction est composée de groupements sulfonates ainsi que de régions hydrophobes (Arsenault, 2012). Ainsi, les groupements protonés des molécules basiques interagiront avec les groupements sulfonates chargés négativement alors que les groupements hydrophobes des analytes interagiront avec des régions hydrophobes de la matrice de la colonne SPE pour assurer la rétention des composés au sein de la cartouche de purification (Figure 3).



**Figure 3.** Structure chimique du polymère présent dans les colonnes OASIS MCX (Waters) utilisées dans le cadre du projet afin de purifier les échantillons d'urine et de plasma (Waters, 2010).

Au niveau du protocole expérimental, la procédure de purification consiste initialement à conditionner la phase stationnaire à l'aide de méthanol (1 ml) et d'une solution de  $H_3PO_4$  3% (1 ml) de manière à activer la résine présente dans la cartouche (Arsenault, 2012). Une fois la cartouche conditionnée, l'échantillon, soit 200  $\mu$ l de plasma ou d'urine auquel auront été ajoutés 500  $\mu$ l  $H_3PO_4$  3% et 500  $\mu$ l de méthanol afin de protoner les composés basiques pour qu'ils puissent se lier au groupement sulfonate chargé négativement et qui sont présents au niveau de la matrice, sera chargé sur la colonne. Ensuite viennent deux étapes de lavage. Un premier lavage à l'aide de 1 ml d'une solution d'acide formique 2% permettra d'éluer les composés polaires et neutres suivi d'un second lavage à l'aide de 1 ml d'une solution d'acide formique 0,2% dans le méthanol qui permettra d'éluer les composés hydrophobes neutres et acides. Finalement, la dernière étape de la purification par SPE est l'élution qui consiste à briser l'interaction entre les analytes et la phase stationnaire pour récolter ceux-ci. Ainsi, un solvant basique, soit du  $NH_4OH$  2% dans du méthanol, est utilisé afin de déprotoner les molécules liées aux groupements sulfonate de la phase stationnaire et briser les interactions hydrophobes entre la phase stationnaire et les analytes. Il est à noter que les différents volumes de solution ou d'échantillon ont été adaptés en fonction de la concentration de l'échantillon lors de l'étude métabolomique dans l'urine. Cet ajustement avait pour but de normaliser la concentration de tous les échantillons analysés en fonction de la concentration de la créatinine, un composé présent de manière endogène dans tous les échantillons d'urine. Plus précisément, la créatinine est un produit de dégradation résultant du catabolisme de la



créatine au niveau des muscles squelettiques et du cerveau, où cette dernière est utilisée dans le but de transférer l'énergie au muscle sous forme d'ATP (Taegtmeyer et Ingwall, 2013). Pour revenir à la préparation de l'échantillon, une fois l'éluat récolté, celui-ci est évaporé sous jet d'azote puis resuspendu dans 100 µl d'une solution de 95% ACN/ 2,5% MeOH / 2,5% H<sub>2</sub>O + 5 mM de formate d'ammonium contenant 0,5% d'acide formique. Cette solution a été sélectionnée puisqu'elle est compatible avec le type de chromatographie sélectionnée, c'est-à-dire qu'elle ne contient pas de solvants forts qui risquent de nuire à l'adsorption des analytes à la colonne UPLC. Il est à noter que cette solution de resuspension a été optimisée dans le but d'obtenir le meilleur signal possible combiné à des séparations chromatographiques adéquates pour tous les composants. À cet effet, en plus de la solution de resuspension de base, un ajout de différents volumes d'eau, de méthanol ou de diméthylsulfoxyde a été étudié (Tableau 3).

**Tableau 3.** Optimisation de la solution de resuspension à l'aide de standard de lyso-Gb<sub>1</sub> pour un même échantillon donné.

Solution de resuspension	Signal mesuré (Aire sous la courbe)		
	Lyso-Gb <sub>1</sub>	SPC**	NPOPCS***
250 µl Phase mobile A*	660 526	280 104	7 586 622
240 µl Phase mobile A + 10 µl H <sub>2</sub> O	754 366	281 983	6 624 237
225 µl Phase mobile A + 25 µl H <sub>2</sub> O	677 277	271639	5 519 837
200 µl Phase mobile A + 50 µl H <sub>2</sub> O	548 797	239 822	5 015 928
240 µl Phase mobile A + 10 µl MeOH	724 157	305 162	7 096 634
225 µl Phase mobile A + 25 µl MeOH	744 917	274 483	6 703 672
200 µl Phase mobile A + 50 µl MeOH	610 890	250 059	5 719 765
240 µl Phase mobile A + 10 µl DMSO	398 1730	250 648	5 759 082
225 µl Phase mobile A + 25 µl DMSO	296 557	247 556	5 617 656
200 µl Phase mobile A + 50 µl DMSO	233 300	209 738	4 392 785

\*Phase mobile A: 94,5:2,5:2,5:0,5 ACN:MeOH:H<sub>2</sub>O: HCOOH+ 5 mM ammonium formate

\*\*SPC : Sphingosylphosphorylcholine

\*\*\*NPOPCS : N-palmitoyl-O-phosphocholine sérine

Il a été observé que des ajouts à la solution de resuspension de base n'aident pas à augmenter significativement le signal et/ou l'apparence de la chromatographie. Ainsi, pour des raisons de simplicité, seule la solution de resuspension de base sans ajout, c'est-à-dire la même solution qui est utilisée comme phase mobile organique, a été employée pour resuspendre les échantillons.

Il est important de mentionner que dans le cadre de la présente étude, la colonne MCX a été sélectionnée en raison d'expériences antérieures au niveau d'une autre sphingolipidose, soit la maladie de Fabry. En effet, ces études métabolomiques ont révélé l'existence de nombreux analogues du biomarqueur globotriaosylsphingosine (également connu sous le nom de lyso-Gb<sub>3</sub>) au niveau du plasma et de l'urine de patient (Dupont *et al.*, 2013; Auray-Blais *et al.*, 2012). Comme mentionné précédemment, certains analogues présentent des associations avec certaines manifestations cliniques spécifiques de la maladie (Auray-Blais *et al.*, 2017). Il fut donc logique dans le cadre du présent projet d'utiliser une colonne SPE de type MCX afin d'isoler ces intermédiaires de réaction qui pourraient potentiellement fournir d'importantes informations aux cliniciens. Évidemment, il est possible qu'un excellent biomarqueur pour la maladie de Gaucher ne soit pas une molécule basique et hydrophobe et donc qu'il ne soit pas possible de purifier et d'analyser cette molécule dans les conditions utilisées dans la présente étude. Il est donc possible de faire plusieurs études avec différents types de colonnes SPE de manière à s'assurer d'identifier un vaste nombre de biomarqueurs potentiels pour la maladie et ce peu importe leurs propriétés physico-chimiques.

### **6.1 Le standard interne**

Pour les méthodes de quantification, nous avons utilisé trois différents standards internes soit le lyso-Gb<sub>1</sub> marqué au carbone 13 (utilisé dans l'urine et le plasma), la créatinine deutérée (utilisée dans l'urine) et la sphingosylphosphorylcholine deutérée (utilisée dans le plasma). Ces standards remplissent des fonctions très importantes afin de s'assurer de la fiabilité des résultats. De façon plus précise, les standards internes peuvent corriger les variabilités qui surviennent lors des étapes de préparation des échantillons, lors de l'ionisation ainsi que l'effet de matrice (Jeanne Dit Fouque *et al.*, 2018). Dans le cas des méthodes présentées dans cette thèse, le standard interne corrige pour les pertes possibles lors de la préparation de l'échantillon, de la purification par SPE ainsi que lors du transfert des échantillons

resuspendus dans l'insert utilisé pour l'analyse par spectrométrie de masse. En effet, considérant que les standards internes ont des propriétés physico-chimiques généralement très similaires aux molécules analysées, les pertes occasionnées lors des étapes de préparation devraient se refléter sur les concentrations du standard interne également. Ceci est également valable lors de l'ionisation des analytes. Si pour une raison quelconque l'ionisation pour un échantillon spécifique devait engendrer un signal supérieur ou inférieur aux autres échantillons du même type, cette augmentation devrait également paraître au niveau du signal mesuré pour le standard interne. Ainsi, la réponse, c'est-à-dire l'aire sous la courbe mesurée pour l'analyte divisée par l'aire sous la courbe mesurée pour le standard interne devrait permettre de comparer les différents échantillons sans ce type de biais analytique. Au niveau de l'effet de matrice, celui-ci sera entièrement corrigé par le standard si le temps de rétention est identique pour le standard et le standard interne puisque les deux composés sont exposés au même effet de matrice. Cette situation devient toutefois plus complexe lorsque des standards internes idéals ne sont pas disponibles comme c'est le cas pour les méthodes présentées aux Articles 2 et 4. Évidemment, puisque les analogues du lyso-Gb<sub>1</sub> ont des propriétés physico-chimiques relativement similaires à ceux du lyso-Gb<sub>1</sub>, nous supposons que le standard interne marqué au carbone 13 du lyso-Gb<sub>1</sub> pourra compenser pour des variabilités au niveau de la préparation des échantillons et de l'ionisation. Toutefois, en raison de la variabilité au niveau de temps de rétention du lyso-Gb<sub>1</sub> <sup>13</sup>C et des différents analogues, le standard interne ne parvient pas totalement à corriger l'effet de matrice. C'est d'ailleurs pour cette raison que les méthodes chromatographiques pour la quantification relative ont été optimisées afin d'avoir un effet de matrice similaire.

## **7 La chromatographie liquide**

La chromatographie liquide est une méthodologie employée pour séparer les différents constituants d'un échantillon en fonction des différents paramètres physico-chimiques de ceux-ci. Concrètement, les composantes de l'échantillon sont transportées à travers une phase stationnaire grâce à une phase mobile (Hermawan *et al.*, 2017). Pour les molécules ayant plus d'affinité pour la phase stationnaire, celles-ci auront plus d'interactions avec la matrice de la colonne entraînant alors une certaine rétention de ces molécules. À l'opposé les molécules ayant plus d'affinité pour la phase mobile traverseront la colonne chromatographique sans ou avec peu d'interactions avec celle-ci (Žuvela *et al.*, 2019). Cette méthode permet ainsi

d'isoler ou de séparer les analytes et les contaminants potentiels présents dans l'échantillon de manière à augmenter la sensibilité de la méthode d'analyse (Hermawan *et al.*, 2017).

### **7.1 La séparation chromatographique**

La chromatographie implique un transfert de matière entre une phase mobile et une phase stationnaire (Hermawan *et al.*, 2017). La phase mobile quant à elle peut être une phase liquide ou bien gazeuse qui transporte les composantes de l'échantillon à travers la phase stationnaire qui consiste en une phase solide ou liquide ou liée chimiquement à un support solide (Coskun, 2016). La mobilité des composantes lors du passage dans la phase stationnaire dépend de l'affinité desdites composantes de l'échantillon avec la phase stationnaire. Plus l'affinité entre l'analyte et la phase stationnaire augmente, plus l'interaction et donc la rétention du composant sur la phase stationnaire sera importante (Žuvela *et al.*, 2019). Ainsi, la vitesse de migration des différentes composantes d'un échantillon sera affectée en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Au niveau de la chromatographie liquide plus précisément, il existe différents types de colonnes pouvant être utilisées afin de séparer des molécules en se basant sur différents paramètres tels que la polarité avec les colonnes de type « hydrophilic interactions liquid chromatography (HILIC) », l'hydrophobicité avec les colonnes aux phases stationnaires composées de groupement à 8 ou 16 carbones (colonnes C8 et C16), la taille avec les colonnes d'exclusion stérique et même le pKa avec les colonnes échangeuses d'ions (López-Ruiz *et al.*, 2019). Dans la présente étude, une colonne de type HILIC a été utilisée. Dans ce type de chromatographie, la phase stationnaire peut être composée de différents groupements polaires tels que des groupements cyanopropyl, aminopropyl, diol et amide. Certaines colonnes HILIC peuvent également avoir une matrice à base de silice. (Buszewski et Noga, 2012). D'un point de vue mécanistique, ce type de chromatographie a recours à des phases organiques mobiles comportant un minimum de 2 à 3% d'eau. En effet, la présence d'eau est essentielle au bon fonctionnement de la chromatographie HILIC puisque celle-ci forme une mince couche qui tapisse les particules de la phase stationnaire, séparant cette dernière de la phase organique mobile. Cette couche d'eau permet notamment de solubiliser les composés polaires favorisant alors le transport des composés et permettant différents types d'interactions avec la phase stationnaire (Buszewski et Noga, 2012). Ce type de chromatographie a été privilégiée en raison de sa capacité à séparer différents isomères de structure au niveau des sucres. En effet, lors de la revue de littérature, il a été observé que le

galacostylsphingosine, une molécule qui est un isomère de structure du lyso-Gb<sub>1</sub>, est fortement augmenté chez les patients atteints de la maladie de Krabbe (Sidhu *et al.*, 2018). Ainsi, il est important d'être en mesure de bien séparer ces molécules pour pouvoir identifier avec certitude la structure des nouveaux biomarqueurs qui seront identifiés et qui seront apparentés à cette classe de molécules (par exemple des analogues du glucosylsphingosine). Nous avons également observé la présence de galactosylsphingosine dans les échantillons contrôles, ainsi que dans la matrice utilisée pour préparer la courbe de calibration pour les méthodes de quantification qui ont été développées suite aux études métabolomiques. Ainsi, pour éviter les biais potentiels liés à ces contaminants, il est bien important de séparer ces isoformes de manière à s'assurer de quantifier la bonne molécule et uniquement cette molécule. De plus, pour les méthodes de quantification ayant pour but de faire une détection précoce et le suivi des patients Gaucher, il est important d'être en mesure de séparer ces molécules afin d'éviter de mauvais résultats. Bien que le choix d'une colonne de type C8 ou C16 peut, à première vue, sembler un choix logique pour la séparation d'éventuels biomarqueurs issus d'une sphingolipidose, ce type de chromatographie ne permettrait pas la séparation pour des molécules étant des isomères de structure au niveau des sucres. Ainsi, afin de permettre ce type de séparation, une variété d'interactions peuvent contribuer à la rétention des molécules polaires sur la colonne HILIC. Effectivement, les matrices à base de silice, d'aminopropyl ou de diol par exemple peuvent toutes engendrer des interactions ion-dipôle, dipôle-dipôle, dipôle-dipôle induit, dipôles temporaires, forces de Van der Waals, ponts hydrogène et interactions donneur-accepteur (Greco et Letzel, 2013). Évidemment, la nature de la phase mobile, les propriétés physico-chimiques de l'analyte et de la matrice de la colonne dicteront la force de ces interactions et donc par le fait même la séparation entre les composantes de l'échantillon (Jandera et Hájek, 2018). En plus de la nature chimique de la colonne, les paramètres physiques peuvent également jouer un rôle important sur le pouvoir de séparation d'une colonne chromatographique. Effectivement, le débit, la longueur de la colonne, l'ajout de sels ou le changement de température sont tous des facteurs pouvant jouer un rôle crucial au niveau de la chromatographie (Greco et Letzel, 2013).

Premièrement, pour ce qui est de la longueur de la colonne employée, il est évident qu'une colonne plus longue implique davantage d'interactions potentielles entre l'analyte et la phase

stationnaire. Cette relation peut d'ailleurs être représentée sous la formule mathématique suivante:

$$(1) t_R = L/\mu_x$$

où  $t_R$  représente le temps de rétention,  $L$  représente la longueur de la colonne et  $\mu_x$  est le taux de migration de l'analyte dans la colonne (Barth, 2018).

Ainsi, pour deux colonnes de longueurs différentes ayant exactement la même phase stationnaire, deux analytes aux propriétés physico-chimiques similaires (tels que des isomères de structure par exemple) et donc qui ont des valeurs théoriques de  $\mu_x$  similaire, la longueur de la colonne ( $L$ ) peut faire la différence entre une bonne séparation ou non des deux composés d'intérêt. Lorsqu'il est question de chromatographie, l'équation de Van Deemter permet de comprendre l'influence de différents paramètres sur la résolution d'une séparation chromatographique. Ainsi, la relation peut être décrite par la formule mathématique :

$$(2) H = A + B/u + Cu$$

où  $H$  correspond au pouvoir de résolution d'une colonne,  $A$  fait référence à la diffusion axiale,  $B$  correspond à la diffusion longitudinale,  $C$  est en lien avec la notion de résistance au transfert de masse alors et finalement,  $u$  correspond au débit linéaire de la phase mobile (Barth, 2018). Les différents paramètres pouvant affecter les différentes composantes de l'équation de Van Deemter sont présentés au Tableau 4.

**Tableau 4.** Les paramètres qui influencent l'équation de Van Deemter

Équation de Van Deemter		
Paramètres		
A	B	C
Forme des particules*	Débit de la phase mobile	Taille des particules
Taille des particules*	Composition de la phase mobile	Porosité des particules*
Distribution des particules*		Épaisseur de la phase stationnaire

\*Fait référence aux particules de la phase stationnaire

De plus, il est également important d'aborder la notion de plateaux théoriques. En fait, cette notion fait référence au fait que lorsque le soluté se déplace au niveau de la colonne, il se crée une succession d'équilibres entre les composés présents au niveau de la phase mobile et de la phase stationnaire dans les différents plateaux théoriques (Barth, 2018). Ainsi, un plus grand nombre de plateaux est souhaitable. Ce terme est employé pour comparer le pouvoir de séparation ou performance de différentes colonnes chromatographiques (Barth, 2018). Plus le nombre de plateaux théoriques est élevé, plus la séparation chromatographique sera bonne. Pour une colonne chromatographique donnée, il est possible de calculer le nombre de plateaux théoriques par la formule:

$$(3) N = 16 \left( \frac{t_r^2}{w_t^2} \right)$$

où  $t_r$  correspond au temps de rétention d'un analyte donné et  $w_t$  correspond à la largeur du pic chromatographique de ce dernier (Barth, 2018). Différents paramètres, dont la longueur de la colonne ainsi que la composition de la colonne peuvent affecter le nombre de plateaux théoriques pour une colonne donnée. En effet, en plus du nombre de plateaux, la hauteur de ceux-ci peut influencer la séparation chromatographique (Barth, 2018). Il est possible de calculer la hauteur des plateaux théoriques par la formule:

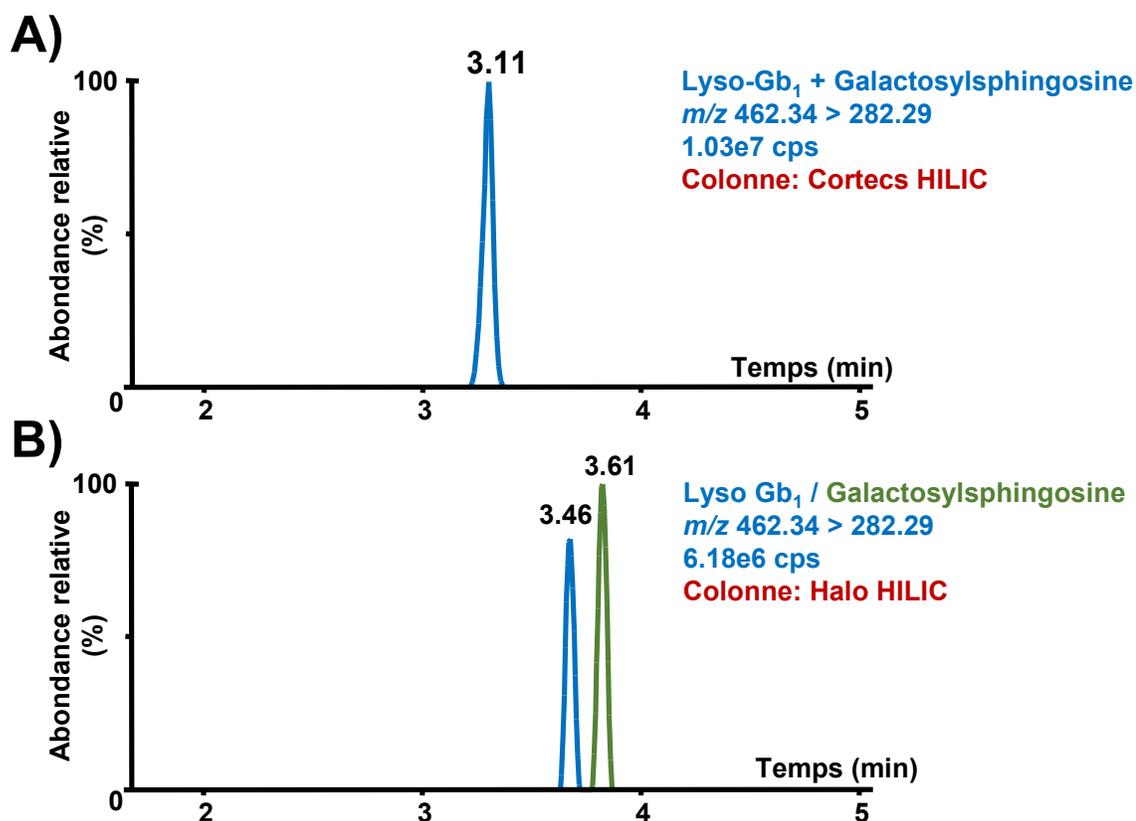
$$(4) H = L/N$$

Où  $L$  = longueur de la colonne,  $N$  = nombre de plateaux et  $H$  = la hauteur du plateau (Barth, 2018).

Pour ce type de calcul, il est souhaitable d'avoir une faible hauteur de plateau, et un nombre élevé de ceux-ci pour une meilleure séparation. Dans le cas de la présente étude, une colonne de longueur supérieure, soit de 150 mm, a été employée tant pour l'étude métabolomique que pour les méthodes de quantification afin de séparer adéquatement le glucosylsphingosine du galactosylsphingosine. Pour être plus précis, tant pour les méthodes de quantification que pour les études métabolomiques nous avons utilisé une colonne Halo HILIC produit par la compagnie « Advanced Materials Technology ». En plus de sa longueur, la colonne de type Halo possède une phase stationnaire unique qui permet de réduire grandement la diffusion des analytes dans la colonne, engendrant alors une meilleure résolution au niveau de la chromatographie (Kirkland *et al.*, ND). En effet, les colonnes Halo HILIC ont une phase

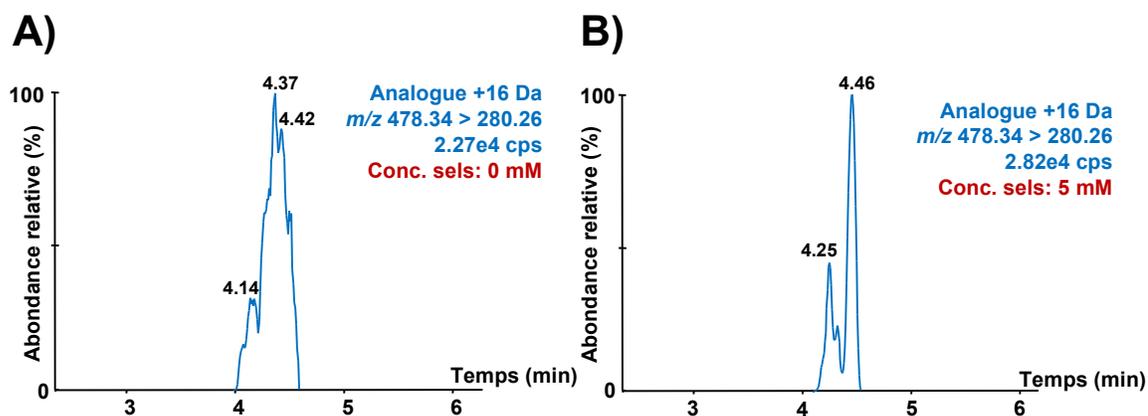
stationnaire à base de silice enrobée d'une coquille semi-poreuse. Ainsi, les trajets que peuvent prendre les différents analytes dans ce type de colonne sont grandement limités comparativement aux colonnes ayant les phases stationnaires à base de particules totalement poreuses (Kirkland *et al.*, ND). Cela réduit alors la diffusion de l'analyte dans la colonne. D'un point de vue théorique, cette approche qui utilise des particules partiellement poreuses réduit les composantes A et B dans la formule de Van Deemter dont il a été question précédemment (Kirkland *et al.*, ND). Lors du développement des méthodes quantitatives, des essais ont été faits à l'aide de différentes colonnes UPLC de type HILIC pour tenter de séparer le glucosylsphingosine et le galactosylsphingosine (Figure 4) soit la Halo HILIC ainsi que la CORTECS HILIC. Toutefois, seule la colonne Halo HILIC a été en mesure de séparer les deux isomères de sucres. Au niveau des phases stationnaires, la colonne CORTECS HILIC et Halo HILIC sont toutes deux des colonnes à base de silice. C'est toutefois au niveau du revêtement de cette silice que les deux colonnes sont différentes. En effet, les deux colonnes possèdent des coques semi-poreuses ce qui limite les voies pouvant être utilisées par les analytes pour interagir avec la phase stationnaire (Waters, ND). La nature ou la structure de la coque utilisée n'est toutefois pas spécifiée par les différentes compagnies. De plus, il est important de mentionner que la taille des deux colonnes testées est significativement différente (150 mm pour la Halo HILIC comparativement à 50 mm pour la CORTECS HILIC). Cet élément peut également jouer un rôle significatif dans la séparation de certains composés.





**Figure 4.** Tentative de séparation du lyso-Gb<sub>1</sub> du galactosylsphingosine avec la colonne CORTECS HILIC (2,1 x 50 mm, taille des particules de 1,7  $\mu$ m) en (A) et Halo HILIC (4,6 x 150 mm, taille des particules de 2,7  $\mu$ m) en (B). Malgré une diminution de débit à 0,3 ml et l'utilisation d'un gradient composé à 100% de phase mobile A (94,5:2,5:2,5:0,5 ACN: MeOH: H<sub>2</sub>O: HCOOH + 5 mM formate d'ammonium), il n'a jamais été possible de séparer les 2 isomères de sucres avec la colonne CORTECS HILIC (A). Une tentative a été réalisée à l'aide d'une colonne BEH Amide (2,1 x 50 mm, taille des particules de 1,7  $\mu$ m). Toutefois, les résultats ont été très semblables à ceux obtenus avec la colonne CORTECS HILIC. La colonne HALO HILIC (B) a quant à elle été en mesure de bien séparer les deux composés.

Deuxièmement, au niveau des sels, ceux-ci ont pour effets de fixer le pH grâce à un effet tampon et de réduire les interactions électrostatiques entre les analytes et la phase stationnaire. Une diminution de ces interactions peut engendrer une amélioration au niveau de la forme des pics chromatographiques observés (Greco et Letzel, 2013). Un exemple de ceci est présenté à la Figure 5.

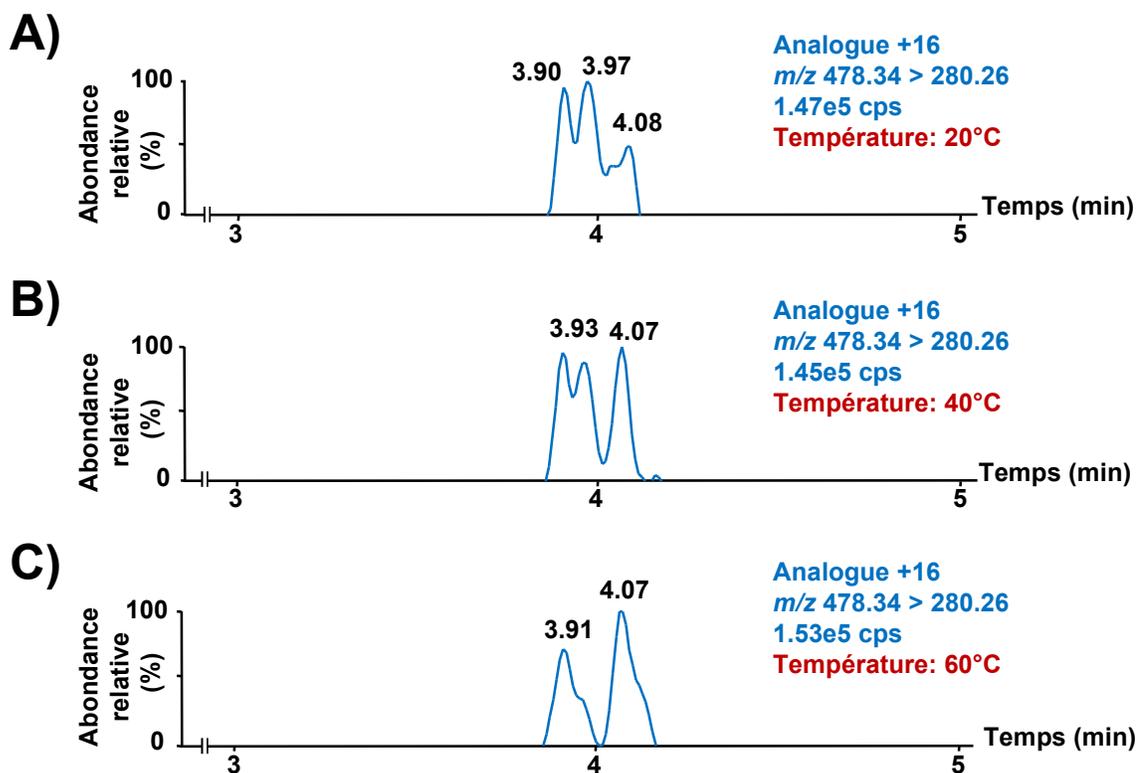


**Figure 5.** Optimisation de la chromatographie pour l'analogue +16 Da à l'aide d'ammonium formate. Différentes concentrations de sels comprises entre 0 et 20 mM ont été testées. Toutefois, les concentrations supérieures à 5 mM n'engendrent pas d'améliorations marquées au niveau de l'apparence du pic chromatographique ou de l'aire sous la courbe. En A) un exemple du pic chromatographique obtenu sans ajout de sels et en B) un exemple du pic chromatographique obtenu en ajoutant 5 mM d'ammonium formate.

Cette expérience avait pour but d'évaluer si l'ajout ou le retrait de sels pouvait améliorer la forme du pic chromatographique pour le lyso-Gb<sub>1</sub> +16 Da. Ainsi, différentes concentrations d'ammonium formate au niveau des phases mobiles allant de 0 à 20 mM ont été testées afin d'évaluer l'influence des sels sur la chromatographie. Il a été observé que pour les analyses avec des phases mobiles sans sels, le pic chromatographique représentant le lyso-Gb<sub>1</sub> +16 Da a plutôt la forme d'une traînée en raison d'interactions électrostatiques. Pour ce qui est des analyses avec des phases mobiles avec différentes concentrations de sels, des pics plus clairs et définis sont observés. Il est toutefois important de mentionner que sur le plan technique, l'usage d'une importante concentration de sels augmente les risques de blocages au niveau du chromatographe liquide ou de la source d'ionisation du spectromètre de masse et il peut engendrer un effet de suppression ionique. Il est donc important de trouver un bon compromis pour la concentration de sels à utiliser. Dans le cadre de la présente étude, une amélioration marquée au niveau de la forme des pics associés aux différents analytes a été observée lorsque des phases mobiles auxquelles une concentration de 5 mM d'ammonium formate a été ajoutée (voir la Figure 5B) par rapport à des analyses où des phases mobiles sans sels ont été

utilisées (voir la Figure 5A). Toutefois, une augmentation de la concentration de sels à 12.5 mM ou 20 mM de sels dans les phases mobiles n'a pas engendré d'amélioration marquée par rapport aux résultats obtenus à 5 mM de sels au niveau de l'apparence du pic chromatographique ou de l'aire sous la courbe. Ainsi, une concentration finale de 5 mM d'ammonium formate a été ajoutée aux phases mobiles utilisées pour les méthodes de quantification.

Troisièmement, l'influence de la température sur la chromatographie serait liée à l'enthalpie associée au transfert d'analytes entre la phase mobile et la phase stationnaire (Hao *et al.*, 2008). Effectivement, des hypothèses ont été émises à savoir que le transfert des analytes à partir de la composante organique de la phase mobile vers la couche aqueuse tapissant les matrices de la colonne HILIC est un processus exothermique (Greco et Letzel, 2013). Ainsi, l'augmentation de la température a pour effet de rendre ce processus plus difficile en raison de l'augmentation de l'énergie cinétique des analytes, ce qui limite donc les interactions entre l'analyte et la phase stationnaire. La Figure 6 démontre d'ailleurs l'influence que peut avoir la température lors du développement d'une méthode de séparation chromatographique. Le but de l'expérience présentée à cette Figure était d'optimiser l'apparence du pic chromatographique liée au lyso-Gb<sub>1</sub> +16 Da. La même méthode chromatographique réalisée à différentes températures a été utilisée pour analyser le même échantillon.



**Figure 6.** Changement de l'apparence des pics chromatographiques correspondant à l'analogue +16 Da mesurés dans le plasma à 20°C (A), 40°C (B) et 60°C (C). Le terme CPS fait référence aux comptes par seconde, qui correspond au signal en spectrométrie de masse et le terme « Température » indique la température à laquelle la séparation chromatographique par UPLC a été réalisée.

Ainsi, il est possible de constater qu'avec les mêmes phases mobiles et la même colonne chromatographique, la température joue un rôle important au niveau de la rétention du composé d'intérêt. Le changement de température change considérablement l'apparence des pics chromatographiques observables pour l'analogue +16 Da comme montré à la Figure 6 pour la température à 60°C. Évidemment, un usage prolongé de la colonne chromatographique à des conditions dites plus extrêmes peut avoir des effets néfastes sur la durée de vie de la colonne. Il est donc bien important d'optimiser adéquatement le paramètre de température de manière à obtenir une bonne séparation chromatographique tout maximisant la durée de vie de la colonne.

## 7.2 L'effet de matrice

Lors du développement d'une méthode de quantification en spectrométrie de masse, l'un des enjeux majeurs consiste à réduire au maximum l'effet de matrice. Comme décrit par Panuwet *et al.*, en 2016, l'effet de matrice fait référence à la différence au niveau de la réponse obtenue par spectrométrie de masse pour un analyte en solution standard comparativement à la réponse obtenue pour un même analyte, mais dans une solution biologique telle que l'urine, le plasma ou le sérum (Panuwet *et al.*, 2016). Cet effet de matrice peut grandement affecter la sensibilité et la sélectivité d'une méthode analytique donnée (Panuwet *et al.*, 2016). Concrètement, l'effet de matrice est issu de l'interaction des composés qui sont présents dans la matrice de l'échantillon tels que des sels, des glucides, des amines, l'urée, des lipides, des peptides et des métabolites qui peuvent altérer l'ionisation des analytes d'intérêt, entraînant alors un phénomène de suppression ou de rehaussement ionique (Panuwet *et al.*, 2016). En effet, lors du processus d'ionisation, il existe une certaine lutte entre les molécules pour capter ou retirer des protons. La présence de substances interférentes qui coéluent avec les ions d'intérêt peut influencer la viscosité ainsi que la tension de surface des gouttelettes obtenues suite au processus d'ionisation, ce qui peut alors compliquer le transfert des ions d'intérêt vers la phase gazeuse qui pénètre au niveau du spectromètre de masse (Panuwet *et al.*, 2016). Il est également important de mentionner que, dans certains cas, il est possible que les substances interférentes co-précipitent avec des substances non volatiles telles que des macromolécules ce qui affectera également le transfert des ions d'intérêt vers la phase gazeuse (King *et al.*, 2000). Il est donc important de documenter l'effet de matrice présent pour une méthode analytique donnée et d'utiliser des méthodes de purification adéquate telle que la purification par SPE employée dans le cadre de ce projet de recherche pour réduire au maximum cet effet de matrice.

Plusieurs moyens peuvent être utilisés afin d'évaluer l'impact de l'effet de matrice sur la méthode. Par exemple, lorsque des standards commerciaux des molécules à analyser sont disponibles, il est possible d'évaluer l'effet de matrice par la méthode de fortification. Cette méthode consiste à ajouter une concentration connue d'un standard à une matrice d'intérêt puis à évaluer la différence entre la concentration théorique et la valeur obtenue expérimentalement (Raposo et Barceló, 2021). Une valeur théorique supérieure à la valeur expérimentale est indicative d'un phénomène de suppression ionique alors que l'inverse

indique un phénomène de rehaussement ionique. L'avantage majeur de cette méthode est qu'elle indique précisément l'influence que peut avoir une matrice sur la quantification d'un analyte donné en termes de pourcentages. Toutefois, cette méthode requiert des standards commercialement disponibles, ce qui n'est pas toujours le cas, spécialement pour de nouveaux biomarqueurs comme ceux présentés dans le cadre de ce projet de doctorat. Pour ce type de situations, il est possible d'avoir recours à l'évaluation de l'effet de matrice par l'infusion post-colonne. Cette méthode implique en simultanée l'injection d'un échantillon contenant de la matrice, mais dépourvu de l'analyte d'intérêt ainsi que de l'infusion constante du standard d'intérêt ou d'une molécule aux propriétés physico-chimiques similaires (Raposo et Barceló, 2021). Ainsi, lors de l'analyse, il est possible de suivre en temps réel les variations du signal de la molécule infusée. Pour un même débit et une même phase mobile, une chute ou une hausse du signal de la molécule infusée par rapport au niveau basal est indicatif d'un effet de matrice. Ce phénomène est d'ailleurs illustré à la Figure 7 qui correspond aux tests d'évaluation de l'effet de matrice réalisés dans le cadre du développement de la méthode de quantification des biomarqueurs dans l'urine et qui se retrouve publier dans le cadre du 5<sup>e</sup> Article associé à cette thèse de doctorat.



**Figure 7.** Infusion post-colonne de standard de lyso-Gb<sub>1</sub>-(<sup>13</sup>C<sub>6</sub>) à une concentration de 1 µg/ml et un débit de 0,15 µl/min simultanée à l'injection d'un échantillon de contrôle.

Dans le cadre de l'expérience présentée à la Figure 7, un standard de lyso-Gb<sub>1</sub> marqué au carbone 13 à une concentration de 1 µg/ml a été infusé à un débit constant de 0,15 µl/min. Un gradient linéaire a été utilisé pour la région entre 0 et 6 minutes. Celui-ci variait de 96% de phase mobile A (correspondant à 94,5:2,5:2,5 :0,5 ACN:MeOH:H<sub>2</sub>O:HCOOH + 5 mM formate d'ammonium) à T = 0 min jusqu'à 80% de phase mobile A à T = 6 min. Ainsi, il est possible de constater à 1,72 min un important gain au niveau du signal (rehaussement du signal) suivi d'une importante perte de signal (suppression ionique) quelques secondes plus tard. Ces variations du signal sont causées par des composés qui éluent à ce moment précis. Cet effet peut être attribuable à des composés présents dans la matrice de l'échantillon qui relâchent une importante quantité de H<sup>+</sup> ce qui a pour effet de favoriser l'ionisation des composés ayant des temps de rétention similaires. Évidemment, ce type de phénomène entraîne un biais important lors de la quantification relative des biomarqueurs ciblés, puisqu'il peut être interprété comme une augmentation de la concentration de l'analyte alors

qu'en réalité il s'agit d'un changement au niveau de l'ionisation de celui-ci (et donc sans lien avec la concentration).

Toutefois, dans le cadre de la présente étude pour la région où élue le lyso-Gb<sub>1</sub> ainsi que les différents analogues, il est possible d'observer que le signal basal demeure relativement stable (Article 2 pages 151 et Article 4 page 231). La hausse du signal observé préalablement lors de la chromatographie n'a donc aucun impact sur l'analyse des molécules d'intérêt. En fait, puisque le signal demeure stable pour toute cette région, le standard interne sera en mesure de corriger l'effet de matrice pour les molécules d'intérêt localisées dans cette région en plus des variations pouvant survenir lors de la préparation des échantillons. Évidemment, l'utilisation d'un seul standard interne pour un groupe de molécules ayant différents temps de rétention n'est pas une solution idéale puisque ce standard interne ne sera pas en mesure de corriger des variations pouvant survenir lors de l'étape d'ionisation. Toutefois, compte tenu de la non-disponibilité de standard interne pour les nouveaux biomarqueurs découverts lors de l'étude métabolomique, il s'agit d'un compromis acceptable dans les circonstances. Donc, suite aux différentes étapes d'optimisation des paramètres chromatographiques, les paramètres suivants ont été utilisés pour la méthode de séparation chromatographique pour les études métabolomiques dans le plasma et dans l'urine (Tableau 5) et pour la méthode de quantification dans le plasma et dans l'urine (Tableaux 6-7). Ces paramètres ont également été présentés dans les Articles 1 à 4 aux pages 124 (Article 1), 145 (Article 2), 188 (Article 3) et 226 (Article 4).



**Tableau 5.** Méthode de séparation chromatographique en UPLC utilisée pour la séparation des constituants plasmatiques et urinaires lors des études métabolomiques non-ciblées respectives (Menkovic *et al.*, 2021; Menkovic *et al.*, 2022)

Paramètres	Description
Colonne chromatographique	Halo HILIC 2,7
Dimension de la colonne	4,6 x 150 mm
Taille des particules	2,7 µm
Température de la colonne	30°C
Solvant « Weak Wash »	94,5:2,5:2,5:0,5 ACN: MeOH: H <sub>2</sub> O: HCOOH + 5 mM formate d'ammonium
Solvant « Strong Wash »	ACN
Volume d'injection	10 µl
Température de l'échantillonneur	10°C
Phase mobile A	94,5:2,5:2,5:0,5 ACN: MeOH: H <sub>2</sub> O: HCOOH + 5 mM ammonium formate
Phase mobile B	10:89,5:0,5 ACN: H <sub>2</sub> O: HCOOH + 5 mM formate d'ammonium
Débit	0,5 ml/min
Gradient (% phase mobile B)	0,0 → 5,0 min: 0%
	5,0 → 20,0 min: 0-10% (gradient linéaire)
	20,0 → 25,0 min: 10%
	25,0 → 35,0 min: 10-60% (gradient linéaire)
	35,0 → 40,0 min: 60%
	40,0 → 45,0 min: 0%

Lors du développement de la méthode chromatographique pour l'étude métabolomique, les contraintes étaient beaucoup moins importantes que lors du développement de la méthode chromatographique pour la méthode de quantification des biomarqueurs. En fait, la seule contrainte était d'être en mesure de bien séparer le glucosylsphingosine du galactosylsphingosine. Également, dans le but de réduire l'effet de matrice au maximum afin d'observer les marqueurs de plus faible abondance qui pourraient potentiellement être masqués par cet effet de matrice, une méthode chromatographique assez longue de 45 minutes avec un changement de gradient très lent et à haute teneur en solvant organique a été utilisée. Il n'y a toutefois pas de moyens, à ce stade-ci, de s'assurer que toutes les molécules

d'intérêt associées à la maladie n'auront pas d'effets de matrice significatifs puisque ces molécules n'ont pas encore été identifiées.

**Tableau 6.** Paramètres chromatographiques en UPLC utilisés pour la méthode ciblée de quantification des biomarqueurs urinaires associés à la maladie de Gaucher (Menkovic *et al.*, 2022).

Paramètres	Description
Colonne chromatographique	Halo HILIC 2,7
Dimension de la colonne	4,6 x 150 mm
Taille des particules	2,7 µm
Température de la colonne	24°C
Solvant « Weak Wash »	ACN
Solvant « Strong Wash »	ACN
Volume d'injection	4 µl
Débit	0,85 ml/min
Température de l'échantillonneur	10°C
Phase mobile A	94,5:2,5:2,5:0,5 ACN: MeOH: H <sub>2</sub> O: HCOOH + 5 mM formate d'ammonium
Phase mobile B	10:89,5:0,5 ACN: H <sub>2</sub> O: HCOOH + 5 mM formate d'ammonium
Débit	0,85 ml/min
Gradient (% phase mobile B)	0,0 → 9,5 min: 12.5%
	9,5 → 11,0 min: 70.0%
	11,0 → 12,0 min: 12.5%

**Tableau 7.** Paramètres chromatographiques en UPLC utilisés pour la méthode de quantification des biomarqueurs plasmatiques associés à la maladie de Gaucher (Menkovic *et al.*, 2022).

Paramètres	Description
Colonne chromatographique	Halo HILIC 2,7
Dimension de la colonne	4,6 x 150 mm
Taille des particules	2,7 µm
Température de la colonne	60°C
Solvant « Weak Wash »	ACN
Solvant « Strong Wash »	ACN
Volume d'injection	3 µl
Température de l'échantillonneur	10°C
Phase mobile A	94,5:2,5:2,5:0,5 ACN: MeOH: H <sub>2</sub> O: HCOOH + 5 mM formate d'ammonium
Phase mobile B	10:89,5:0,5 ACN: H <sub>2</sub> O: HCOOH + 5 mM formate d'ammonium
Débit	0,85 ml/min
Température de l'échantillonneur	10°C
Gradient (% phase mobile B)	0,0 → 1,0 min: 15%
	1,0 → 6,0 min: 15%
	6,0 → 7,0 min: 60% (Gradient linéaire)
	7,0 → 10,0 min: 60%
	10,0 → 12,0 min: 15%

Contrairement à la méthode chromatographique développée pour les études métabolomiques, il était important de produire une méthode relativement courte pour les méthodes de quantification considérant le nombre d'échantillons à analyser. De plus, l'optimisation chromatographique des méthodes quantitatives était beaucoup plus complexe puisque nous devions tenir compte de l'influence de l'effet de matrice, car il s'agit de méthodes de quantification relative pour certaines molécules et de quantification absolue pour le lyso-Gb<sub>1</sub>. Les séparations chromatographiques associées à ces paramètres sont présentées en détail aux

Figures 2 et 4 de l'Article 2 aux pages 150 et 153 ainsi à la Figure 3 de l'Article 4 à la page 230.

## **8 La spectrométrie de masse**

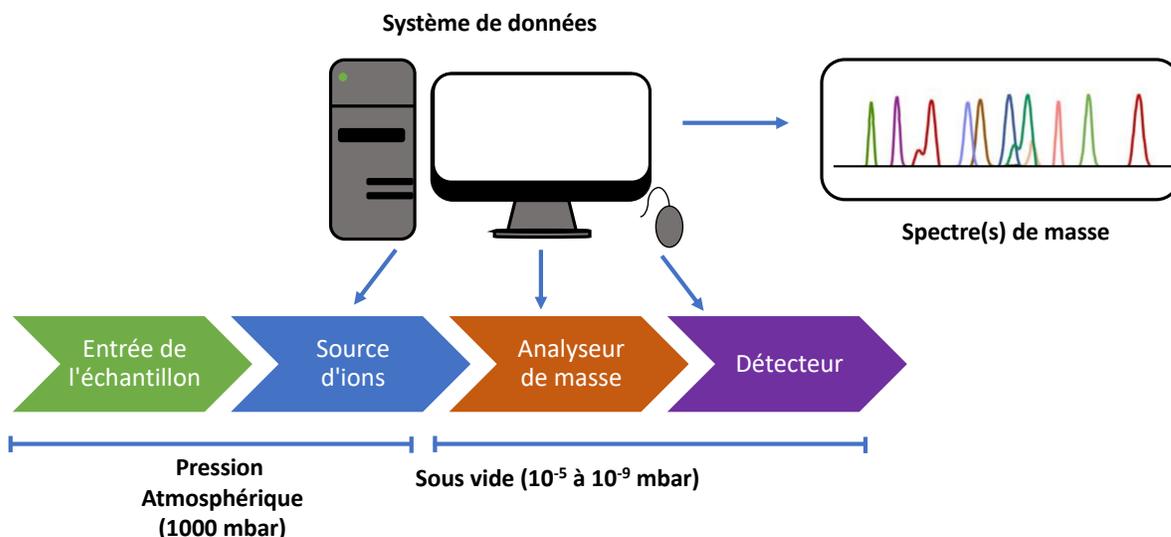
Le premier spectromètre de masse a été construit en 1912 par Joseph John Thomson (Yates, 2011). Quelques années plus tard, F.W Aston et A. J. Dempster, des étudiants de Thomson, ont par la suite été en mesure de développer des versions plus avancées du spectromètre de masse (Yates, 2011). Cet appareil a été utilisé pour démontrer l'existence des isotopes non radioactifs par Aston en 1920 avec la découverte du  $^{20}\text{Ne}$  et du  $^{22}\text{Ne}$  (Yates, 2011). Vers les années 1940, bien que les spectromètres de masse soient commercialement disponibles, le fonctionnement de ceux-ci demeure très peu compris. Ainsi, son usage était limité à certains domaines précis comme l'industrie pétrolière afin d'évaluer l'abondance de petits hydrocarbures (Griffith, 2008). En 1980, alors que les petites molécules organiques sont analysées de routine par spectrométrie de masse, les macromolécules telles que les acides nucléiques, les glucides ou les protéines ne peuvent toujours pas être analysées en raison de problèmes liés aux méthodes d'ionisation qui étaient utilisées à l'époque (Griffith, 2008). Plus précisément, pour les macromolécules, il n'était pas possible de produire des ions en phase gazeuse sans fragmentation trop importante de l'ion moléculaire (Griffith, 2008). C'est finalement grâce au développement de l'ionisation par électrospray (« electrospray ionization, ESI ») par John Fenn, près d'une dizaine d'années plus tard, que le problème d'ionisation des macromolécules a été résolu (Griffith, 2008). Ces travaux ont d'ailleurs mérité à Fenn le prix Nobel conjoint de chimie en 2002 (avec Tanaka qui a travaillé sur l'ionisation par désorption laser assistée par matrice) (Steckel et Schlosser, 2019). De nos jours, la spectrométrie de masse est utilisée dans différents domaines pour un large éventail d'applications et ce, sans limitations par rapport aux composés à analyser.

### ***8.1 Les principes de bases***

Aujourd'hui, la spectrométrie de masse est un outil technologique très versatile qui permet d'identifier, de quantifier et de caractériser un ou un ensemble de composés dans différentes matrices. Évidemment, les spectromètres de masse ont grandement évolué pour en arriver à ce point. Toutefois, malgré toute cette évolution et l'apparition de nouvelles techniques, que ce soit au niveau du mode d'ionisation, de l'analyseur de masse ou du détecteur, les principes de bases du fonctionnement des spectromètres de masse sont demeurés sensiblement les

mêmes. L'usage d'un spectromètre de masse implique inévitablement : 1) La production d'ions en phase gazeuse à partir de l'échantillon à analyser; 2) La séparation des ions générés en fonction de leurs rapports masse sur charge ( $m/z$ ); et finalement: 3) La détection des ions (Rockwood *et al.*, 2018). D'ailleurs il est important de bien comprendre la notion de  $m/z$  puisqu'il s'agit là d'un concept fondamental en spectrométrie de masse. Celui-ci fait référence à la masse d'un composé divisé par la charge de celui-ci. Par exemple, si un métabolite possède une masse de 300 Da et une charge de +1, son rapport masse sur charge est égal à  $(300 + 1_{\text{proton}}) / 1_{\text{charge}}$  donc 301. Dans le cas où la même molécule de 300 Da est doublement chargée, son rapport masse sur charge devient alors  $(300 + 2_{\text{protons}}) / 2_{\text{charges}} = 151$ . Si la même molécule est triplement chargée,  $m/z = (300 + 3_{\text{protons}}) / 3_{\text{charges}} = 101$  et ainsi de suite. Le gain de masses et de charges peut également être généré par la présence d'adduits métalliques comme le sodium (+23 unités de masse; +1 charge). Par exemple une molécule de lyso-Gb<sub>1</sub> protonée aurait un rapport  $m/z$  de 462 Da alors que cette même molécule aurait un rapport  $m/z$  de 484 avec un adduit sodium soit  $(461 + 23_{\text{unités de masse}}) / 1_{\text{charge}}$ . Ce phénomène est également possible d'autres types d'adduit comme un ammonium (+18 unités de masse; +1 charge). Il est aussi important de mentionner que l'ionisation peut également se faire en mode négatif avec la perte d'un proton (-1 unité de masse; charge -1) ou ajout d'un adduit chargé négativement comme le Cl<sup>-</sup> (+35 unités de masse; charge -1). Également, il est important de mentionner le cas où certains atomes, qui sont normalement présent sur la molécule acquièrent une charge (ex : ammonium quaternaire). Dans ces situations bien précises, l'ion précurseur acquiert une charge, mais la masse demeure inchangée. En fait, le type d'ionisation à favoriser dépendant grandement des propriétés physiques et chimiques des analytes.

Au niveau de la structure générale, les spectromètres de masse ont les mêmes types de composantes comme démontré à la Figure 8 (Smith et Thakur, 2010). Évidemment, pour chacune de ces composantes, il existe différentes options disponibles ce qui peut faire en sorte qu'une modalité soit meilleure qu'une autre dans le cadre d'un type d'analyse précis.



**Figure 8.** Composantes principales d'un spectromètre de masse (Gross et Roepstorff, 2014).

Premièrement, pour ce qui est de l'introduction de l'échantillon au niveau du spectromètre de masse, il existe différentes approches possibles. Dans le cas d'un échantillon pur, liquide ou gazeux, l'injection directe ou l'utilisation d'une sonde d'insertion directe peut être employée (Smith et Thakur, 2010). Toutefois, lorsque l'échantillon implique une matrice complexe comme ce fut le cas dans le cadre de ce projet de recherche avec l'urine et le plasma, il est impératif d'utiliser l'approche dynamique qui implique une séparation de l'échantillon en ses différentes composantes avant l'étape d'ionisation. Cette séparation peut être réalisée à l'aide d'un chromatographe de type HPLC (High Performance Liquid Chromatography), UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) ou même GC (Gas Chromatography) (Smith et Thakur, 2010). Dans la présente étude, un chromatographe de type UPLC a été utilisé tant pour l'étude métabolomique que pour la méthode de quantification. Une fois l'étape de séparation complétée, les composantes de l'échantillon sont transférées vers la source d'ions du spectromètre de masse qui, comme son nom l'indique, aura pour fonction de générer des ions à partir des composantes de l'échantillon. Encore une fois, plusieurs options sont disponibles en fonction des visées et des propriétés physico-chimiques des molécules ou des matrices à analyser. Au niveau du mode d'ionisation, il est important de mentionner les 2 grands types d'ionisation soit l'ionisation dite douce qui génère des ions moléculaires stables à nombre pair d'électrons (par exemple : l'électronébulisation, la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI), ou

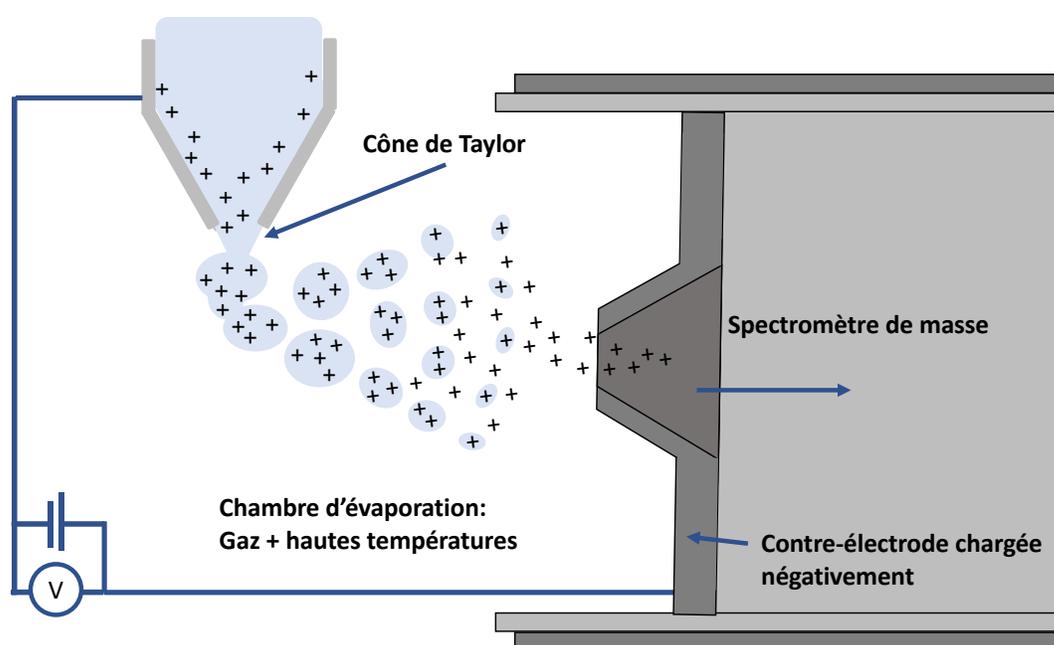
l'ionisation chimique à pression atmosphérique) et l'ionisation dite dure qui produit des ions radicaux (par exemple: l'ionisation par impact électronique). Évidemment chaque type d'ionisation a ses propres avantages et désavantages. L'ionisation par impact électronique génère un nombre important de fragments, ce qui peut être utile pour confirmer la présence d'une molécule (Wang *et al.*, 2018). En revanche, il peut être très difficile de reconstruire une molécule inconnue à partir des fragments obtenus suite à l'ionisation par impact électronique (Portolés *et al.*, 2011; Steckel et Schlosser, 2019). Ainsi, compte tenu des visées du présent projet, une ionisation de type douce était à privilégier. Nous avons donc opté pour l'usage de l'électronébulisation dans le cadre de ce projet en raison de la grande versatilité de ce mode (Garcia-Ac *et al.*, 2011).

### **8.2 L'électronébulisation**

Ce type d'ionisation a été utilisé pour les méthodes de quantification ainsi que les études métabolomiques. Introduit en 1989, l'ionisation par électronébulisation (ESI) est une méthode d'ionisation douce fréquemment utilisée en spectrométrie de masse pour l'analyse de composés biologiques tels que des protéines, des acides nucléiques ou autres macromolécules (Banerjee et Muzumdar, 2012). Ce type d'ionisation est qualifié d'ionisation douce puisque relativement peu d'énergie résiduelle est conservée par les différents analytes suite à l'ionisation et, de façon générale, il n'y a pas ou très peu de fragmentation subséquente des analytes suite à l'étape d'ionisation (Banerjee et Muzumdar, 2012).

Au niveau du processus d'ionisation, l'ESI implique le passage d'une solution contenant les analytes à travers un capillaire auquel est appliqué une différence de potentiel afin de produire un champ électrique. C'est alors que se produit une réaction d'oxydo-réduction, c'est-à-dire le transfert d'électrons vers ou à partir du capillaire vers le solvant ou l'inverse selon la polarité à laquelle le système est utilisé (Gross et Roepstorff, 2014). C'est alors que les éléments chargés produisent un mouvement des charges de manière à sélectionner une polarité en particulier puis à diriger ces charges vers la surface du liquide à l'extrémité du capillaire. Ultiment, ces mouvements de charges combinés à la tension de surface créent à l'apex du capillaire le cône de Taylor (Gross et Roepstorff, 2014). Lorsque la répulsion coulombienne entre les ions de même polarité surpasse la tension de surface du liquide, des gouttelettes chargées d'ions seront expulsées à partir d'un jet issu du cône de Taylor pour

être dirigées vers une contre-électrode qui consiste en un capillaire chauffé (Banerjee et Muzumdar, 2012). Suite à l'éjection du cône de Taylor, les gouttelettes sont soumises à de hautes températures ainsi qu'à des gaz nébulisants. Ces deux éléments auront pour effet d'évaporer une partie du solvant jusqu'à ce que le champ électrique devienne tellement fort, qu'il se produit un second phénomène de cône de Taylor qui éjectera de plus fines gouttelettes chargées. Ce processus est répété jusqu'à obtention d'ions en phase gazeuse uniquement (Wilm 2011; Banerjee et Muzumdar, 2012). Ce sont donc ces ions produits qui seront séparés par l'analyseur de masse présent au niveau de l'instrument. Un exemple schématisé de l'ionisation par électronébulisation est présenté à la Figure 9.



**Figure 9.** Exemple schématisé de l'électronébulisation en mode positif (adapté de Hendrickson, 2021).

Pour ce qui est des analyseurs de masse, plusieurs options existent et chacune de ces modalités possède ses avantages et ses désavantages. En effet, différents paramètres tels que l'étendue de  $m/z$  à analyser, la masse de l'analyte, le pouvoir de résolution requis, la capacité à conjuguer un analyseur de masse à une source d'ions particulière et finalement la limite de détection à atteindre (Gross et Roepstorff, 2014). Ainsi, pour répondre aux visées du projet de recherche nous avons dû avoir recours à deux différents analyseurs de masse soit : 1) le



quadripole-temps de vol (QTOF), un instrument hybride à haute résolution pour la découverte des biomarqueurs en raison de son haut pouvoir de résolution de masse et de sa grande sensibilité en mode balayage qui seront très utiles pour le processus de découverte des biomarqueurs et pour leur élucidation structurale; et 2) le triple quadripôle pour la méthode de quantification en raison de sa sensibilité accrue en mode «Multiple Reaction Monitoring (MRM)» afin d'être en mesure d'atteindre de plus faibles limites de détection.

### **8.3 La spectrométrie de masse en temps de vol**

Le temps de vol a uniquement été utilisé pour les études métabolomiques. Ce type d'analyseur de masse qui comprend un pulseur d'ions ainsi qu'un tube de temps de vol. Certains spectromètres de masse comprennent également un miroir d'ions également appelé réflectron qui aide à augmenter la résolution des  $m/z$  mesurés (Agilent, 2016). Les ions arrivent au niveau de l'analyseur de masse et plus précisément au pulseur d'ions à un angle de  $90^\circ$  puis, une pulsation de haute tension de même polarité que les ions est appliquée dans le but d'accélérer les ions vers le tube de temps de vol. Les ions auront une vitesse variable en fonction de leur rapport masse sur charge respectifs. C'est donc la durée du parcours au niveau du tube de temps de vol qui servira à déterminer le rapport masse sur charge d'un ion précis (Gross et Roepstorff, 2014). Les principes derrière le temps de vol peuvent être décortiqués plus en détail à l'aide de l'équation d'énergie cinétique suivante :

$$(5) E_{\text{pot}} = qU = ezU$$

$$(6) = E_{\text{cin}} = \frac{1}{2}mv^2$$

où  $E_{\text{pot}}$  correspond à l'énergie potentielle,  $q$  à la charge et  $U$  au voltage,  $e$  au nombre de charges,  $z$  à la charge. Dans (6)  $E_{\text{cin}}$  correspond à l'énergie cinétique,  $m$  correspond à la masse et  $v$  à la vitesse de la particule. Dans l'analyseur de masse de type temps de vol, l'énergie potentielle conférée aux ions est convertie en énergie cinétique. Ce qui permet d'obtenir l'équation suivante :

$$(7) E_{\text{pot}} = ezU = \frac{1}{2}mv^2 = E_{\text{cin}}$$

À partir de la formule présentée en (7). Il est possible d'isoler la variable de la vitesse ( $v$ )

$$(8) v = \sqrt{\frac{2ezU}{m}}$$

De plus, lorsque l'on considère la formule de distance :

$$(9) v = d/t$$

où  $t$  correspond au temps,  $d$  à la distance et  $v$  à la vitesse. Il est possible d'insérer l'équation 8 dans l'équation 9 pour obtenir :

$$(10) \sqrt{\frac{2ezU}{m}} = d/t$$

Finalement, il est possible de réarranger la formule (10) afin de l'exprimer en termes de rapport  $m/z$

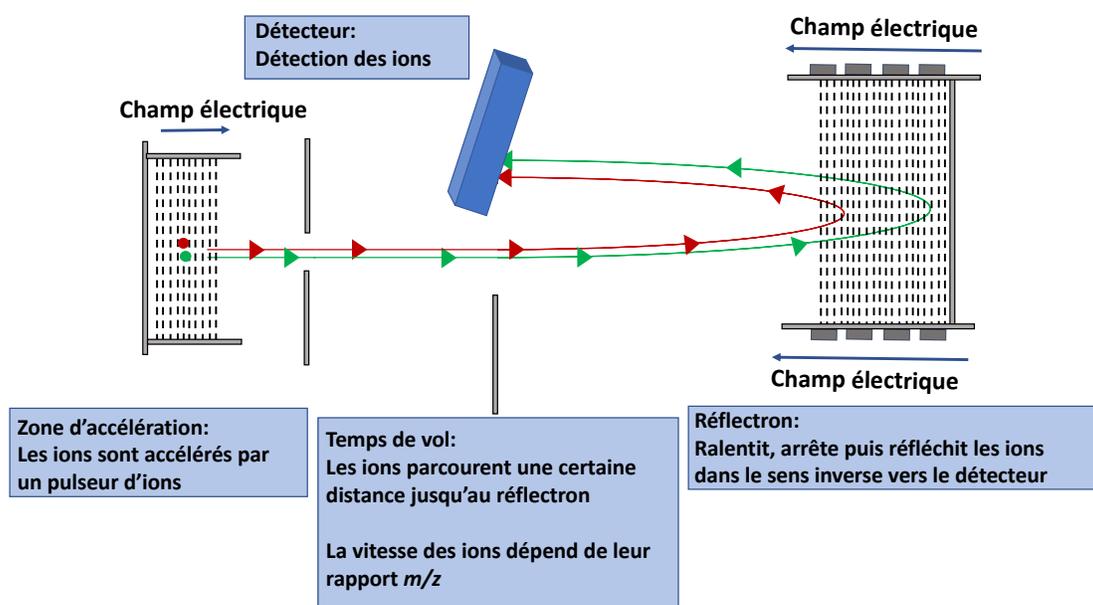
$$(11) m/z = 2eUt^2 / d^2$$

À partir de la formule présentée en (11), il est possible de réarranger la formule afin d'exprimer le temps ( $t$ ) en fonction du rapport  $m/z$  avec la formule suivante :

$$(12) t = \frac{d}{\sqrt{2eU}} \sqrt{\frac{m}{z}}$$

Puisque l'énergie cinétique appliquée par le pulseur d'ions est la même pour tous et que la distance parcourue ( $d$ ) dans le tube de temps de vol est constante, le rapport masse sur charge ( $m/z$ ) de l'ion est directement liée au temps ( $t$ ) requis à l'ion pour traverser le tube de temps de vol pour se rendre au niveau du détecteur (Gross et Roepstorff, 2014). Ainsi, en se basant sur ces formules, il est possible de déduire que plus un ion a un faible rapport masse sur charge ( $m/z$ ), plus le temps de vol sera court. Le miroir d'ions ou réflectron quant à lui a pour fonction de ralentir, arrêter puis réfléchir des ions vers une direction opposée (Hamid et Mirzaei, 2016). Ce changement de trajectoire pour les ions au sein du tube de temps de vol aura pour effet d'allonger la distance de vol et par le fait même d'améliorer la résolution, c'est-à-dire la capacité de l'appareil à distinguer des ions de masse très similaire. Également, cet effet « trampoline » corrigera les variations d'énergie cinétique (Gross et Roepstorff,

2014). Effectivement, si deux ions de même masse acquièrent une énergie cinétique différente, l'ion ayant plus d'énergie pénétrera davantage le champ électrostatique présent au niveau du réflectron avant d'être réfléchi comparé à un ion ayant moins d'énergie cinétique. Cette correction permettra ultimement aux ions de même masse d'arriver en même temps au niveau du détecteur. Un schéma du temps de vol est présenté à la Figure 10.



**Figure 10.** Coupe schématique d'un analyseur de masse en temps de vol. L'ion vert et l'ion rouge sont des ions de même  $m/z$  qui ont toutefois des énergies cinétiques légèrement différentes en raison du positionnement des ions. Le réflectron parvient toutefois à corriger ces variations afin que les deux ions touchent le détecteur au même moment.

Ainsi, la technologie de temps de vol permet d'atteindre un haut niveau de résolution, c'est-à-dire la capacité de distinguer deux ions ayant des rapports  $m/z$  similaires. Cette haute résolution (pouvoir de résolution = 8000), notamment pour des ions non ciblés, s'avère être un atout indispensable pour la découverte et l'élucidation des structures de nouveaux biomarqueurs (Rochat, 2018). Effectivement, grâce à cette haute résolution, il sera possible, à l'aide de logiciel, de calculer la composition élémentaire d'un ion ou d'un fragment d'intérêt. Cette composition servira alors à élucider la structure d'une molécule ou d'un fragment, comme ce fut le cas dans la présente étude. Dans l'exemple des tests de fragmentation, l'appareil sera utilisé dans un mode hybride soit en mode quadripôle-temps

de vol. La combinaison de ces deux modes d'analyse permet d'isoler un ion ciblé au niveau du quadripôle, puis de monitorer les ions issus de la fragmentation de l'ion précurseur avec un haut niveau de précision au niveau des masses exactes à l'aide du spectromètre de masse en temps de vol. Par exemple, lors de l'élucidation de la structure du lyso-Gb1, le quadripôle, un type d'analyseur de masse dont le fonctionnement sera abordé dans la prochaine section, a été employé dans le but d'isoler un ion précurseur à 462.3431 Da. Puis, une rampe d'énergie de collision allant de 15 à 25 volts a été utilisée au niveau de la cellule de collision localisée entre le quadripôle et le temps de vol afin de produire les différents fragments visibles. Les différences entre les deux valeurs sont exprimées en ppm sous la structure. Les formules chimiques proposées pour chacun des fragments correspondent à l'une des trois premières compositions élémentaires proposées par le logiciel MassLynx (Water Corp.). D'ailleurs, il est important ici de faire une brève parenthèse sur le terme « ppm », sa signification ainsi que son utilité. Tout d'abord, le terme ppm en spectrométrie de masse est utilisé pour quantifier l'écart mesuré entre les masses exactes théoriques et les valeurs obtenues expérimentalement (Brenton et Godfrey, 2010). Afin de calculer l'erreur de justesse de masse en ppm, il est possible d'utiliser la formule suivante :

$$(13) \left( \frac{m_{exp} - m_{théo}}{m_{théo}} \right) \times 10^6 \text{ ppm} = \text{l'erreur de justesse de masse en ppm}$$

où  $m_{exp}$  est la masse mesurée par le spectromètre de masse pour une molécule donnée et  $m_{théo}$  correspond à masse exacte pour cette même molécule. Il est à noter ici que cette différence de masse peut être positive ou négative. Ainsi, ce qui est souhaité ici sont des valeurs en ppm qui sont le plus près de 0 possible.

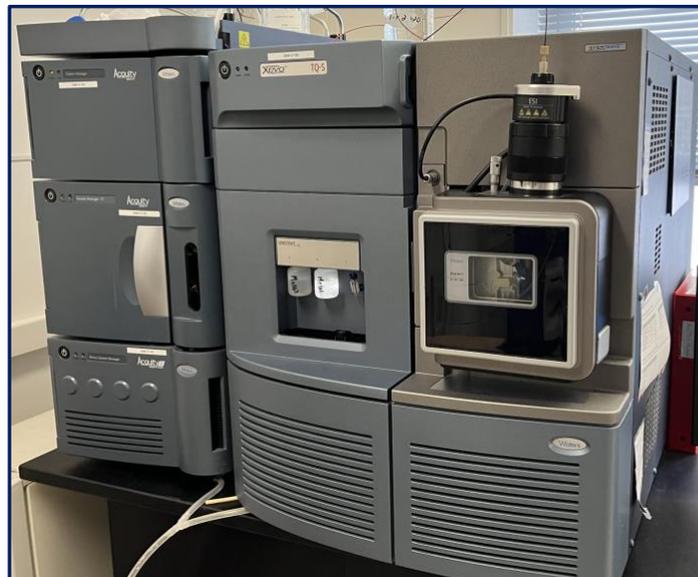
Un exemple d'élucidation de structures suite aux tests de fragmentation est présenté à la Figure 5 de l'Article 1 à la page 114. Il est à noter que cette méthodologie a été utilisée dans le cadre des études métabolomiques dans le plasma et dans l'urine. Cette approche a donc permis d'élucider la structure d'un nombre important de biomarqueurs potentiels en se basant uniquement sur le spectre de fragmentation ainsi que la masse exacte des différents fragments observés. Il est bien évident que sans cette grande précision possible grâce au temps de vol, l'élucidation de structures des biomarqueurs mis en évidence par l'étude métabolomique aurait été significativement plus complexe. Il s'agit donc là d'un atout très important pour

nos études. En ce qui concerne la spectrométrie de masse en temps de vol, un calibrant de masse en continue (standard externe) est également utilisé. Dans le cas des études présentées aux Articles 1 et 3, la terfénadine a été utilisée comme calibrant de masse. Nous avons opté pour ce produit puisqu'il est relativement peu dispendieux, stable, facilement ionisable par électronébulisation en polarité positive et puisque son  $m/z$  (472.3215) se situe approximativement au milieu de l'étendue de masse considérée soit 50 à 1000 Da. La terfénadine est donc infusée en même que les échantillons sont analysés et l'appareil alterne entre les 2 éléments soit le calibrant et l'échantillon. Ce type de calibration en continue est essentiel pour obtenir des résultats précis quant aux rapports  $m/z$  mesurés pour les différents métabolites ou leurs fragments (dans le cas des tests de fragmentation).

Cependant, bien que dotée d'une grande résolution (résolution = 8000) au niveau des masses mesurées, la sensibilité de ce type d'appareil peut être une contrainte majeure dans certains cas. Effectivement, dans le cas de la quantification de certaines molécules ciblées, il est préférable d'utiliser un autre type d'appareil comme un spectromètre de masse en tandem de type triple quadripôles (QqQ). Lorsque nous comparons la sensibilité du Xevo TQ-S (Waters Corp.), un spectromètre de masse de type QqQ utilisé en laboratoire, au Synapt G1, un spectromètre de masse de type QTOF, il est possible d'observer une sensibilité supérieure de l'ordre de 100 à 1000 fois pour le Xevo TQ-S pour l'analyse des molécules ciblées (Figure 11).



**Synapt G1 (Waters Corp.)**



**Xevo TQ-S (Waters Corp.)**

**Figure 11.** Appareils utilisés dans le cadre de ce projet de doctorat. À gauche, le Synapt G1, un spectromètre de masse QTOF utilisé pour les études métabolomiques et la découverte de biomarqueurs. À droite, le Xevo TQ-S, un spectromètre de masse QqQ utilisé pour les études de quantification des biomarqueurs.

Cette sensibilité accrue permet d'avoir de meilleures limites de détection et limites de quantification pour les marqueurs d'intérêt. Un exemple de l'apport potentiel de ce gain a d'ailleurs pu être observé lors de l'étape de validation. Suite à l'étude métabolomique, pour les échantillons contrôles, aucun échantillon ne présentait des traces de lyso-Gb<sub>1</sub> alors qu'en réalité, selon ce qui a été observé suite à l'analyse du même échantillon par Xevo TQ-S, une concentration moyenne de 1,22 nM a été observée.

Ceci valide l'approche expérimentale privilégiée dans le cadre de ce projet d'utiliser un spectromètre de masse QqQ afin de produire une méthode de quantification hautement sensible et robuste.

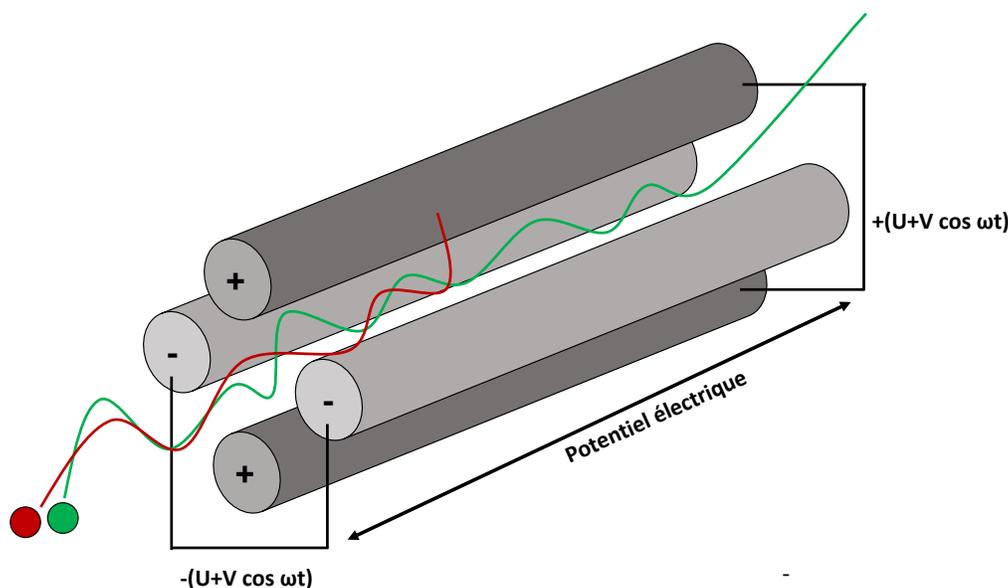
#### **8.4 La spectrométrie de masse QqQ**

Les spectromètres de masse de type QqQ sont les plus utilisés pour les analyses quantitatives ciblées. De manière individuelle, un quadripôle est composé de 4 tiges métalliques pairées en parallèle et interconnectées par un circuit électrique. Parmi ces 4 tiges, deux tiges sont chargées positivement alors que les deux autres sont chargées négativement. Suite à l'ajout

simultané d'un courant électrique continu (DC) et d'un courant alternatif (AC) précis, il se crée un champ électrique dans lequel seuls les ions de rapport  $m/z$  sélectionnés auront une trajectoire stable et donc parviendront à traverser le quadripôle (Gross et Roepstorff, 2014). De manière plus précise, il est possible de décrire le voltage appliqué aux tiges métalliques par la formule mathématique :

$$(12) U+V \cos \omega t$$

où  $U$  est la contribution du DC alors  $V \cos \omega t$  est la contribution du courant AC (Gross et Roepstorff, 2014). Dans formule décrivant le voltage généré par l'AC,  $V$  correspond à l'amplitude,  $\omega$  à la fréquence angulaire et finalement  $t$  représente le temps. C'est cette combinaison du DC et de l'AC qui aura pour effet de créer un champ électrique dynamique sur les axes X et Y dans lequel seul un ion ayant un  $m/z$  précis aura une trajectoire stable. Les autres ions, en raison de leurs trajectoires instables, seront éventuellement déviés vers l'une des tiges de polarité inverse pour être neutralisés (Figure 12) (Gross et Roepstorff, 2014)

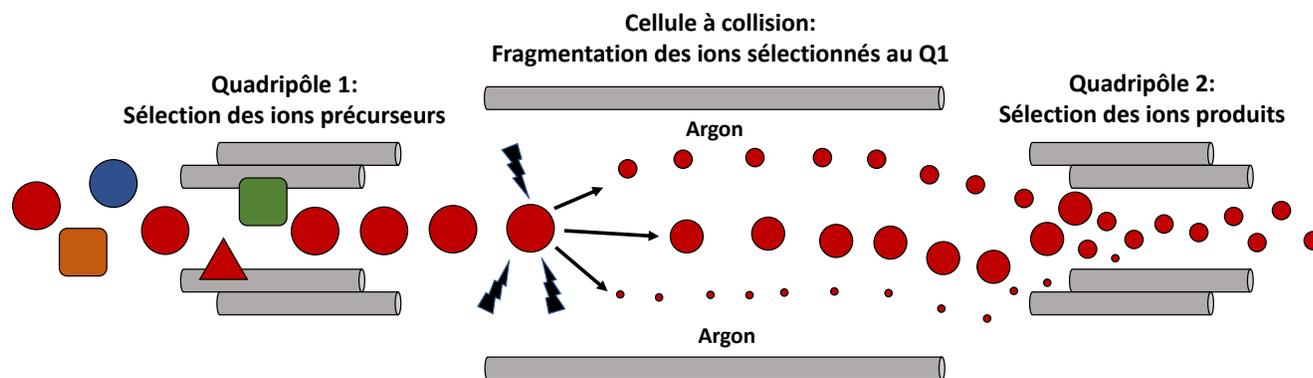


**Figure 12.** Coupe schématique d'un quadripôle. Le potentiel électrique généré par les tiges de polarité opposée crée un champ électrique dans lequel seuls les ions de  $m/z$  sélectionnés auront une trajectoire stable (en vert) lors du passage de ceux-ci au niveau de l'analyseur de masse. Les ions non sélectionnés (en rouge) seront éventuellement déviés vers l'une des

tiges de polarité inverse pour être neutralisés et éliminés par les pompes à vide. (Gross et Roepstorff, 2014).

Ainsi, ce sont uniquement les ions d'intérêt (analytes) qui seront en mesure de se rendre au niveau de la cellule de collision (dans le cas des ions précurseurs qui traversent le premier quadripôle) ou bien au détecteur (dans le cas des ions produits qui traversent le second quadripôle). Pour ce qui est du Xevo TQ-S, celui-ci comprend 2 quadripôles séparés par une cellule de collision. Effectivement, dans le mode d'analyse « monitoring de réactions multiples (MRM) » qui a été employé dans le cadre des analyses réalisées pour ce projet, le premier quadripôle a pour fonction d'isoler un ion précurseur issu de la source d'ions. Cet ion pénètre dans la cellule à collision avec une énergie variable où il est fragmenté suite à des collisions avec un gaz inerte tel l'argon (utilisé dans ce projet) présent à une pression de  $10^{-4}$  à  $10^{-2}$  mbar de manière à générer des ions produits (également appelés ions filles) (Lindon *et al.*, 2010). Tous ces ions sont guidés par des radiofréquences pour maintenir une trajectoire stable lors du passage dans la cellule à collision vers le second quadripôle (Lindon *et al.*, 2010). Ce 2<sup>e</sup> quadripôle quant à lui opère de façon similaire au premier, c'est-à-dire qu'il isole un ion d'intérêt précis issu de la fragmentation de l'ion précurseur. Il est possible d'utiliser différents modes de balayage au premier ou au deuxième quadripôle. Même si plusieurs options sont disponibles quant aux différents modes d'analyse, dans le cadre de cette étude, nous avons privilégié l'analyse par monitoring de réactions multiples (« Multiple Reaction Monitoring, MRM »). Grâce à ce mode d'analyse, nous nous assurons d'avoir un haut degré de sensibilité puisque le quadripôle est fixé sur une masse précise (il n'a donc pas besoin de faire un balayage, ce qui diminue rapidement la sensibilité) et de spécificité puisque l'ion moléculaire et un fragment issu de cet ion sont analysés. ». Une coupe schématique du triple quadripôle opéré en mode MRM utilisé pour les méthodes de quantification est présentée à la Figure 13.





**Figure 13.** Fonctionnement de l'analyse en mode MRM. Des ions précurseurs ayant un  $m/z$  précis sont isolés au niveau du premier quadripôle. Ces ions sont ensuite transportés vers la cellule à collision où ils seront fragmentés à l'aide d'un gaz inerte (argon). Un ion produit suite à l'étape de fragmentation sera alors isolé dans le second quadripôle.

L'ion précurseur est isolé au niveau du premier quadripôle. Cet ion est ensuite transféré au niveau de la cellule à collision où il sera fragmenté suite à des collisions avec un gaz inerte comme l'argon. Un ion produit par ces collisions sera alors isolé dans le second quadripôle. Cet ion produit va éventuellement se rendre au détecteur afin de produire un signal.

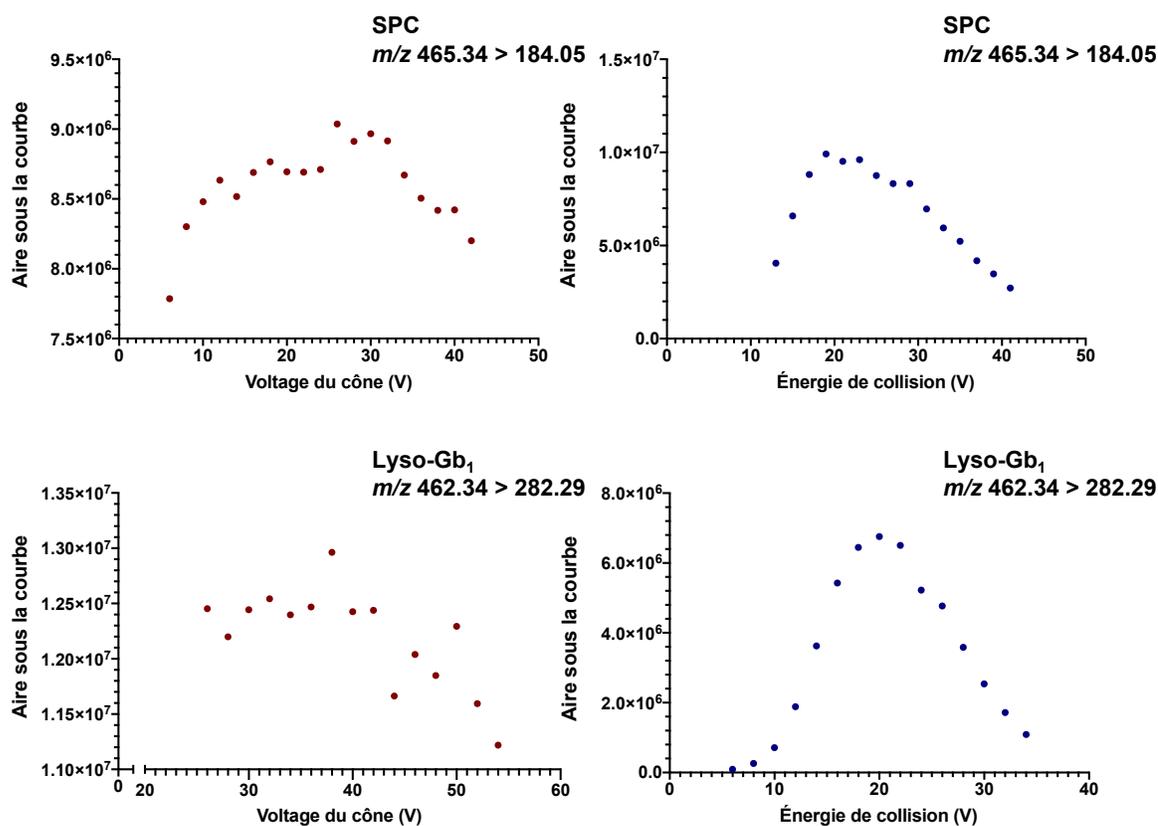
Les différentes molécules identifiées lors des études métabolomiques plasmatique et urinaire puis analysées par des méthodes quantitatives selon leurs transitions sont indiquées au Tableau 8. En plus de trouver les transitions adéquates pour chacun des différents biomarqueurs, il est important d'optimiser les paramètres d'ionisation et d'énergie de fragmentation dans le but d'obtenir une méthode sensible et robuste. Il est donc impératif d'optimiser certains paramètres liés à l'ionisation et la fragmentation des biomarqueurs tels que la température de désolvatation, le voltage du cône, le voltage du capillaire, l'énergie de la cellule à collision, la rampe d'énergie de collision ainsi que le voltage de la lentille de radiofréquence (RF). Afin d'évaluer ces différents paramètres, il est possible de prendre un échantillon ayant des niveaux abondants des différents biomarqueurs puis d'évaluer la variation du signal en fonction des différentes modifications au niveau des paramètres. Dans le cadre de la présente étude, puisque des standards ne sont pas commercialement disponibles pour tous les biomarqueurs d'intérêt, un échantillon de patient a été préparé selon le protocole puis analysé avec différentes énergies de collision.

**Tableau 8.** Transitions MRM des molécules ciblées comme biomarqueurs potentiels suite aux études métabolomiques dans le plasma et dans l'urine.

Nom du composé	Matrice	Temps de rétention (min)	Ion précurseur (m/z)	Ion produit (m/z)
Lyso-Gb <sub>1</sub>	Plasma	3.80	462.34	282.28
	Urine	4.65		
Analogue +32 Da	Urine	6.88	494.33	296.26
Analogue +30 Da	Urine	5.34	492.32	294.24
Analogue + 18 Da	Plasma	4.02	480.36	318.30
Analogue +16 Da (A)/(B)*	Plasma	4.40/4.60	478.34	280.26
	Urine	5.43/5.97		
Analogue +14 Da	Plasma	3.74	476.36	296.26
	Urine	5.30/5.53		
Analogue +2 Da	Urine	5.79	464.29	284.22
Analogue -2 Da	Plasma	3.89	460.32	280.25
Analogue -12 Da (A)/(B)*	Plasma	4.47	450.31	252.23
	Urine	5.92/6.53		
Analogue -26 Da	Urine	6.42	436.25	238.18
Analogue -28 Da	Plasma	3.99	434.31	254.25
	Urine	4.91		
Analogue Polycyclique 362 Da	Urine	7.16	362.18	164.11
Analogue Polycyclique 366 Da	Urine	9.26	366.18	168.11
Analogue Polycyclique 390 Da	Urine	6.22	390.21	192.14
Analogue Polycyclique 394 Da	Urine	7.76	394.21	196.13
Sphingosylphosphorylcholine	Plasma	8.86	465.34	184.05
N-Palmitoyl-O-Phosphocholine Sérine	Plasma	8.55	509.33	104.44

\*Les notations (A)/(B) font référence à la présence d'analogues ayant une masse similaire (< 0,04 Da de différence), mais une formule empirique différente. Plus précisément, pour les analogues -12 (A) et (B), la masse exacte varie de 0,0305 Da alors que pour les analogues -16 (A) et (B), une différence de masse de 0,0349 Da a été observée.

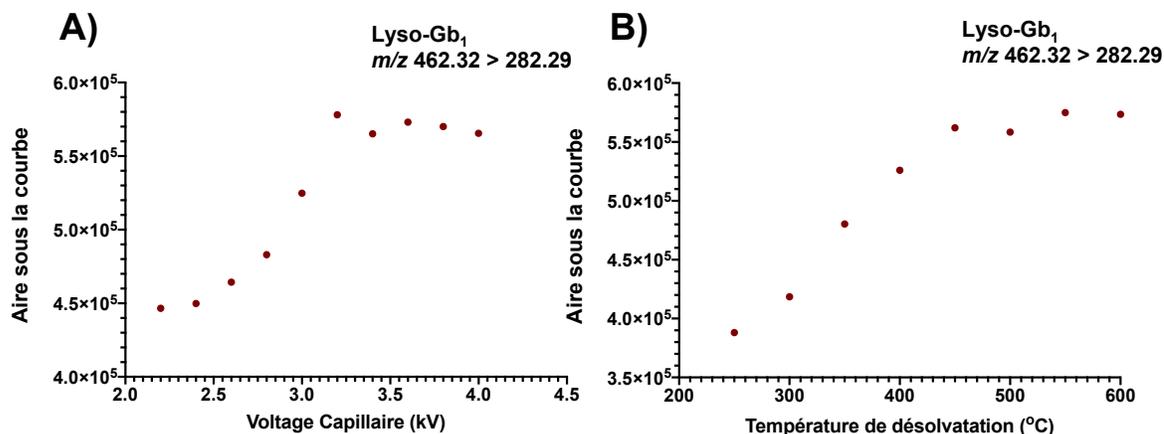
La Figure 14 démontre un exemple d'optimisation pour les paramètres d'énergie de collision et de voltage du cône sur le Xevo TQ-S lors du développement de la méthode de quantification des biomarqueurs plasmatiques pour le biomarqueur SPC. Lors de cette expérience d'optimisation, nous avons fixé l'un des deux paramètres (soit le voltage du cône ou l'énergie de collision) et nous avons fait varier l'autre paramètre. Évidemment, l'échantillon analysé, la méthode UPLC et les autres paramètres demeurent les mêmes pour toutes les analyses faisant partie de cette expérience d'optimisation.



**Figure 14.** Exemples d'optimisation des paramètres individuels d'énergie de collision et du voltage du cône pour le sphingosylphosphorylcholine (SPC) ainsi que le lyso-Gb<sub>1</sub>.

Ainsi, il est possible de constater une importante variation du signal mesuré en fonction de l'énergie de collision ou du voltage du cône pour un même échantillon. Ce type de distribution est plutôt prévisible puisqu'à de faibles énergies, l'énergie de collision est insuffisante pour fragmenter l'ion précurseur alors qu'à l'autre extrême, l'énergie de collision est tellement puissante que la collision génère plusieurs ions produits de très faible masse. À

la Figure 15, est présenté un exemple d'optimisation de paramètres qui s'appliquent à l'ensemble des analytes de la méthode.



**Figure 15.** Optimisation des paramètres de voltage du capillaire et de température de désolvatation. Lors de l'optimisation de ces paramètres, nous n'avons pas observé un sommet clair comme ce fut le cas pour les paramètres à la Figure 14. Il est cependant possible d'observer un certain plateau pour les deux paramètres.

Il est donc très important lors du développement des différentes méthodes de s'assurer d'avoir des paramètres optimaux pour obtenir une sensibilité adéquate. Il est toutefois à noter que les données présentées ci-haut ne représentent qu'une portion des paramètres à optimiser afin d'obtenir un signal adéquat. Le Tableau 9 présente les différents paramètres pouvant affecter le signal mesuré en spectrométrie de masse pour les différents analytes.

**Tableau 9.** Paramètres en spectrométrie de masse à optimiser pour augmenter la sensibilité de la méthode

Paramètre individuel pour chaque analyte	Paramètre d'ensemble pour la méthode
Voltage du cône	Voltage du capillaire
Énergie de collision	Température de désolvatation
Transitions	Température de la source
Temps d'analyse « Dwell Time »	

## 9 L'analyse et le traitement des données

Lorsque la spectrométrie de masse est utilisée à des fins quantitatives, le travail associé au traitement des données est souvent plus court et simple que lors des études métabolomiques. De fait, il s'agit de vérifier la linéarité de la courbe de calibration et de s'assurer d'avoir une intégration reproductible pour tous les pics. Lorsque ces éléments sont appliqués correctement, nous obtenons alors des mesures de concentrations qui peuvent être utilisées à différents escients pour diverses études. Toutefois, dans le cadre d'études métabolomiques utilisant la spectrométrie de masse en temps de vol, le traitement des données est généralement beaucoup plus long et complexe. En fait, plusieurs étapes de traitement des données doivent être optimisées afin de pouvoir visualiser les composés exprimés différemment dans les groupes à l'étude. Dans un premier temps, suite à l'analyse des échantillons, il est important de mettre au point les paramètres d'alignement des données.

### 9.1 L'alignement des données

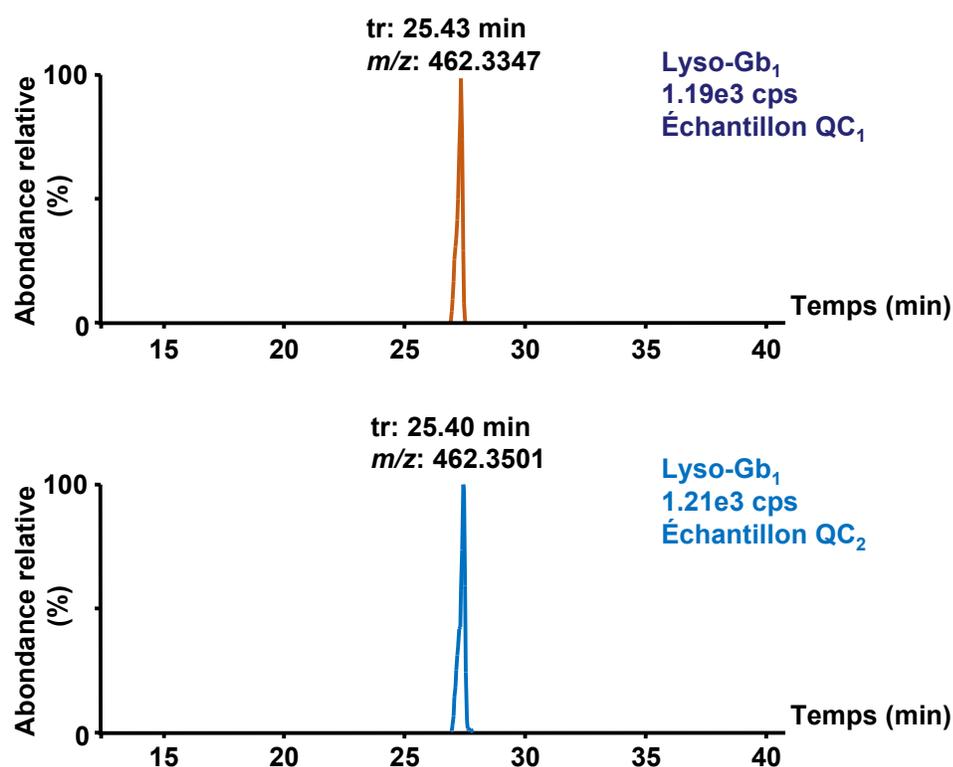
Cette étape consiste à regrouper les différents pics chromatographiques détectés dans les échantillons en fonction de leur temps de rétention ainsi que de leur rapport  $m/z$  (Figure 16).

	Temps de rétention	$m/z$			Aire sous la courbe (abondance du marqueur)							
42201	29.8510	987.6916	✓	No	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0131
42202	4.6732	987.6941	✓	No	0.0000	0.0000	0.0000	0.4052	0.0000	0.2307	0.0000	
42203	1.0427	987.7092	✓	No	11.9200	29.8478	18.4180	24.3078	20.0602	42.0527	22.1004	
42204	14.4895	987.7101	✓	No	8.8057	7.3173	4.8410	7.2520	5.3438	11.7850	8.4541	
42205	12.2181	987.7107	✓	No	1.0576	1.1000	1.1714	1.1323	1.0389	0.0000	1.7541	
42206	31.7331	987.7131	✓	No	1.2382	1.3761	1.2499	1.6132	1.2530	2.4091	1.7493	
42207	1.3057	987.7200	✓	No	4.7221	5.8091	4.0268	5.5329	4.3047	10.4182	6.5302	
42208	13.0705	987.7204	✓	No	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1213	0.0000	
42209	1.7111	987.7209	✓	No	0.0000	0.0000	0.0000	0.0263	0.0000	0.0424	0.0000	
42210	6.4098	987.7218	✓	No	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0283	0.0000	0.0000	

**Figure 16.** Capture d'écran de l'étape d'alignement des données (logiciel Markerlynx, Waters Corp.). Les temps de rétention, les  $m/z$  ainsi que l'abondance des marqueurs dans les échantillons est encadrée en rouge.

Ainsi, à l'aide des échantillons de contrôle de qualité (échantillon préparé en mélangeant 20  $\mu$ l de chacun des échantillons analysés lors de l'étude métabolomique) injectés de manière périodique au courant de l'étude métabolomique, il est possible d'évaluer et éventuellement d'optimiser la fenêtre de tolérance au niveau des  $m/z$  et du temps de rétention. Si ces paramètres ne sont pas bien adaptés aux valeurs expérimentales, il serait possible de manquer certains biomarqueurs potentiels dans le cas où le seuil choisi est trop faible. Cela pourrait

suggérer au logiciel la présence de deux molécules différentes dans différents échantillons alors qu'en réalité il ne s'agit que d'une seule et même molécule, ce qui a pour effet de réduire la pertinence d'un biomarqueur potentiel. Ainsi, avant même le début de l'étude métabolomique nous avons évalué la variabilité de la chromatographie et des masses mesurées en injectant un même échantillon de plasma à répétition au cours de l'étude métabolomique. Les résultats obtenus ont alors révélé une variabilité de 0,03 min au niveau du temps de rétention et une différence 0,0154 Dalton pour le lyso-Gb<sub>1</sub> entre les deux échantillons QC qui présentaient le plus grand écart au niveau de paramètres de  $m/z$  et du temps de rétention (Figure 17). À la lumière de ces données, les paramètres présentés au Tableau 8 ont été utilisés pour l'étape d'alignement des données.



**Figure 17.** Variation du temps de rétention et de la masse exacte observés pour le lyso-Gb<sub>1</sub> lors de l'étude métabolomique dans le plasma suite à l'analyse du même échantillon de contrôle de qualité (QC) à près de 24h d'intervalle. Il est à noter que les différences entre QC<sub>1</sub> et QC<sub>2</sub> représente le plus grand écart enregistré au niveau de la différence de masse pour l'ensemble des échantillons QC analysés lors de l'étude métabolomique. Ces variations sont utilisées pour établir les valeurs seuils lors de l'étape de l'alignement des données.

**Tableau 10.** Paramètres de l’alignement des données optimisés grâce aux répliquats de l’échantillon de contrôle de qualité (QC). Les mêmes paramètres ont été utilisés pour les deux études métabolomiques

Paramètre	Description
Type d’analyse	Détection de pics
Temps de rétention initial	5 min
Temps de rétention final	45 min
Étendue de masse	50 – 1000 Da
Seuil du nombre de comptes	5
Tolérance de masse	0,05 Da
Tolérance du temps de rétention	0,2 min
Retrait des isotopes	Non

Face au choix des différents paramètres présentés au Tableau 8, nous avons considéré uniquement les composés ayant un temps de rétention compris 5 et 45 minutes afin d’exclure les composés non retenus par la colonne HILIC. Une étendue de masse entre 50-1000 Da a été sélectionnée afin de cibler des métabolites d’une certaine taille tout en conservant une bonne sensibilité lors des analyses. En effet, dans l’éventualité où une plus vaste étendue de masse aurait été sélectionnée, ce choix aurait inévitablement entraîné une perte de sensibilité et donc nous aurions potentiellement pu manquer un métabolite d’intérêt. Le seuil a été fixé à 5 comptes afin de détecter les métabolites peu abondants sans toutefois inonder nos données avec des marqueurs qui sont en réalité du bruit de fond. Finalement, les paramètres de tolérance de masse et de temps de rétention ont été fixés en fonction de la variabilité de ces deux paramètres observés avec les échantillons de QC comme présentés à la Figure 16.

Ainsi, après l’optimisation des différents paramètres d’alignement des données, un total de 91197 pics chromatographiques ont été observés lors de l’étude métabolomique dans le plasma et 129 181 pics chromatographiques dans l’urine.

### 9.2 La mise à l'échelle des données

En plus de l'alignement de données, la sélection d'une mise à l'échelle est une étape clé pour mettre en évidence certaines molécules qui ont le potentiel d'être des biomarqueurs. Tout d'abord, il est important de comprendre qu'un bon biomarqueur peut être une molécule qui n'est pas nécessairement la plus abondante dans les échantillons analysés. Un bon biomarqueur peut, par exemple, être faiblement abondant dans les échantillons Gaucher et non détectable dans les échantillons contrôles. Il est donc important d'être en mesure de donner un poids statistique à ces molécules faiblement abondantes, mais qui pourraient s'avérer être des biomarqueurs de choix. L'une des stratégies disponibles pour y parvenir est la mise à l'échelle des données à l'aide d'un algorithme mathématique. Il existe différents types de mise à l'échelle pouvant être employée selon les visées des projets. Par exemple, la mise à l'échelle « Unit Variance » ou UV permet de donner davantage de poids aux molécules de faible abondance grâce à un ajustement des concentrations mesurées par la formule mathématique suivante :

$$(1) UV = \frac{x - \bar{x}}{SD}$$

où  $x$  et  $\bar{x}$  correspondent à la concentration d'une molécule mesurée dans un échantillon et à la moyenne des concentrations mesurées pour une molécule donnée. Le terme SD quant à lui représente la déviation standard de la concentration de la même molécule dans l'ensemble des échantillons analysés (van den Berg *et al.*, 2006). Ce type d'ajustement permet de donner un poids équivalent à tous les marqueurs avec peu d'influence par rapport à leur concentration respective (van den Berg *et al.*, 2006). La mise à l'échelle « Pareto », quant à elle, peut être décrite par la formule mathématique :

$$(2) Par = \frac{x - \bar{x}}{\sqrt{SD}}$$

où, encore une fois,  $x$  et  $\bar{x}$  correspondent à la concentration d'une molécule mesurée dans un échantillon et à la moyenne des concentrations mesurées pour une molécule donnée alors que  $\sqrt{SD}$  représente la racine carrée de la déviation standard de la concentration de la même molécule dans l'ensemble des échantillons analysés (van den Berg *et al.*, 2006). La mise à l'échelle Pareto quant à elle permet de favoriser les métabolites de concentration



intermédiaire (van den Berg *et al.*, 2006). Finalement, il est également possible de ne pas faire de mise à l'échelle. Dans cette situation bien précise, les composés de hautes valeurs de concentration auront un poids considérable face aux molécules de plus faibles concentrations (van den Berg *et al.*, 2006). En plus de ces différentes mises à l'échelle, il est possible d'utiliser ou non une correction logarithmique de manière à réduire l'hétéroscédasticité présente dans les données observées (van den Berg *et al.*, 2006). Ce type de transformation des données aura ultimement pour effet de donner encore davantage de poids aux molécules de plus faibles abondances.

Ainsi, parmi ces différentes options, toutes ont leurs forces et faiblesses qui permettront de mettre en évidence des molécules d'abondances variables. Il est donc important de tester ces trois modes de mise à l'échelle afin de trouver quelles options permettent d'identifier les marqueurs les plus intéressants. Dans le cas du présent projet, les trois mises à l'échelle ont été testées avec et sans transformation logarithmique. Ultimement, la mise à l'échelle UV avec transformation logarithmique a été sélectionnée pour les deux études métabolomiques soit dans le plasma et dans l'urine. Effectivement, cette mise à l'échelle combinée à la transformation logarithmique a été la seule combinaison capable d'identifier le lyso-Gb<sub>1</sub> comme marqueur d'intérêt, une molécule qui est considérée comme un biomarqueur de choix pour le suivi et le pronostic des patients Gaucher (Hurvitz *et al.*, 2019) et qui fut en quelque sorte un contrôle positif dans le cadre des différentes études métabolomiques.

### **9.3 Les tests statistiques**

Après l'optimisation des différents paramètres d'alignement et de la mise à l'échelle des données, l'étape subséquente consiste à faire différents tests statistiques dans le but de s'assurer de la reproductibilité des analyses pour ensuite pouvoir mettre en évidence des molécules exprimées différemment dans les deux groupes d'échantillons et donc de cibler les biomarqueurs potentiels. Il est à noter que le logiciel EZinfo (Umetrics, Umeå, Suède) a été utilisé pour le traitement des données.

#### **9.3.1 L'analyse de composantes principales (PCA)**

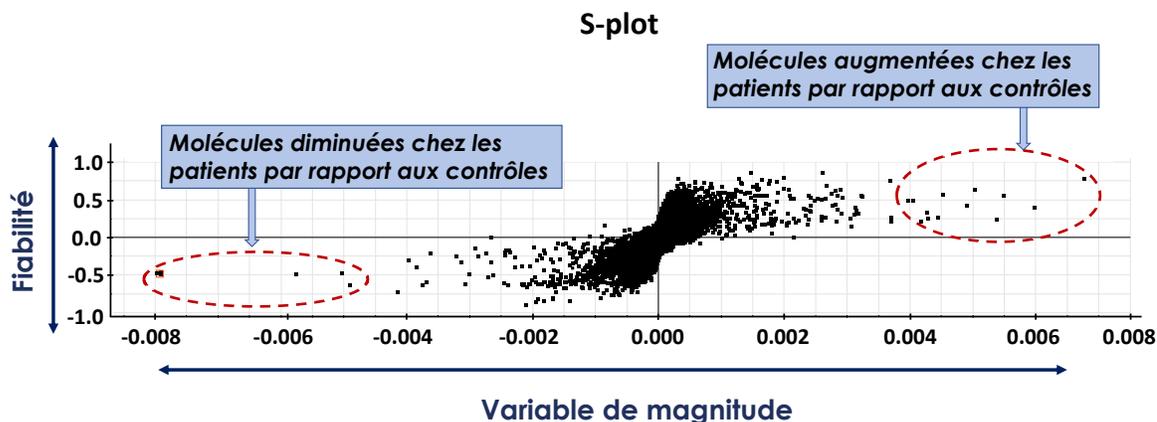
Les études métabolomiques peuvent impliquer l'analyse d'un nombre important d'échantillons ainsi que des chromatographies assez longues afin de séparer de façon efficiente un grand nombre de composants dans les différents échantillons. Il est donc

possible qu'au cours d'une série d'analyses, il y ait une certaine variabilité au niveau du temps de rétention, au niveau des masses mesurées et, dans une certaine mesure, une variabilité au niveau de la sensibilité de l'appareil. Il est donc important de s'assurer que les variations observées lors de l'étude métabolomique sont attribuables à une variabilité métabolique inter-individus et non à une instabilité du système d'analyse ou une mauvaise programmation de l'alignement des données avec des paramètres inadéquats. Grâce à l'analyse d'un échantillon de contrôle de qualité injecté de manière périodique au cours d'une même série d'analyses, ainsi qu'à l'utilisation du test statistique par « Principal Component Analysis » ou PCA, il est possible de s'assurer que les variations entre les échantillons ne sont pas liées à une instabilité du spectromètre de masse ou du chromatographe liquide. Le PCA vise à réduire la dimension des métabolites analysés en tenant pour acquise une certaine corrélation entre les métabolites analysés (Kherif et Latypova, 2020). En d'autres mots, le PCA réduit le nombre de variables au sein d'un ensemble de données ce qui permettra ultimement de comparer des échantillons pour établir un degré de similitude entre les échantillons qui composent l'ensemble donné. Il sera possible grâce au PCA de visualiser des tendances, des relations entre certaines variables ainsi que des données aberrantes en fonction de la position des différents points représentant les échantillons analysés sur un graphique (Blasco *et al.*, 2015). Au cours de la présente étude, les échantillons de contrôle de qualité utilisés sont en réalité un seul échantillon injecté périodiquement (12 réinjections au minimum par étude métabolomique). De plus, cet échantillon est obtenu en mélangeant un volume de 20 µl de chaque échantillon inclus dans l'étude métabolomique. Les points représentant ces analyses de contrôles de qualité devraient, en théorie, se regrouper au centre du graphique. Ces deux paramètres suggèrent une reproductibilité des analyses et une similitude comparable aux différents échantillons analysés. Les résultats de l'analyse PCA sont montrés à la Figure 2 de l'Article 1 à la page 110.

### ***9.3.2 L'analyse discriminante par les moindres carrés partiels orthogonaux, le S-plot et le graphique de tendance***

L'analyse discriminante par les moindres carrés partiels orthogonaux ou OPLS-DA » est un test statistique multivarié, supervisé qui cherche à cibler des différences dans deux groupes de données afin de partitionner les données en deux groupes distincts (Blasco *et al.*, 2015). Suite à la mise en évidence de ces variables, il sera possible d'évaluer la capacité du modèle

à distinguer les deux types d'échantillons grâce à une représentation graphique communément appelée un « OLPS-DA Score Plot ». Comme présentée dans les articles portant sur les études métabolomiques plasmatiques (Article 1, Figure 3 à la page 111) et urinaires (Article 3, Figure 1 à la page 192) dans le cadre de ce projet de recherche, une variation intergroupe indiquée par une séparation sur l'axe des abscisses des deux groupes à l'étude était clairement visible. Ainsi, suite à l'obtention d'un modèle adéquat, il est possible de visualiser de manière individuelle les variations mises en évidence par l'OPLS-DA grâce au S-plot. Cette dernière représentation graphique est en quelque sorte un classement des différents marqueurs observés lors de l'étude métabolomique en fonction de leur apport au modèle statistique en termes de corrélation, de covariance et de fiabilité (Wiklund *et al.*, 2008). Ainsi, il est possible de facilement cibler les molécules qui ont une corrélation positive et négative avec la maladie de Gaucher. Les marqueurs qui ont une corrélation positive avec la maladie, c'est-à-dire les marqueurs qui augmentent chez les patients Gaucher comparativement aux contrôles, se retrouvent à l'extrémité supérieure droite du S-plot alors que les marqueurs qui ont une corrélation négative se retrouvent à l'extrémité inférieure gauche. Pour ce qui est du niveau de l'aptitude des différents marqueurs à discriminer les patients Gaucher des contrôles, plus un marqueur se positionne loin à l'extrémité, plus celui-ci est fiable pour la séparation des deux groupes d'échantillons étudiés. Il est donc facile de cibler les marqueurs qui ont le plus de potentiel d'être des biomarqueurs potentiels et probants. Un exemple de S-plot qui a été obtenu avec une mise à l'échelle Pareto est présenté à la Figure 18. Il est à noter que ces données ne se sont toutefois pas avérées probantes puisqu'avec ces paramètres, nous n'arrivions pas à cibler le lyso-Gb<sub>1</sub> comme métabolite d'intérêt.



**Figure 18.** S-plot obtenu avec une mise à l'échelle Pareto. Ces données ne se sont toutefois pas avérées probantes puisqu'avec ces paramètres, nous n'arrivons pas à cibler le lyso-Gb<sub>1</sub> comme métabolite d'intérêt.

Il est possible de voir les S-plot obtenus à la Figure 4 de l'Article 1 (page 112) pour l'étude métabolomique dans le plasma ainsi qu'à la Figure 2 de l'Article 3 (page 193) pour l'étude métabolomique dans l'urine.

Toutefois, compte tenu du nombre important de marqueurs identifiés lors des études métabolomiques, il est fort probable qu'un marqueur semble avoir une corrélation relativement forte avec la maladie de Gaucher, mais en réalité il ne s'agit que d'un hasard lié au fait qu'un nombre relativement limité d'échantillons ont été analysés. Il est donc bien important d'analyser le graphique de tendance associé à chaque marqueur d'intérêt pour voir la variabilité dudit composé dans les différents échantillons. Dans le cas du présent projet, nous avons fixé deux critères pour cibler les marqueurs d'intérêt. Comme première condition, le marqueur doit être plus abondant dans un groupe par rapport à l'autre (Gaucher ou ou contrôle). De plus, il doit être détectable dans au moins 50 % des échantillons d'un même groupe. Dans le cas, par exemple, d'une molécule augmentée significativement et sans raison explicable chez 3 contrôles par rapport aux autres échantillons contrôles en plus d'être augmentée chez tous les patients Gaucher, cette molécule n'était pas considérée comme un marqueur d'intérêt. Ensuite, comme seconde condition, pour un marqueur présent dans les échantillons Gaucher, le composé en question doit être présent dans les échantillons de différentes provenances. Cette mesure vise à éliminer des composés pouvant être des produits

de dégradation ou des contaminants qui ont été introduits lors de l'étape de collecte, préparation ou entreposage des échantillons dans un site par rapport à un autre. Également, nous nous assurons que les différentes molécules identifiées ne sont pas des artéfacts métaboliques présents uniquement dans un type de population. Comme mentionné précédemment, la maladie de Gaucher est une maladie qui se présente sous un large spectre clinique. Il est donc normal que dans la cohorte de patients Gaucher analysée, certains patients soient plus faiblement atteints que d'autres. Une faible concentration de biomarqueurs est donc anticipée chez ces patients. Il est également possible que cette concentration soit en dessous des limites de détection de l'appareil, ce qui peut donner l'impression que la molécule n'est pas présente chez le patient alors qu'en réalité celui-ci est faiblement atteint et les niveaux de biomarqueurs sont trop faibles pour être détectés par spectrométrie de masse en temps de vol. D'ailleurs, ce phénomène était clairement visible lors de l'analyse du lyso-Gb<sub>1</sub> par spectrométrie de masse en temps de vol au cours de l'étude métabolomique et de l'analyse de celui-ci par spectrométrie de masse ciblée en mode MRM, tel que soulevé précédemment. En plus du triage de différents marqueurs en fonction des critères de sélection, les adduits métalliques et les isotopes identifiés par un temps de rétention et une forme de pic identique ont été retirés manuellement. Ainsi, ce sont ultimement 7 marqueurs qui répondaient aux critères fixés pour l'étude métabolomique dans le plasma et 14 marqueurs qui répondaient à ces mêmes critères pour l'étude métabolomique dans l'urine. La structure de ces différents biomarqueurs a ensuite été élucidée grâce à la masse exacte des composés ainsi qu'à des tests de fragmentation.

### **10 La validation d'une méthode d'analyse par spectrométrie de masse**

Après le développement de la méthode de quantification en multiplexe pour les différents biomarqueurs, l'étape suivante consiste à valider la méthode. La validation consiste à faire un grand nombre d'analyses avec des échantillons ayant des concentrations connues des différentes molécules à analyser dans le but d'évaluer les performances de la méthode développée. De fait, en s'intéressant à différents paramètres tels que la précision intra-jour et inter-jours, la linéarité, la limite de quantification, la limite de détection, la justesse, la robustesse, l'effet de matrice, l'adhésion au verre et au plastique ainsi que la stabilité à différents temps et à différentes températures, il devient possible de bien cerner les forces et les faiblesses de la méthode développée et d'affirmer que ladite méthode est juste, robuste et

que les résultats obtenus grâce à celle-ci sont fiables. La validation est également une étape essentielle lorsque l'objectif est de publier la méthode puisqu'une bonne validation démontre que la méthode proposée peut être facilement reproduite dans des conditions données par d'autres opérateurs et sur d'autres spectromètres de masse. Il est évident que certaines méthodes peuvent s'avérer plus complexes que d'autres ce qui peut entraîner des défis particuliers. Toutefois, il existe un certain seuil d'acceptabilité à atteindre pour les différents paramètres au cours de la validation pour démontrer que la méthode proposée est robuste (Honour, 2011). Ces différents paramètres sont présentés au Tableau 11.

**Tableau 11.** Critères de validation de méthodes quantitatives en spectrométrie de masse proposés par l'agence gouvernementale américaine Food and Drug Administration (FDA (FDA, 2020)

Paramètres	Critères d'acceptabilité
Facteur de corrélation de la courbe de calibration	$R^2 > 0,995$
Justesse	Biais < 15%
Précision (intrajour et interjour)	Déviations standard relatives < 15%
Stabilité (24h, 48h, 1 semaine, 1 mois à différentes températures)	Variation < 15% par rapport aux résultats initiaux
Stabilité dans l'autoéchantillonneur	Variation < 15% par rapport aux résultats initiaux
Adhésion au verre et au plastique	Variation < 15%
Effet de matrice	À documenter
Taux de récupération	À documenter
« Carryover »	0,1%
Limite de quantification	10 x d'un échantillon réinjecté 10 fois de suite
Limite de détection	3 x d'un échantillon réinjecté 10 fois de suite

Au niveau de la linéarité, les points de la courbe de calibration doivent chacun avoir moins de 15% de biais par rapport aux valeurs théoriques de concentrations assignées aux différents points. Également, cette courbe de calibration doit avoir un coefficient de corrélation ( $r^2$ )

supérieur à 0,995. Le facteur de corrélation de la courbe est évalué sur 5 jours différents en même temps que la justesse et la précision intrajour et interjours.

D'ailleurs, au niveau de la justesse et de la précision, les échantillons doivent avoir un biais et un coefficient de variation inférieurs à 15% par rapport aux valeurs théoriques. Ces valeurs théoriques sont calculées à l'aide d'échantillons de contrôles de qualité (QC), c'est-à-dire des échantillons préparés en ajoutant une concentration connue de standard. Ainsi, à l'aide de ces échantillons QC de 3 concentrations différentes préparés en quintuplicata (pour la variation intra-jour) ou en triplicata et analysés sur plusieurs jours (pour la variation inter-jours), il sera possible d'évaluer la capacité de la méthode d'analyse à fournir des résultats justes et précis au sein d'une même série d'analyses et également d'une série d'analyses à l'autre.

Pour ce qui est de la stabilité, des échantillons sont préparés à partir d'aliquots conservés pour une durée de 24 h, 48 h, 72 h, 1 semaine et 1 mois à des températures de -30°C, 4°C et température pièce. Pour être jugés stables, les différents échantillons doivent avoir moins de 15% de biais par rapport aux valeurs obtenues à t0. Dans l'éventualité où un biais inférieur à 15% n'est pas atteignable, il est considéré que l'échantillon n'est plus stable à ces conditions.

Au niveau de l'adhésion au verre et au plastique, des échantillons sont préparés puis un certain volume est transféré dans des inserts en verre ou en plastique. Ces échantillons sont ensuite transférés 3 autres fois dans un autre insert du même matériel. Face à ces étapes de transfert, les échantillons transférés et non transférés sont analysés puis comparés. S'il y a une grande différence entre les deux groupes, il est possible de conclure qu'il y a une adhésion au verre et/ou au plastique selon le type d'insert utilisé.

Finalement, au niveau des limites de quantification ou de détection, il n'existe pas réellement d'objectif minimal à atteindre, toutefois, nous cherchons à atteindre les limites de quantification et les limites de détection les plus basses possibles, tout en considérant l'étendue de concentrations des échantillons à analyser pour permettre la meilleure quantification possible. De plus, il est important de bien documenter les paramètres afin d'identifier les seuils auxquels les résultats de quantification sont fiables. Ainsi, pour calculer la limite de détection, qui correspond à la plus faible concentration d'analyte pouvant être observée sans nécessairement être quantifiée, il faut injecter un échantillon de très faible

concentration à répétition (n=10). Par la suite, il suffit de calculer la déviation standard de ces différentes analyses et de multiplier le résultat par 3 pour obtenir la limite de détection théorique alors que pour la limite de quantification théorique, qui correspond à la plus faible concentration d'analyte pouvant être quantifiée de manière fiable et reproductible, il suffit de multiplier la déviation standard par un facteur 10.

Dans le cadre de la présente étude, tous ces paramètres ont été évalués et documentés pour tous les biomarqueurs afin de démontrer que les méthodes de quantification développées sont fiables et robustes.

## **PARTIE 2**

### **Méthode de dépistage urinaire populationnel de glycosaminoglycans**

#### **11 Les mucopolysaccharidoses**

Les mucopolysaccharidoses (MPSs) représentent un ensemble de maladies lysosomales caractérisées par une déficience au niveau des enzymes impliquées dans la dégradation de molécules de sucres connues sous le nom de glycosaminoglycans (GAGs) (Zanetti *et al.*, 2019). Ainsi, lesdites molécules non dégradées s'accumuleront progressivement au niveau des lysosomes présents dans les différents tissus, occasionnant à moyen et à long terme d'importants dommages tissulaires qui affectent grandement le fonctionnement de ces derniers (Ferreira et Gahl, 2017). Au total, ce sont 7 différents types de MPS, causés par la déficience de 11 hydrolases qui ont été décrites à ce jour (Bigger *et al.*, 2018). Chacun de ces types est caractérisé par l'accumulation d'un ou plusieurs glycosaminoglycans selon l'enzyme déficiente. Plus précisément, ces glycosaminoglycans peuvent être l'héparan sulfate, le dermatan sulfate, le chondroïtine sulfate, le kératan sulfate ou l'hyaluronan (Colmenares-Bonilla *et al.*, 2018). Il est à noter qu'il n'y a pas de MPS de type V puisque la maladie de Scheie, qui auparavant correspondait à la MPS V, a été reclassifiée comme une forme plus atténuée de la MPS I (OMIM 607014). Dans le cas de la MPS VIII, il s'agit d'une erreur diagnostic et donc la maladie n'existe tout simplement pas (Coutinho *et al.*, 2012). Les différents types de MPS, les enzymes déficientes ainsi que le(s) substrat(s) accumulé(s) sont présenté(s) au Tableau 12.

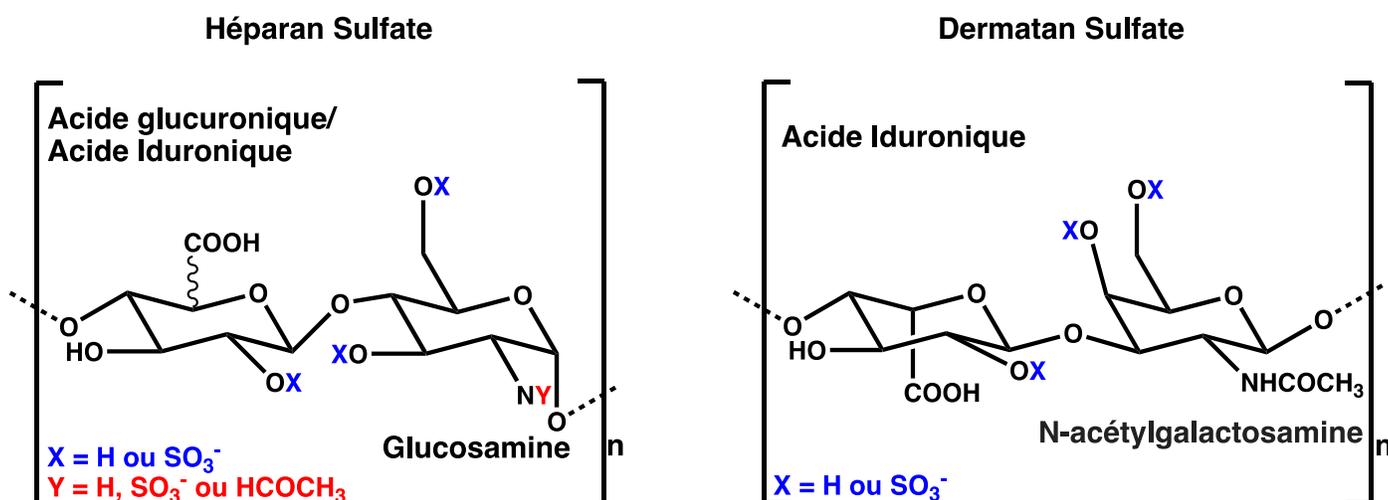


**Tableau 12.** Classification des mucopolysaccharidoses selon l'enzyme déficiente et le substrat accumulé pour chacune.

<b>Mucopolysaccharidoses</b>			
<b>Type</b>	<b>Maladie</b>	<b>Enzyme déficiente</b>	<b>Substrats accumulés</b>
Type I	Maladie de Hurler, H-S, Scheie	$\alpha$ -L-Iduronidase	Dermatan sulfate et héparan sulfate
Type II	Maladie de Hunter	Iduronate-2-sulphatase	Dermatan sulfate et héparan sulfate
Type III (A)	Maladie de Sanfilippo A	Héparan N-sulfatase	Héparan sulfate
Type III (B)	Maladie de Sanfilippo B	$\alpha$ -N-acetyl glucosaminidase	Héparan sulfate
Type III (C)	Maladie de Sanfilippo C	$\alpha$ -glucosaminidase	Héparan sulfate
Type III (D)	Maladie de Sanfilippo D	N-acetylglucosamine 6-sulfatase	Héparan sulfate
Type IV (A)	Maladie de Morquio-A	N-acetylgalactosamine-6-sulfatase	Kératan sulfate et chondroïtine sulfate
Type IV (B)	Maladie de Morquio-B	$\beta$ -D-galactosidase	Kératan sulfate et chondroïtine sulfate
Type VI	Maladie de Maroteaux-Lamy	N-acetylgalactosamine-4-sulfatase	Dermatan sulfate
Type VII	Maladie de Sly	$\beta$ -glucuronidase	Kératan sulfate, dermatan sulfate et héparan sulfate
Type IX	Déficience en Hyaluronidase	Hyaluronidase	Hyaluronan

## **12 La structure et les fonctions des glycosaminoglycans.**

Les glycosaminoglycans sont des chaînes de sucres sulfatés jointes de façon linéaire. Au niveau de la composition, ces macromolécules sont composées d'unité alternative d'acide uronique, en l'occurrence de l'acide  $\beta$ -d-glucuronique (GlcA) ou l'acide  $\alpha$ -l-iduronique (IdoA) et d'unités de sucres tels que l' $\alpha$ -d- ou le  $\beta$ -d-glucosamine (GlcN), présent au niveau de l'héparan sulfate ou le N-acétyl- $\beta$ -d-galactosamine (GalNAc), présent au niveau du dermatan sulfate et du chondroïtine sulfate (Figure 19) (Pomin et Mulloy, 2018).



**Figure 19.** Structure moléculaire de : A): l'héparan sulfate et B): le dermatan sulfate

Contrairement à l'héparan sulfate et au dermatan sulfate, le kératan sulfate ne contient pas d'unité d'acide uronique. Celui-ci est plutôt composé d'unités alternatives de N-acétyl- $\beta$ -d-galactosamine et de galactose. De façon similaire, l'hyaluronan ne contient pas d'unité d'acide uronique alors qu'il est composé d'unités alternatives de  $\beta$ -d-glucuronique et de N-acétyl- $\beta$ -d-galactosamine (Pomin et Mulloy, 2018).

Ces différents glycosaminoglycans sont importants pour la cellule puisque ceux-ci sont impliqués dans un grand nombre de processus cellulaires. Premièrement, dans le cas de l'héparan sulfate, ce dernier est impliqué dans plusieurs voies de signalisation impliquant des morphogènes lors de l'embryogenèse (Yin *et al.*, 2018). Effectivement, les protéoglycans d'héparan sulfate, c'est-à-dire la chaîne de sucre composant l'héparan sulfate liée à une protéine, sont impliqués dans la voie de signalisation de « Wnt, Hedgehog, transforming growth factor- $\beta$  » également connus sous le nom de TG- $\beta$  et finalement les « fibroblast growth factor » connus sous le nom de FGF (Lin, 2004). En plus de jouer un rôle clé lors de l'embryogenèse, l'héparan sulfate est une composante importante de la matrice extracellulaire qui est également impliquée dans différents mécanismes que ce soit au niveau de l'adhésion cellulaire, l'infiltration des cellules immunitaires et même l'angiogenèse (Nagarajan *et al.*, 2018). Le dermatan sulfate et la chondroïtine sulfate jouent des rôles importants lors de la prolifération, la migration et l'adhésion cellulaire, la réparation de plaies, au niveau des différents processus d'anticoagulation et finalement, la croissance des neurites (Purushothaman *et al.*, 2007). Le kératan sulfate quant à lui est impliqué dans la

croissance des neurites, la régulation de la fibrillogénèse du collagène, la régulation des cytokines inflammatoires et facteur de croissance, ainsi que dans la prolifération et la signalisation cellulaire (Caterson et Melrose, 2018). Bref, toutes ces molécules participent aux processus essentiels de l'organisme et donc, une dérégulation au niveau de ceux-ci entraîne inévitablement de lourdes conséquences.

### **13 Le catabolisme des glycosaminoglycans**

Les glycosaminoglycans sont des molécules complexes composées des chaînes linéaires de sucres comprenant notamment des unités de *N*-acétylglucosamine, de *N*-acétylgalactosamine, d'acide glucuronique ainsi que d'acide iduronique (Lindahl *et al.*, 2017). En fonction des unités qui composent leur structure, les différents glycosaminoglycans peuvent être séparés en cinq sous-classes : 1) soit le dermatan sulfate (également appelé chondroïtine B sulfate); 2) le chondroïtine sulfate; 3) l'héparan sulfate; 4) le kératan sulfate; et 5) l'hyaluronan. Dans le cadre du présent projet, une méthode d'analyse de deux glycosaminoglycans, soit l'héparan sulfate et le dermatan sulfate, pouvant diagnostiquer cinq différentes mucopolysaccharidoses a été développée. L'hyaluronan (MPS IX) et le kératan sulfate (MPS IV, maladie de Morquio) ne sont pas des molécules incluses dans la présente méthode en raison de l'incompatibilité de la méthode de préparation des échantillons (méthanolyse) avec ces deux composés.

Tout d'abord, l'héparan sulfate est un composé qui s'accumule chez les individus touchés par la mucopolysaccharidose de type I (OMIM 607014, 607015, 607016), II (OMIM 309900), III (OMIM 252900, 252920, 252930, 252940) ou VII (OMIM 253220). La longue chaîne de molécules de sucre est composée d' $\alpha$ -D-glucosamine et d'acide uronique (b-D-glucoronique ou d'acide a-L-iduronique). Celle-ci est dégradée par l'entremise de neuf enzymes différentes. De manière simplifiée, la dégradation de l'héparan sulfate se produit en deux étapes clés, soit le retrait d'un groupement sulfaté d'une unité de sucre présent à l'extrémité de la molécule suivie du clivage de cette unité de sucre de la chaîne principale de la molécule. Ces deux étapes sont alors répétées plusieurs fois en fonction du nombre d'unités de molécules de sucre (Kowalewski *et al.*, 2012).

Le dermatan sulfate s'accumule chez les patients atteints de MPS I, II, VI (OMIM 253200) et VII. Ce sont cinq enzymes qui dégradent la chaîne de molécules de sucre à base de N-acétyl galactosamine et d'acide glucuronique. Tout comme pour l'héparan sulfate, la dégradation du dermatan sulfate est réalisée en deux étapes, soit encore une fois, le retrait d'un groupement sulfate suivi du clivage d'une unité de sucre (Fenzl *et al.*, 2015). Ainsi, un défaut dans l'une des enzymes impliquées dans la dégradation entraîne un blocage au niveau de la voie métabolique, suivie de l'accumulation de l'un et/ou l'autre de ces deux macromolécules dans les différents tissus et liquides biologiques. À moyen et long terme, ces accumulations auront d'importants effets au niveau du fonctionnement normal des différents organes ciblés entraînant alors une atteinte multisystémique.

#### **14 Les manifestations cliniques des mucopolysaccharidoses**

Les mucopolysaccharidoses sont des désordres génétiques qui présentent une atteinte multisystémique. Bien qu'en tant que groupes de désordres issus de la même voie métabolique, les mucopolysaccharidoses ont certains éléments en commun, il y a également des différences significatives non seulement d'un type à l'autre, mais également pour un même type. Par exemple, pour la mucopolysaccharidose de type I, il existe trois types de la maladie, soit Scheie (forme atténuée), Hurler-Scheie (forme intermédiaire), et finalement Hurler (forme sévère) (Hampe *et al.*, 2020). Bien que ces conditions soient causées par une ou des mutations qui affectent l'enzyme  $\alpha$ -L-iduronidase (OMIM 252800), les manifestations cliniques, le pronostic ainsi que la prise en charge et le traitement des patients peuvent varier considérablement (Kubaski *et al.*, 2020). Les différentes manifestations cliniques qui sont fréquemment observées pour chaque type de MPS sont présentées au Tableau 13 (Fenzl *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2020; Kubaski *et al.*, 2020). Le tableau ne tient toutefois pas en considération l'étendue phénotypique associée à chaque condition.

**Tableau 13.** Signes et manifestations cliniques associés aux différents types de mucopolysaccharidoses (Fenzl *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2020; Kubaski *et al.*, 2020)

Signes et symptômes		Type de MPS					
		I	II	III	IV	VI	VII
<b>Céphalique et cervical</b>							
	Faciès atypique	+	+	+	+	+	+
	Hypertrichose	+	+	+	-	+	+
	Perte de l'audition	+	+	+	+	+	+
	Macrocéphalie	+	+	+	-	+	+
	Opacité cornéenne	+	-	-	+	+	+
	Dentition anormale	+	+	+	+	+	+
<b>Ostéoarticulaire</b>							
	Petite taille	+	+	-	+	+	+
	Raideur des articulations	+	+	+	-	+	+
	Dysplasie des hanches	+	+	+	+	+	+
	Déformation des mains	+	+	-	-	+	+
	Syndrome du tunnel carpien	+	+	-	-	+	+
<b>Cardiovasculaire</b>							
	Épaississement des valves cardiaques	+	+	+	+	+	+
	Hypertrophie du ventricule gauche	+	+	+	+	+	+
<b>Neurologique</b>							
	Retard de développement	+	+	+	-	-	+
	Ventriculomégalie	+	+	+	-	+	+
	Dilatation des espaces périvasculaires	+	+	+	-	+	-
<b>Respiratoire</b>							
	Infections respiratoires	+	+	+	+	+	+
	Obstruction des voies respiratoires	+	+	-	+	+	+
<b>Abdomen</b>							
	Organomégalie	+	+	+	-	+	+
	Hernie inguinale/ombilicale	+	+	+	-	-	+

Tel qu'indiqué au Tableau 13, seules les MPSs où la dégradation de l'héparan sulfate est affectée impliquent des atteintes neurologiques. D'ailleurs, ce phénomène a été étudié dans le cadre d'un projet de recherche précédemment publié par notre groupe en 2019 intitulé « Distribution of heparan sulfate and dermatan sulfate in mucopolysaccharidosis type 2 mouse tissues pre- and post-enzyme replacement therapy determined by UPLC-MS/MS » (Menkovic *et al.*, 2019). Dans cette étude visant à évaluer l'accumulation de l'héparan sulfate et du dermatan sulfate dans les tissus et les liquides biologiques de souris atteintes de la MPS II, il a été observé que seul l'héparan sulfate s'accumule au niveau du cerveau. Par ailleurs, les niveaux de dermatan sulfate au niveau du cerveau ne sont augmentés que de 1,6 fois chez les souris MPS II comparés aux souris contrôles (Menkovic *et al.*, 2019). Cette étude suggère donc que l'héparan sulfate est une molécule neurotoxique et son accumulation engendre d'importantes atteintes neurologiques (Bigger *et al.*, 2018; Menkovic *et al.*, 2019).

Pour ce qui est de la MPS IX (OMIM 601492), malgré l'absence de nombreux signes observables pour les autres MPSs, il est faux de croire qu'il s'agit d'une MPS dite peu sévère (Kyikim *et al.*, 2016). En fait, il s'agit de la plus rare des MPS avec seulement très peu de patients diagnostiqués à ce jour. Il est donc difficile pour ce type d'avoir des données probantes et représentatives (Puckett *et al.*, 2021).

## **15 Les traitements pour les mucopolysaccharidoses**

Il existe différentes approches pour traiter les patients atteints de l'un des différents types de MPSs. L'approche privilégiée dépend bien évidemment du type de MPS ainsi que de la situation particulière de chaque patient. De manière générale, trois types de traitements sont actuellement utilisés, soit les traitements symptomatiques, la thérapie enzymatique de remplacement (TER) et la transplantation de cellules souches hématopoïétiques. À elles seules, ces approches peuvent s'avérer inefficaces pour certains types de MPSs ou certaines atteintes spécifiques. Ainsi, certaines compagnies pharmaceutiques travaillent activement pour développer de nouveaux traitements tels que la thérapie génique ou de nouvelles approches pour rendre les traitements actuels plus efficaces.

### **15.1 Les traitements symptomatiques**

Tout d'abord, les traitements symptomatiques ont pendant longtemps été le seul type de traitements disponibles pour patients atteints de MPSs (D'Avanzo *et al.*, 2020). Ceux-ci sont

utilisés pour diminuer les complications associées aux signes et symptômes qui découlent de l'un des différents types de MPSs sans pour autant s'attaquer au problème à l'origine de ceux-ci, c'est-à-dire l'accumulation de substrat toxique en raison de l'incapacité de la cellule à dégrader ledit substrat. Ces traitements peuvent, par exemple, être des chirurgies ou des anti-inflammatoires pour soulager les patients présentant des atteintes respiratoires observables pour les cas de MPS I, II, IV et VII (Stapleton *et al.*, 2017).

### ***15.2 La thérapie enzymatique de remplacement***

Cette intervention vise à infuser au patient l'enzyme pour laquelle il est déficient. Cette intervention thérapeutique consiste en une infusion hebdomadaire de l'enzyme analogue en fonction du poids du patient (Concolino *et al.*, 2018). Pour un grand nombre de MPS, la TER constitue le traitement de choix pour s'attaquer au problème à l'origine des manifestations cliniques. En effet, la TER demeure un traitement très efficace pour bien des patients atteints de MPS (Concolino *et al.*, 2018). D'ailleurs, l'étude publiée en 2019 par notre groupe de recherche démontre clairement à quel point la thérapie enzymatique de remplacement est efficace pour réduire la concentration des substrats accumulés dans la très grande majorité des tissus (Menkovic *et al.*, 2019). À l'heure actuellement, ce type de traitement est disponible pour les MPSs I, II, IVA, VI et VII (Chen *et al.*, 2019). L'une des problématiques majeures de la TER est l'incapacité de l'enzyme analogue à traverser la barrière hématoencéphalique afin de produire une action thérapeutique au niveau du cerveau (Parini et Deodato, 2020). Malgré tout, différentes approches sont présentement sous étude afin de produire une enzyme analogue ou développer une approche qui serait en mesure de franchir cet obstacle.

### ***15.3 La transplantation de cellules souches hématopoïétiques***

Cette approche vise à transférer des cellules souches à partir d'un donneur sain vers un patient atteint de MPS. Ainsi, ces cellules souches vont se différencier en macrophages qui seront en mesure de sécréter l'enzyme initialement déficiente chez le patient. Plus précisément, cette enzyme sera sécrétée dans le sang puis elle sera captée par les différentes cellules du patient. Ces cellules auront alors la capacité de dégrader les GAGs accumulés. Contrairement à la TER, la transplantation hétérologue de cellules souches hématopoïétiques serait potentiellement en mesure de s'attaquer aux problèmes neurologiques dans une certaine mesure. Pour certaines MPSs comme la MPS I, ce traitement est d'ailleurs utilisé de manière

relativement fréquente (Taylor *et al.*, 2019) alors que pour d'autres types de MPSs, ce genre d'intervention est optionnel et moins fréquemment utilisé. La raison principale pour éviter ce type d'intervention était le manque de connaissances liées aux concepts de comptabilité en donneur et accepteur de greffe, ce qui à l'époque, entraînait un taux de mortalité très élevé relié à la maladie du greffon contre l'hôte (Taylor *et al.*, 2019). De nos jours, bien que nos connaissances dans le domaine aient progressé et que ce type d'intervention pourrait être utilisé pour différentes MPSs, nous avons relativement peu de données quant aux effets à long terme de celle-ci et ce, pour plusieurs MPSs (Guffon *et al.*, 2021). Contrairement à la TER, la transplantation de cellules souches hématopoïétiques serait potentiellement en mesure de s'attaquer aux problèmes neurologiques dans une certaine mesure cependant elle comporte malgré tout certains risques (Guffon *et al.*, 2021).

#### **15.4 La thérapie génique**

En théorie, la thérapie génique consiste à fournir via un vecteur, une version de type naturel du gène muté à l'origine de la mutation. À l'inverse de la thérapie par transplantation de cellules souches hématopoïétiques, les cellules du patient sont utilisées pour ce type d'intervention, ce qui réduit grandement le risque de rejet. En effet, les cellules souches sont prélevées chez le patient, corrigées *ex vivo* via la thérapie génique, puis réinjectées au patient (Fraldi *et al.*, 2018), ce qui permettrait au patient de produire lui-même l'enzyme déficiente. Au niveau des avantages, cette transplantation autologue possède un effet à long terme sans les risques associés à une transplantation hétérologue de cellules souches. Également, l'enzyme produite par le patient serait en mesure de franchir la barrière hématoencéphalique comme chez les individus sains (Fraldi *et al.*, 2018). Une autre approche, *in vivo* celle-là, avec l'usage d'un vecteur viral est également à l'étude (Fraldi *et al.*, 2018). Contrairement à l'approche *ex vivo*, cette approche *in vivo* consiste à injecter au patient un vecteur viral qui aura pour objectif d'infecter les cellules du patient puis de leur transférer une version normale du gène en question. Différents types de vecteurs viraux ont été étudiés au niveau de modèles animaux (souris). Toutefois, le vecteur AAV (Adeno-Associated Virus) est généralement privilégié pour des raisons de sécurité et de la grande expression du transgène (Fraldi *et al.*, 2018). À l'heure actuelle, la thérapie génique n'est pas un traitement offert systématiquement. En effet, cette approche thérapeutique est actuellement au stade des essais cliniques et devrait être disponible d'ici quelques années (Fraldi *et al.*, 2018).



### ***15.5 La thérapie de réduction de substrat***

Des études ont démontré que certaines substances telles que la génistéine, un composé appartenant à la catégorie des flavonoïdes, peut moduler la production de l'héparan sulfate (Tomatsu *et al.*, 2014). En effet, des études *in vitro* sur des cultures de fibroblastes de patients atteints de la MPS I, II ou III ont révélé que la génistéine inhibe la synthèse de l'héparan sulfate (Piotrowska *et al.*, 2006). Une étude subséquente a par la suite confirmé ces résultats en plus de démontrer l'applicabilité du traitement chez les patients avec une amélioration au niveau de différents signes et symptômes, dont au niveau des fonctions cognitives chez les patients atteints de MPS IIIA (Piotrowska *et al.*, 2008). Ainsi, cette approche peut présenter certains avantages par rapport à des thérapies telles que la TER ou la transplantation de cellules souches hématopoïétiques en termes de simplicité de traitement, de coûts et même au niveau des effets bénéfiques sur les fonctions cognitives (Piotrowska *et al.*, 2006). Toutefois, ce type de traitement n'est pas adapté à tous puisqu'il requiert une certaine activité enzymatique de base. En effet, la génistéine inhibe la synthèse de l'héparan sulfate via une cascade réactionnelle médiée par des facteurs de croissance épidermiques, ou « Epidermal Growth Factor » ou EGF (Jakóbkiewicz-Banecka *et al.*, 2009). Cette diminution de synthèse n'est cependant pas synonyme d'élimination du composé. Il est donc important que les patients traités par ce type d'approche thérapeutique possèdent une activité enzymatique résiduelle. La thérapie de réduction de substrat pourra alors créer un certain équilibre entre la synthèse et la dégradation du composé.

Bref, il y a plusieurs options qui sont disponibles pour les cliniciens afin de traiter leurs patients. Bien que ces approches soient différentes puisque chacune possède ses avantages et ses inconvénients, ces méthodes ont comme point commun le fait qu'un traitement précoce améliore grandement le devenir du patient en retardant l'apparition de signes et symptômes graves et irréversibles (Muenzer, 2014; Al-Sanna *et al.*, 2015; Giugliani *et al.*, 2021; Horovitz *et al.*, 2021). D'ailleurs, des différences frappantes en termes de manifestations cliniques de la maladie ont été observées entre les enfants d'une même famille où l'un a été diagnostiqué et traité tardivement dans l'enfance comparativement à la fratrie qui a été diagnostiquée à la naissance puis traitée très rapidement (Gabrielli *et al.*, 2016). Ladite étude démontre clairement la nécessité d'avoir des méthodes analytiques permettant un dépistage

rapide des enfants afin de pouvoir les identifier rapidement et débiter le traitement précocément afin de prévenir l'apparition de signes et symptômes graves et irréversibles.

### **16 La présentation du projet de recherche**

Les experts s'entendent pour dire qu'il est important de dépister rapidement les cas de MPS afin de fournir un traitement précoce et efficace au patient dans le but d'éviter l'apparition de manifestations cliniques graves et irréversibles (Muenzer, 2014; Al-Sannaa *et al.*, 2015; Giugliani *et al.*, 2021). Bien que certaines organisations telles que la « Recommended Uniform Screening Panel ou RUSP » qui est une agence gouvernementale américaine qui recommande le dépistage de la MPS I (RUSP, 2020), il en est différent pour la situation au Québec. De fait, nous n'avons aucune méthodologie en place pour faire un dépistage précoce de ces maladies à grande échelle. Considérant les bienfaits grandement documentés d'une intervention précoce, il est nécessaire d'étudier en profondeur la faisabilité d'inclure une méthode de dépistage populationnel des MPSs (MPS I, II, VI et VII) qui est compatible avec les méthodes et la plateforme technologique disponible au Programme québécois de dépistage néonatal urinaire au Québec. En effet, depuis son introduction en 1971, les parents de nouveau-nés, sur une base entièrement volontaire, prélèvent un échantillon d'urine sur papier filtre de leur bébé à 21 jours de vie qu'ils envoient au laboratoire de dépistage néonatal urinaire situé à Sherbrooke au CIUSSS de l'Estrie-CHUS. Ces échantillons d'urine sont élués à l'aide de 3 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 0,01M puis analysés par chromatographie sur couche mince pour le dépistage de différentes maladies par le dosage des acides aminés et acides organiques urinaires (Auray-Blais *et al.*, 2003; Auray-Blais *et al.*, 2007). Plus récemment, une recherche évaluative visant le transfert technologique de l'analyse d'échantillons d'urine sur papier filtre par chromatographie sur couche mince vers la spectrométrie de masse en tandem ouvre potentiellement la porte à l'ajout de nouvelles méthodes. Ce rehaussement technologique pourrait être en mesure de fournir des données probantes sur la faisabilité de dépister de nouvelles maladies métaboliques héréditaires (Auray-Blais *et al.*, 2021). En effet, cette nouvelle approche, combiné à une préparation d'échantillon adaptée, pourrait, en théorie, permettre d'analyser certaines molécules, comme les GAGs. Il est donc pertinent d'étudier la faisabilité d'inclure le dépistage des MPS comme recherche évaluative en utilisant la spectrométrie de masse en tandem.

### ***16.1 L'hypothèse***

Quelle est la faisabilité d'implanter un dépistage populationnel pour l'analyse individuelle des glycosaminoglycans urinaires chez les nouveau-nés en utilisant la spectrométrie de masse en tandem et une réaction de méthanolyse?

### ***16.2 Les objectifs du projet de recherche***

Le but du présent projet est d'étudier la faisabilité d'inclure un test de dépistage des MPSs compatible avec la méthodologie ainsi que la plateforme technologique en place du Programme québécois de dépistage néonatal urinaire avec une méthode courte et robuste permettant d'analyser à la fois l'héparan sulfate, le dermatan sulfate, la chondroïtine sulfate et la créatinine. Cette méthode d'analyse rapide devrait non seulement identifier les cas potentiels de MPS, mais elle devrait également préciser le type de MPS dont le nouveau-né est atteint. De manière plus précise, la méthode développée devrait être en mesure de dépister les MPS I, II, IIIA-D, VI et VII en fonction du DS et HS. Une fois développée, la méthode sera validée afin d'évaluer différents paramètres liés à la robustesse, la justesse et la fiabilité de celle-ci. De plus, des valeurs de référence seront établies en analysant 500 échantillons d'urine collectés sur papier filtre de nouveau-nés à 21 jours de vie. Finalement, des échantillons de patient atteints de différentes MPSs seront analysés pour évaluer la capacité de la méthode à identifier les cas positifs.

### ***16.3 Les retombées anticipées du projet***

Comme mentionné précédemment, la période à laquelle un traitement est initié influence grandement le pronostic. Ainsi, avec un dépistage populationnel, il serait possible d'identifier rapidement les nouveau-nés atteints de MPSs pour leur fournir un traitement adapté à leur condition. Cette prise en charge rapide aura ultimement pour effet de prévenir l'apparition de manifestations cliniques liées à la maladie et donc de fournir une meilleure qualité de vie au patient. De plus, un patient présentant moins de complications liées à la maladie signifie également un fardeau plus faible pour le système hospitalier.

## **17 Le Dépistage des MPS**

En 1968, James Maxwell Glover Wilson et Gunnar Jungner ont publié un important ouvrage intitulé « Principles and Practice of Screening for Disease ». Dans cette publication les auteurs mentionnent 10 critères sur lesquels se baser afin d'inclure une maladie dans un

programme de dépistage (Wilson et Jungner, 1968). Plus précisément, les critères Wilson et Jungner stipulent que :

1. La maladie dépistée doit être un problème de santé important
2. Un traitement doit être disponible
3. Les moyens de diagnostic et de traitement doivent être disponibles
4. La maladie doit être détectable à un stade précoce
5. Un test de dépistage adéquat doit être disponible
6. Le test doit être jugé acceptable par la population
7. L'histoire naturelle de la maladie doit être connue
8. Des critères préétablis pour les patients qui nécessitent un traitement
9. Le coût du dépistage doit être équilibré par rapport au coût global des soins médicaux
10. Le dépistage doit être une procédure continue et non ponctuelle

Bien que ces recommandations aient été élaborées il y a plus de 50 ans, celles-ci sont tout de même utilisées aujourd'hui afin d'inclure ou non une maladie dans un programme de dépistage. Il est important de mentionner que certaines MPS, comme la MPS I ou la MPS II répondent aux critères décrits par Wilson et Jungner. D'ailleurs, ces maladies sont soit incluses dans les programmes de dépistage des nouveau-nés ou bien leur dépistage est très fortement recommandé par les instances chargées de faire les recommandations. Aux États-Unis par exemple, la MPS de type I est parmi les maladies principales à dépister chez la population selon le « Recommended Uniform Screening Panel (RUSP) » (Burton et al., 2020). Cette maladie est dépistée dans de nombreux États américains comme la Californie, l'Illinois, le Kentucky, le Massachusetts, le Michigan, le Minnesota, le Missouri, le Nebraska, New York, l'Ohio, l'Oregon, la Pennsylvanie, le Rhode Island, le Tennessee, le Vermont et la Virginie. L'Illinois et le Missouri sont deux États qui dépistent également la MPS II (Burton et al., 2020; Arunkumar et al., 2020). Ailleurs à travers le monde, différents pays dont Taiwan, le Brésil et l'Italie mènent actuellement soit des études pilotes ou bien dépistent les MPSs de façon routinière chez les nouveau-nés. Dans la littérature, de

nombreuses publications décrivent les bienfaits et l'impact majeur que peut avoir une prise en charge rapide et un traitement précoce chez les patients atteints de MPS (Gabrielli et al., 2010; Kingma et Jonckheere, 2021; Giugliani et al., 2021; McBride et Flanigan, 2021).

En 2001, le groupe de Chamoles et al. a démontré la faisabilité de produire des essais enzymatiques à partir d'échantillons de sang séché sur papier filtre (Chamoles et al., 2001). À l'époque, des méthodes fluorimétriques étaient utilisées pour réaliser ces tests enzymatiques (Chamoles et al., 2001). De nos jours, c'est plutôt la spectrométrie de masse qui est utilisée pour ces tests en raison de la grande sensibilité et versatilité des différents systèmes. Ainsi, dans les régions où les MPSs sont dépistées, les laboratoires cliniques utilisent principalement des essais enzymatiques dont les résultats sont analysés par spectrométrie de masse comme test de première intention (Arunkumar et al., 2020). Les tests de seconde intention, utilisés afin de confirmer un diagnostic, impliquent généralement soit des analyses moléculaires ou bien une analyse des glycosaminoglycans (Arunkumar et al., 2020). Ces tests sont également très fiables puisque les taux de faux positifs sont relativement faibles soit aux alentours de 0.0037% et 0.108% pour la MPS I et II, respectivement (Arunkumar et al., 2020).

### **18 La préparation des échantillons élués des papiers filtres**

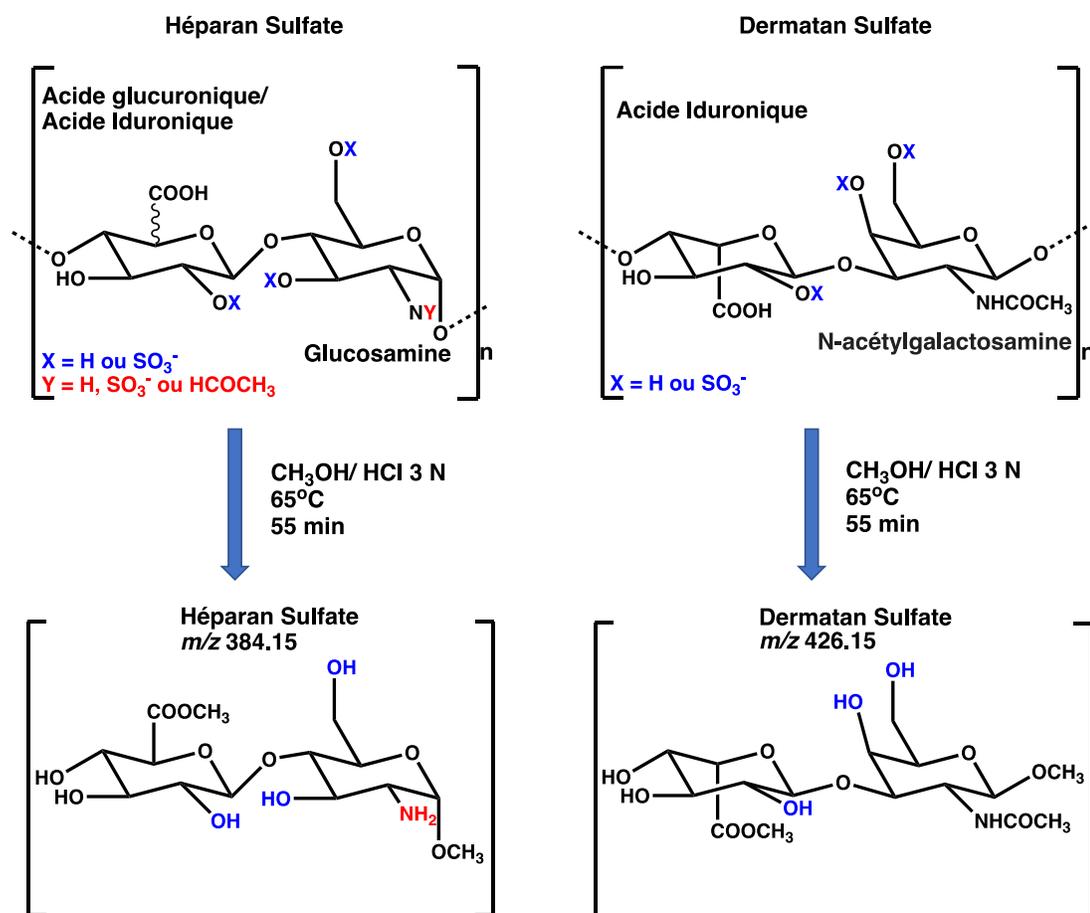
L'un des objectifs du projet était d'avoir une méthode d'analyse des glycosaminoglycans compatible avec le programme de dépistage urinaire actuel. Cela signifie que les échantillons utilisés sont des échantillons d'urine de nouveau-nés à 21 jours de vie prélevés sur un papier filtre. Une fois reçu, un disque de 5 cm de diamètre est coupé et l'urine est éluee à l'aide de 3 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 0,01M. Une portion de cet éluat est utilisée pour le programme de dépistage urinaire alors que le restant est disponible pour le test de dépistage des MPSs. L'un des premiers tests à faire était d'évaluer la quantité d'éluat requis pour obtenir des données fiables. Il est cependant important de mentionner que la méthode de préparation des échantillons implique une réaction de méthanolyse des glycosaminoglycans. En effet, au niveau structurel, les glycosaminoglycans sont très variables même au sein d'une même classe de molécules. Par exemple, deux molécules d'héparan sulfate peuvent être différentes au niveau de profil de sulfatation ainsi qu'au niveau de la longueur de la chaîne de molécules de sucre (Kubaski *et al.*, 2017). Évidemment, ces deux éléments affectent inévitablement le

$m/z$ , élément sur lequel le spectromètre de masse se base pour quantifier les composés. Il est donc nécessaire de normaliser ces molécules afin de s'assurer d'avoir des résultats justes. La méthanolyse, qui sera discutée plus en détail ci-dessous, est une réaction chimique qui vise à réduire les longues chaînes de sucres des glycosaminoglycans en disaccharides, donc en plus petites chaînes tout en retirant les groupements sulfatés (Auray-Blais *et al.*, 2011). Cette uniformité permettra donc de quantifier l'ensemble des molécules d'une classe donnée (héparan sulfate, dermatan sulfate, chondroïtine sulfate) et non seulement certaines espèces avec une longueur et un profil de sulfatation donné (Auray-Blais *et al.*, 2011). Toutefois, ce type de réaction n'est malheureusement pas compatible avec l'eau, soit la solution utilisée pour éluer les composantes présentes du papier filtre. En effet, en présence d'eau, il se produit en parallèle une réaction d'hydrolyse qui altère grandement les résultats obtenus. Il est donc primordial d'évaporer l'éluat pour la poursuite du traitement de l'échantillon. L'évaporation de l'eau est une étape passablement longue et le paramètre du temps est un élément à considérer dans le contexte du développement d'une méthode de dépistage populationnel. Il était donc important de trouver un compromis au niveau du volume d'éluat à évaporer tout en ne négligeant pas la sensibilité de la méthode et la durée globale de la préparation des échantillons. Par conséquent, différents volumes d'éluat variant entre 50  $\mu\text{l}$  et 750  $\mu\text{l}$  ont été testés. Un élément qui a été pris en considération pour le choix du volume d'éluat utilisé était la concentration de la créatinine pour éviter la saturation du détecteur. En effet, bien que les enfants ou nouveau-nés ont des niveaux de créatinine plutôt faibles, nous voulions que le test soit également utilisable chez des enfants plus vieux, pour le suivi d'un traitement par exemple. Ainsi, nous avons observé qu'avec les paramètres utilisés, une concentration de la créatinine de 20 mM saturait le détecteur pour des volumes d'éluat supérieurs à 100  $\mu\text{l}$ . De plus, l'étape d'évaporation étant relativement longue pour de hauts volumes d'éluat, nous avons alors opté pour un prélèvement initial de 100  $\mu\text{l}$  pour optimiser au maximum la sensibilité de la méthode ainsi que la durée de préparation des échantillons. Ce volume est ensuite évaporé sous jet d'azote avant de procéder à la méthanolyse.

### **18.1 La méthanolyse**

Considérant que deux molécules d'héparan sulfate peuvent varier en termes de profil de sulfatation ou de longueur de la chaîne de sucre (Sattelle *et al.*, 2015), ceci implique que ces différences peuvent affecter le rapport  $m/z$  sur lequel le spectromètre de masse se base pour

différencier les composés analysés. Il est donc important de procéder à une réaction chimique afin d'uniformiser les analytes. Cette tâche est réalisée par une réaction de méthanolyse qui a pour but d'ajouter des groupements hydroxyles (OH) à certains endroits bien précis sur la molécule. De plus, la réaction de méthanolyse effectue un clivage au niveau de la chaîne de sucre afin de produire de plus petites molécules de disaccharides qui seront plus facilement analysables en spectrométrie de masse en tandem (Figure 20).



**Figure 20.** Méthanolyse de l'héparan sulfate et du dermatan sulfate. Les disaccharides issus de cette dérivation seront facilement analysables par spectrométrie de masse en tandem.

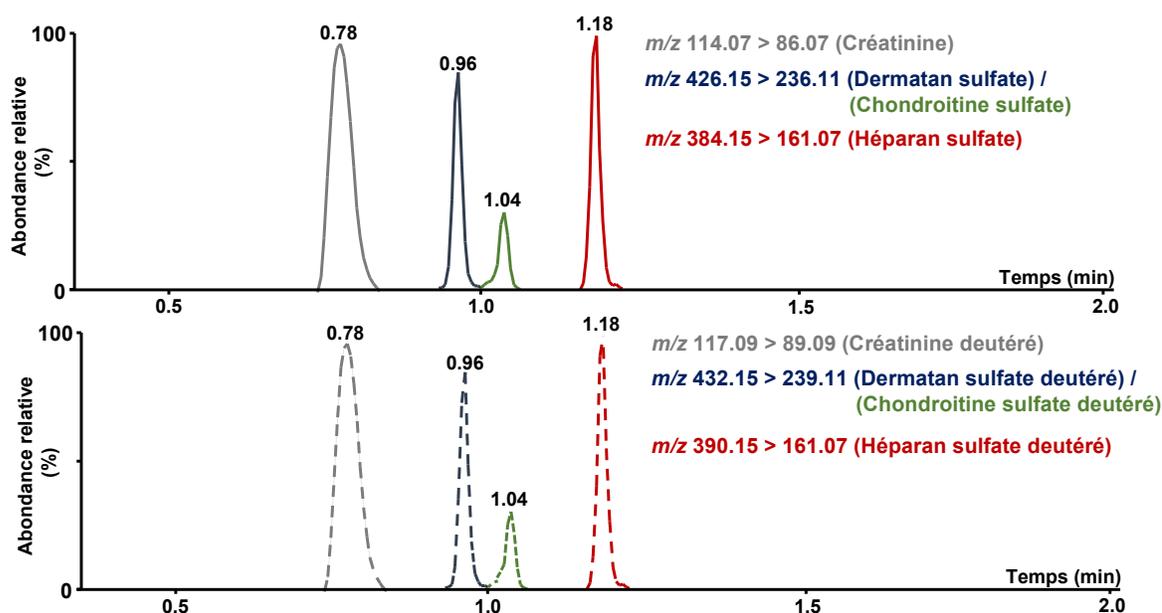
D'un point de vue méthodologique, la méthanolyse est réalisée en ajoutant 500  $\mu\text{l}$  de MeOH/HCl 3 N à l'échantillon puis en incubant le tout à une température de 65°C pour une durée de 55 minutes. La température utilisée ainsi que la durée d'incubation ont été optimisées dans le cadre d'une étude précédente afin d'obtenir la meilleure sensibilité possible (Menkovic *et al.*, 2019). Il est à noter qu'une réaction similaire est utilisée pour produire les standards internes deutérés d'héparan sulfate et de dermatan sulfate. En effet, en

remplaçant le MeOH/HCl standard par du MeOH-D<sub>4</sub>-DCl, des deutériums seront ajoutés sur les disaccharides. Les versions deutérées des analytes ont les mêmes propriétés physico-chimiques, mais elles sont différenciées par leur rapport  $m/z$ , ce qui en fait de bons standards internes pour ce type de méthode analytique.

Une fois la période d'incubation terminée, les échantillons sont évaporés à sec sous jet d'azote puis resuspendus dans 200  $\mu$ l d'une solution 90:10 H<sub>2</sub>O:ACN qui contient les standards internes deutérés pour les différents analytes, soit l'héparan sulfate, le dermatan sulfate ainsi que la créatinine. Finalement, un volume de 4  $\mu$ l d'échantillon est injecté dans l'appareil pour fin d'analyse.

### 19 La méthode de séparation chromatographique des analytes.

L'un des plus grands défis à surmonter lors du développement de la méthode présentée dans cette section était de mettre au point une méthode chromatographique rapide, compatible avec un contexte de dépistage populationnel et ce, sans compromettre la séparation chromatographique des différents composés. En effet, une méthode de 2 minutes ou moins était nécessaire pour permettre l'analyse du nombre visé de 500 d'échantillons par jour (Figure 21).



**Figure 21.** Séparation chromatographique des molécules d'intérêt pour la méthode de dépistage des MPSs. Il est à noter que la méthode chromatographique présentée ci-haut a



davantage été améliorée pour analyser les mêmes composés en 1 minute. Initialement, la méthode de 2 minutes présentée à la Figure 20 impliquait un gradient linéaire de 100% à 40% de phase mobile A (95:5 ACN:H<sub>2</sub>O + 0.2% FA + 10 mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>) entre 0 et 1,4 min, puis un retour aux conditions initiales (100% phase mobile A) entre 1,4 et 2,0 min. Une colonne UPLC BEH Amide a été utilisée pour la séparation chromatographique des analytes. Au niveau de la séparation chromatographique, il était important d'être en mesure de produire des pics avec une haute résolution pour obtenir des données fiables et reproductibles. De plus, il était nécessaire de bien séparer le dermatan sulfate du chondroïtine sulfate, car ces deux molécules ont une composition chimique similaire et leurs transitions sont identiques. Advenant que ces deux molécules ne soient pas séparées par la chromatographie liquide, la problématique majeure vient du fait que le spectromètre de masse ne sera pas en mesure de distinguer ces deux composés, entraînant alors une surestimation des résultats, voire des résultats erronés. De fait, considérant que le dermatan sulfate et la chondroïtine sulfate sont des composés distincts qui s'accumulent dans différents types de MPSs, il est donc primordial de bien les séparer pour offrir des résultats justes. Dans ce projet, une méthode chromatographique de 1 minute a été développée pour respecter les critères d'un dépistage populationnel. Les paramètres détaillés de ladite méthode sont présentés au Tableau 14 et dans l'Article 5 à la page 265.

**Tableau 14. Paramètres chromatographiques UPLC employés pour la méthode de quantification des glycosaminoglycans (Menkovic *et al.*, 2019).**

Paramètres	Description
Colonne chromatographique	BEH Amide (Waters Corp)
Dimension de la colonne	2,1 × 50 mm
Taille des particules	1,7 µm
Température de la colonne	40°C
Solvant « Weak Wash »	95:5 ACN:H <sub>2</sub> O + 0,2% HCOOH
Solvant « Strong Wash »	50:50 MeOH:H <sub>2</sub> O
Volume d'injection	4 µl
Température de l'échantillonneur	10°C
Phase mobile A	95:5 ACN:H <sub>2</sub> O + 0.2% HCOOH + 10 mM Acétate d'ammonium
Phase mobile B	10:90 ACN:H <sub>2</sub> O + 0.2% HCOOH + 10 mM Acétate d'ammonium
Débit	0,80 ml/min
Gradient (% phase mobile B)	0,0 → 0,1 min: 10%
	0,1 → 0,5 min: 60% (Gradient linéaire)
	0,5 → 1,0 min: 10%

## 20 La validation de la méthode et l'évaluation des valeurs de référence

Les paramètres de validation précédemment discutés dans la première section de cette thèse sont les mêmes qui s'appliquent à toutes les méthodes développées en spectrométrie de masse. Évidemment, bien que certaines méthodes plus complexes ne parviennent pas à toujours respecter ces conditions, il est important de bien documenter ces écarts. Dans le cas de la méthode présentée dans cette section, tous les critères de validation précédemment décrits ont été respectés. La méthodologie utilisée pour la validation ainsi que les résultats obtenus sont discutés en détail à l'Article 5 à la page 267 et 269.

Une fois la méthode développée et validée, le prochain objectif consistait à établir des valeurs de référence pour l'héparan sulfate et le dermatan sulfate. Afin d'établir ces valeurs, nous avons initialement considéré analyser 500 échantillons d'urine prélevés sur papier filtre à 21

jours de vie provenant de nouveau-nés. La cohorte de 500 échantillons d'urine a été sélectionnée afin d'établir une tendance fiable quant aux niveaux normaux d'héparan sulfate et de dermatan sulfate chez les nouveau-nés dans le cadre d'un dépistage populationnel. Évidemment, dans l'éventualité où cette tendance n'aurait pas été déterminante, davantage d'échantillons auraient alors été analysés. Afin d'établir des valeurs de référence, nous avons considéré que 5% des contrôles peuvent potentiellement être des cas suspects ou anormaux (Katayev *et al.*, 2010). Évidemment, ce fut là un point de départ. Une réévaluation de ce pourcentage sera faite au fil de l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons. Aussi, l'analyse de cas pathologiques nous permettra de déplacer ce seuil vers le haut pour tenter de diminuer le nombre de faux positifs ou vers le bas pour tenter d'éliminer le nombre de faux négatifs.

Afin d'établir les valeurs de référence pour cette méthode, nous avons calculé après l'analyse des 500 échantillons contrôles, une moyenne et un écart-type de 34.6  $\pm$  6.2 mg/mmol de créatinine pour l'héparan sulfate et de 17.3  $\pm$  3.9 mg/mmol de créatinine pour le dermatan sulfate. À partir de ces données, il fut possible de calculer le 99.7<sup>ième</sup> percentile en ajoutant 3 écarts-types aux moyennes calculées pour les biomarqueurs respectifs. Ces valeurs de référence devront toutefois être réajustées, selon le cas, suite à l'analyse d'échantillons de patients MPSs. En effet, une des limitations de cette étude fut l'absence d'échantillons d'urine de patient MPSs à 21 jours de vie. Malgré tout, pour évaluer la capacité de la méthode à distinguer les cas de MPS, des contrôles d'âge et de sexe appariés furent analysés. La méthode développée a pu détecter avec succès tous les cas de MPSs en présentant une élévation des biomarqueurs appropriés selon la maladie. En conclusion, cette méthode pourrait être utilisée dans le cadre d'un dépistage populationnel de mucopolysaccharidoses de type I, II, IIIA-D, VI et VII.

## 21 ARTICLE 1

### **Identification of a Reliable Biomarker Profile for the Diagnosis of Gaucher Disease Type 1 Patients Using a Mass-Spectrometry-Based Metabolomic Approach**

**Auteurs de l'article:** Iskren Menkovic, Michel Boutin, Abdulfatah Alayoubi, François E. Mercier, Georges-Étienne Rivard, Christiane Auray-Blais

**Statut de l'article:** Publié le 23 octobre 2020 dans *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 7869.

#### **Avant-propos:**

Iskren Menkovic a fait la préparation pré-analytique des échantillons, le développement de la méthode d'analyse, le traitement de données, la fragmentation et de l'élucidation de structures des biomarqueurs ciblés. Il a également rédigé le manuscrit présenté ci-dessous. Tout le travail réalisé par Iskren a été sous les conseils, les recommandations et la supervision des professeurs Michel Boutin et Christiane Auray-Blais.

#### **Mise en contexte:**

Ceci est le premier article en lien avec le projet Gaucher présenté dans la première partie de cette thèse. Le but principal des travaux présentés dans ce papier était d'identifier de nouveaux biomarqueurs pour la maladie de Gaucher. Actuellement, le lyso-Gb1 est en voie de devenir le biomarqueur de choix dans les laboratoires cliniques à travers le monde. Cependant, bien que le lyso-Gb1 semble corrélé avec la sévérité des atteintes observées chez les patients, l'analyse de ce biomarqueur ne permet pas d'orienter les cliniciens vers un type d'atteinte en particulier présent chez leurs patients. Dans la littérature, il existe relativement peu d'études métabolomiques qui ont eu pour but d'identifier de nouveaux biomarqueurs plasmatiques. Les études présentant de nouveaux biomarqueurs pour la maladie de Gaucher ont soit d'importantes lacunes méthodologiques ou des résultats plus ou moins concluants. Or, avec la méthodologie présentée dans l'Article 1, nous avons pour objectifs d'élaborer une méthodologie qui permet d'identifier de nouveaux métabolites permettant de discerner les patients Gaucher des contrôles sains. Ces travaux représentent en quelque sorte les bases scientifiques utilisées dans l'Article 2 qui porte sur la quantification des biomarqueurs découverts dans l'Article 1.

**Résumé :**

La maladie de Gaucher est une maladie lysosomale de transmission autosomique récessive caractérisée par une déficience de l'enzyme glucocérébrosidase. De façon plus précise, une mutation au niveau du gène *GBA* localisé sur ledit chromosome est à l'origine de cette maladie qui, à ce jour, demeure difficile à diagnostiquer en raison de la grande variabilité phénotypique et génotypique. De plus, les biomarqueurs précédemment utilisés ne sont pas toujours adaptés pour le diagnostic et/ou le suivi de la condition en raison d'un manque de sensibilité ainsi que de la variation des niveaux dits normaux explicable par la présence de certains polymorphismes présents dans la population générale. L'objectif principal de cette recherche scientifique était de réaliser une étude métabolomique par spectrométrie de masse en temps de vol couplée à la chromatographie liquide dans le but d'identifier de nouveaux biomarqueurs plasmatiques pour la maladie de Gaucher. L'analyse des différents échantillons de patients Gaucher non traités de même que les échantillons de contrôle d'âge et de genre appariés, des tests statistiques tels le « Principal Component Analysis, PCA », « l'Orthogonal Partial Least Square-Discriminant Analysis, OPLS-DA » et le « S-plot » ont permis de mettre en évidence sept biomarqueurs potentiels liés à la maladie. Des tests de fragmentations ont par la suite révélé que ces sept biomarqueurs potentiels sont le lyso-Gb<sub>1</sub> ainsi que quatre analogues (-28, -2, +14 et +18 Da), le sphingosylsphosphorylcholine et le N-palmitoyl-O-phosphocholine sérine. Des résultats préliminaires semblent également indiquer une variabilité au niveau de la distribution des biomarqueurs en fonction de la sévérité des manifestations cliniques. Cet article suggère que l'usage d'un ensemble de biomarqueurs soit l'approche idéale pour le dépistage précoce des individus à risque ainsi que pour le monitoring et le suivi des patients Gaucher.

## Identification of a Reliable Biomarker Profile for the Diagnosis of Gaucher Disease Type 1 Patients using a Mass Spectrometry-Based Metabolomic Approach

Iskren Menkovic, Michel Boutin <sup>1</sup>, Abdulfatah Alayoubi <sup>2,3</sup>, François E. Mercier <sup>2</sup>, Georges-Étienne Rivard <sup>4</sup> and Christiane Auray-Blais <sup>1\*</sup>

- 1 Division of Medical Genetics, Department of Pediatrics, Centre de Recherche-CHUS, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, CIUSSS de l'Estrie-CHUS, 3001, 12th Avenue North, Sherbrooke, QC J1H 5N4, Canada;
- 2 Divisions of Experimental Medicine and Hematology, Department of Medicine, Faculty of Medicine, McGill University, Lady Davis Institute for Medical Research, Jewish General Hospital, 3755, Côte Sainte-Catherine, Montreal, QC H3T 1E2, Canada;
- 3 Department of Biochemistry and Molecular Medicine, College of Medicine, Taibah University, University Road, Madinah 42353, Saudi Arabia
- 4 Division of Hemato-Oncology, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, 3175, Côte Sainte-Catherine, Montreal, QC H3T 1C5, Canada;

\* Correspondence: [christiane.auray-blais@usherbrooke.ca](mailto:christiane.auray-blais@usherbrooke.ca)

**Abstract:** Gaucher disease (GD) is a rare autosomal recessive multisystemic lysosomal storage disorder presenting a marked phenotypic and genotypic variability. GD is caused by a deficiency in the glucocerebrosidase enzyme. The diagnosis of GD remains challenging because of the large clinical spectrum associated with the disease. Moreover, GD biomarkers are often not sensitive enough and can be subject to polymorphic variations. The main objective of this study was to perform a metabolomic study using an ultra-performance liquid chromatography system coupled to a time-of-flight mass spectrometer to identify novel GD biomarkers. Following the analysis of plasma samples from patients with GD, and age- and gender-matched control samples, supervised statistical analyses were used to find the best molecules to differentiate the two groups. Targeted biomarkers were

structurally elucidated using accurate mass measurements and tandem mass spectrometry. This metabolomic study was successful in highlighting seven biomarkers associated with GD. Fragmentation tests revealed that these latter biomarkers were lyso-Gb<sub>1</sub> (glucosylsphingosine) and four related analogs (with the following modifications on the sphingosine moiety: -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, -H<sub>2</sub>, -H<sub>2</sub>+O, and +H<sub>2</sub>O), sphingosylphosphorylcholine, and N-palmitoyl-O-phosphocholineserine. Based on the plasma biomarker distribution, we suggest the evaluation of this GD biomarker profile, which might facilitate early diagnosis, monitoring, and follow-up of patients.

**Keywords:** Gaucher disease; metabolomics; mass spectrometry; glucosylsphingosine (lyso-Gb<sub>1</sub>), lyso-Gb<sub>1</sub> analogs; N-palmitoyl-O-phosphocholineserine; biomarkers; Plasma sphingosylphosphorylcholine

## Introduction

Lysosomal storage disorders (LSDs) are rare inherited metabolic conditions characterized by the inability of the lysosomes to process substrate(s), resulting in the accumulation of these compounds within the lysosome and ultimately leading to progressive and multisystemic clinical manifestations. Gaucher Disease type 1 (GD; OMIM 230800) is the most prevalent LSD with approximately 1 case in 40,000 births in the general population and 1 case in 800 births in the Ashkenazi Jewish population [1]. GD is the result of biallelic mutations in the GBA gene (1q22) leading to a deficiency of glucocerebrosidase, an enzyme involved in the catabolism of glucosylceramide (Gb<sub>1</sub>) [1,2]. This enzymatic defect leads to the accumulation of Gb<sub>1</sub> in the lysosome of reticuloendothelial cells, ultimately resulting in the formation of Gaucher cells [3,4]. Cytopenia, hepatosplenomegaly, and bone lesions are usually observed in GD patients due to Gaucher cell's infiltration of the liver, spleen, and bone marrow [4,5]. From a clinical perspective, three subtypes of GD can be observed based on the absence, presence, and severity of neurological involvement. In Gaucher disease type 1, which is the most common form of the disease, representing 90–95% of all GD cases, patients may, in some cases, experience milder neurological impairments, whereas in GD types 2 and 3, patients experience more severe symptoms, such as abnormal eye movements and seizures, along with brain damage [6,7]. Type 2 Gaucher disease is usually observed in infancy, whereas type 3 GD is detected in childhood and tends to progress more slowly than GD type 2 [8]. However, it is worth noting that there are no clear distinctions between the type 2 and

type 3 subtypes of GD but rather a phenotypic continuum ranging from horizontal ophthalmoplegia as the only neurological involvement in GD type 3 to hydrops fetalis in severe cases of GD type 2 [5,9,10].

While enzyme replacement therapy (ERT) is the most frequently used treatment, substrate reduction therapy (SRT) may also be offered to patients [11]. While these treatments are effective to different extents, studies have demonstrated that early initiation of treatment, when required, will ultimately result in better outcomes for the patients [11]. However, due to the large clinical spectrum and heterogeneity of the disease, early detection and confirmation of the diagnosis of GD patients remain challenging, thus highlighting the need for reliable GD biomarkers. Biomarkers, such as C-C motif chemokine ligand (CCL18/PARC), angiotensin-converting enzyme (ACE), tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRAP5b), and C-terminal telopeptide of type 1 collagen (CTX), may lead to the diagnosis of a GD case, but the quantitation of these compounds generally lack sensitivity and most of them are not specific to GD [12–16]. Chitotriosidase, an enzyme produced by activated macrophages, can be an interesting biomarker for the monitoring and follow-up of patients. However, it is not a reliable biomarker for the diagnosis of the disease, due to the high levels of polymorphism present in about 6% of the general population. This leads to major differences in baseline levels among GD patients, where some do not express chitotriosidase at all [17].

More recently, glucosylsphingosine (lyso-Gb<sub>1</sub>), a substrate generated following the deacylation of glucosylceramide by lysosomal acid ceramidase [18], has been observed in the plasma of GD patients and has since gained interest in the medical and scientific community [19–21]. Unlike most of the previously mentioned biomarkers, lyso-Gb<sub>1</sub> is specific to GD and is potentially involved in the pathogenesis of the disease, more specifically regarding the immune system, as well as the skeletal and neurological systems [22]. Studies also tend to demonstrate that levels of lyso-Gb<sub>1</sub> can be useful biomarkers for the diagnostic, prognostic, monitoring, and follow up of GD patients [23]. Previous studies revealed that lyso-Gb<sub>1</sub> in matrices such as dried blood spot or plasma can be reliable biomarkers for treatment efficiency and follow-ups of treated and untreated GD patients [24].

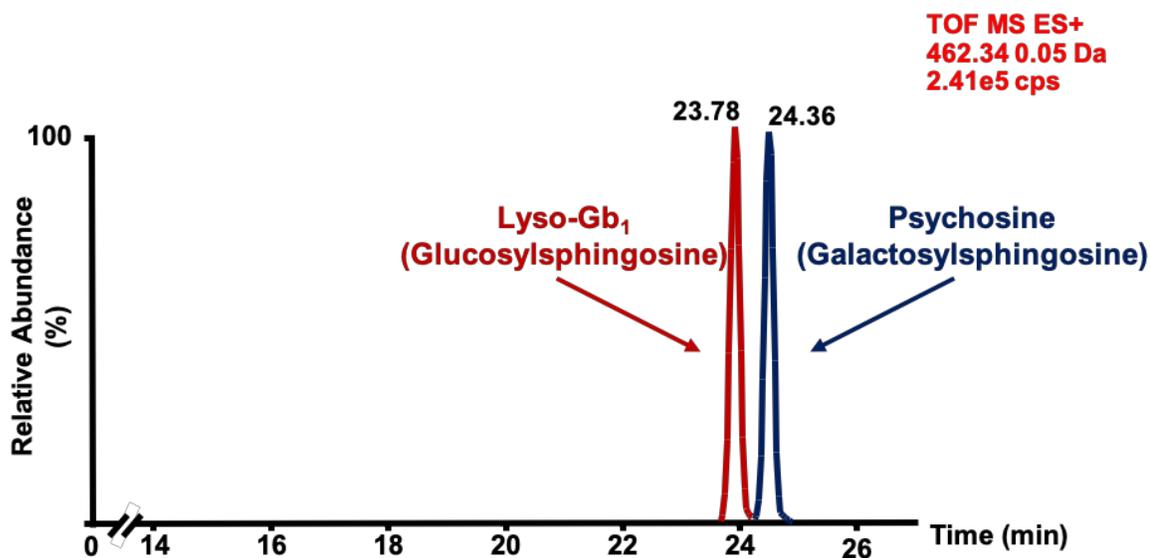


In fact, lyso-Gb<sub>1</sub> has been evaluated for a median range of 22 years as part of a long-term follow up of a large cohort of GD patients [25]. While lyso-Gb<sub>1</sub> appears to be a promising biomarker, we believe, based on research previously done by our group, that there might be other interesting biomarkers for GD patients that reflect the severity and progression of the disease in all GD patients. Indeed, previous metabolomic studies performed for Fabry disease, another lysosomal storage disorder, revealed that globotriaosylsphingosine (lyso-Gb<sub>3</sub>) is not a unique biomarker for Fabry disease patients. Our studies showed that analogs of lyso-Gb<sub>3</sub>, which are lyso-Gb<sub>3</sub> molecules with modified sphingosine moieties, are present in both plasma and urine of Fabry patients and are relevant to the disease [26–29]. We therefore suggest that a similar GD pattern may occur, since both GD and Fabry disease are involved in the same metabolic pathway. Mirzain *et al.*, hypothesized in 2015 that the chemical modifications observed on lyso-Gb<sub>3</sub> to generate the analogs in Fabry disease (which were discovered by Auray-Blais *et al.*) may also be present on lyso-Gb<sub>1</sub> to generate the analogs in Gaucher disease [30]. Their hypothesis proved to be correct, and this led to the identification and quantification of some lyso-Gb<sub>1</sub> analogs in GD plasma and urine specimens [30]. However, the compounds quantified by Mirzaian *et al.* were not characterized by mass spectrometry as being lyso-Gb<sub>1</sub> analogs, since no fragmentation studies were performed. Moreover, the chromatographic method proposed by Mirzaian *et al.* was not able to separate lyso-Gb<sub>1</sub> from galactosylsphingosine (psychosine), the latter being a biomarker for Krabbe disease [31]. Furthermore, compounds quantified by Mirzaian *et al.* were not subject to prior metabolomic studies, leading us to believe that other insightful molecules might be reliable biomarkers for GD.

The main objective of this study was to perform a semi-targeted plasma metabolomic study using ultra-performance liquid chromatography (UPLC) coupled to time-of-flight (TOF) mass spectrometry (MS) in order to identify a profile of sensitive and specific GD biomarkers that could be used for early detection, prognosis, monitoring, and follow up of affected patients. The secondary objective targeted the structural elucidation of biomarkers using accurate mass measurements and tandem mass spectrometry.

## Results and Discussion

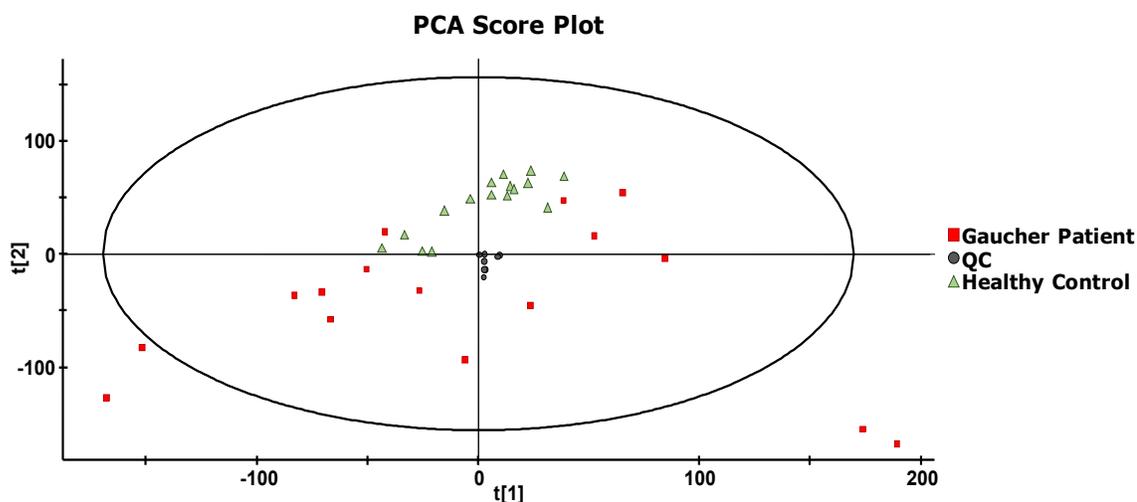
Before the development of the chromatographic separation method, we were aware of the existence of psychosine, a biomarker increased in Krabbe disease [32] which might interfere with the quantitation of lyso-Gb<sub>1</sub> considering that it is a molecule with physical and chemical properties similar to lyso-Gb<sub>1</sub> [33]. Therefore, in order to properly characterize the compound identified and better understand the physiopathology of Gaucher disease, a separation of psychosine and lyso-Gb<sub>1</sub> is preferred. Since the two compounds are differentiated only by the conformation of one hydroxyl group, normal phase chromatography was chosen for their separation, as shown in Figure 1. Based on the retention times of these two compounds, it was possible to extrapolate the retention times of the lyso-Gb<sub>1</sub> analogs based on their relative polarity, hence confirming that the analogs analyzed were from lyso-Gb<sub>1</sub> and not psychosine.



**Figure 1.** Chromatographic separation of glucosylsphingosine (lyso-Gb<sub>1</sub>; 5  $\mu$ g on column, retention time: 23.78 min) and psychosine (5  $\mu$ g on column, retention time: 24.36 min) commercial standards analyzed by time-of-flight mass spectrometry (MS-TOF) with a mass window of 0.05 Da. Peaks associated with each compound were confirmed by individual analysis of each standard. ES+ = positive electrospray.

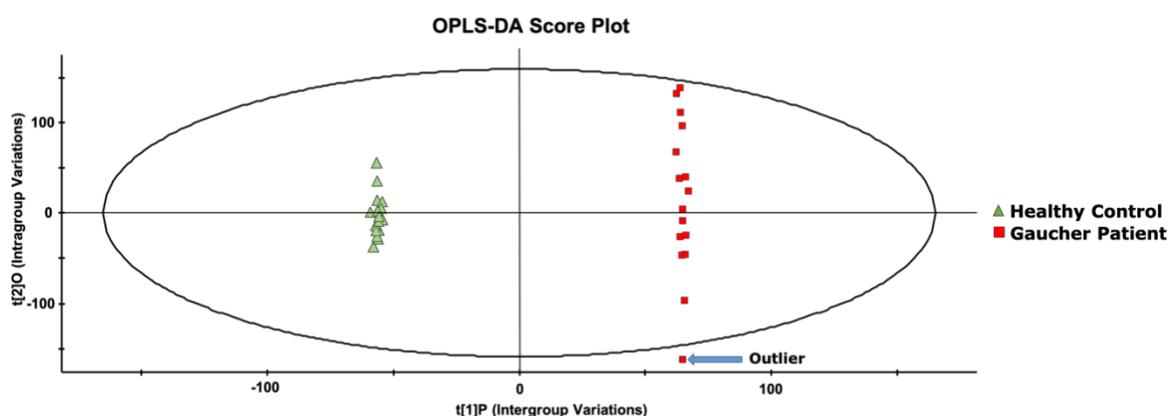
Data mining steps with the use of MarkerLynx (version 4.1), following the analysis of 16 untreated GD patients and 16 age- and gender-matched healthy controls, yielded a total of 91,197 markers, which were aligned based on the retention time and accurate mass. Data

were then imported in EZinfo for further multivariate statistical analyses. First, the system stability was evaluated using principal component analysis (PCA). Briefly, the PCA score plot allowed an evaluation of how similar or different samples were in terms of compositions according to their respective position on the score plot. Based on their chemical compositions, the more similar two samples were, the closer they appeared on the PCA score plot. Considering that quality controls (QCs) were replicate injections of a single sample, it was expected that QCs should be closely positioned on the PCA score plot. As shown in Figure 2, QCs ( $n = 8$ ) (represented in red) were indeed very close, confirming that the system, as well as the samples were stable for the entire duration of the study. This also indicates that variations observed in metabolite concentrations in the samples analyzed were not system-related but rather due to biological reasons. Proximity in the location of QCs also indicates that data alignment parameters were adequate for the study. Moreover, considering that QCs were obtained by sampling and mixing equal volume (20  $\mu$ L) from each healthy control and GD patient sample, it was expected that QCs should be located in the center of the PCA score plot, as shown in Figure 2, also confirming the reliability of the analyses done during this study.



**Figure 2.** A principal component analysis (PCA) score plot derived from the metabolomic analysis of plasma samples from untreated Gaucher disease (GD) patients ( $n = 16$ ), age- and gender-matched healthy controls ( $n = 16$ ), and quality control (QC) replicate injections ( $n = 8$ ). The ellipse corresponds to the Hotelling T2 range with a significance level of  $p = 0.05$ .

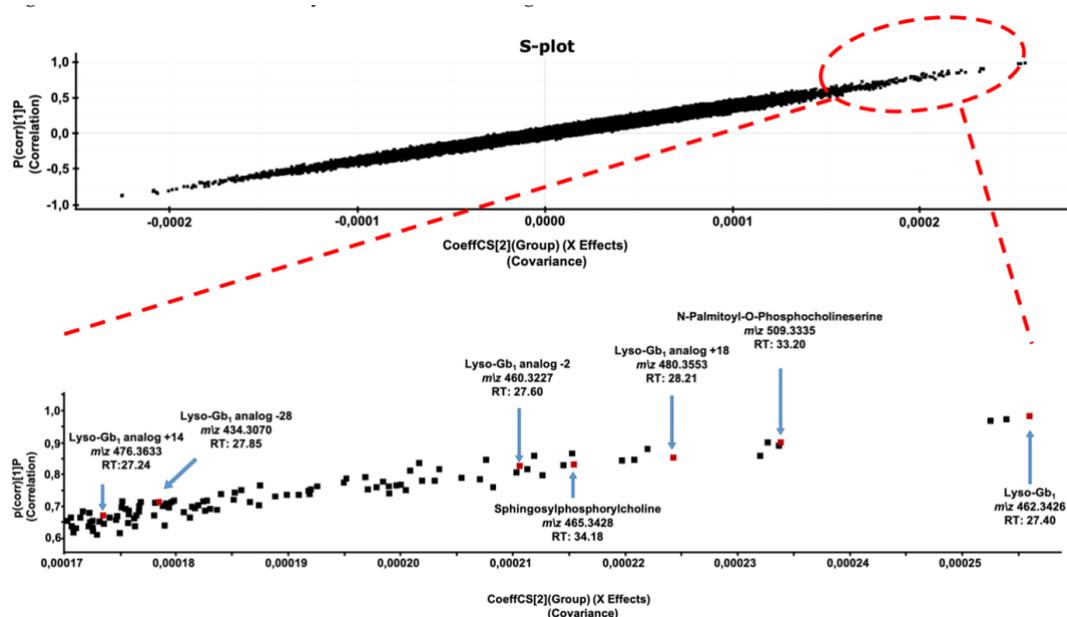
Once the system stability was confirmed, an orthogonal partial least-square discriminant analysis (OPLS-DA) was performed to identify compounds that would allow to separate the two groups under investigation. As shown in Figure 3, complete segregation of GD patients' samples and healthy control samples was achieved. It is important to note that based on the OPLS-DA chart, one patient was considered an outlier since he was plotted outside the Hotelling T2 range with a significance level of  $p = 0.05$ . This patient was affected with a mild form of GD type 1, which led to the system qualifying him as an outlier. However, he was not excluded from this study.



**Figure 3.** An orthogonal partial least-square discriminant analysis (OPLS-DA) score plot, resulting from the metabolomic analysis of plasma samples from untreated GD patients ( $n = 16$ ) and age- and gender-matched healthy controls ( $n = 16$ ). The ellipse corresponds to the Hotelling T2 range with a significance level of  $p = 0.05$ .

The metabolites which contributed most to the segregation of the two sample groups on the OPLS-DA score plot were detected using an S-plot (Figure 4). The more a compound was abundant in GD samples compared to healthy control samples, further it was positioned in the upper right-side corner of the graph. Conversely, the more a compound was abundant in healthy control samples compared to GD samples, further it was positioned in the lower left-side corner of the graph. Metabolites showing the highest separation power were located at the extremities of the S-plot graph. While both sides of the graph were investigated to identify potential biomarkers for GD using trend plot charts (Figure A1), as well as a visual inspection of the chromatographic peak associated

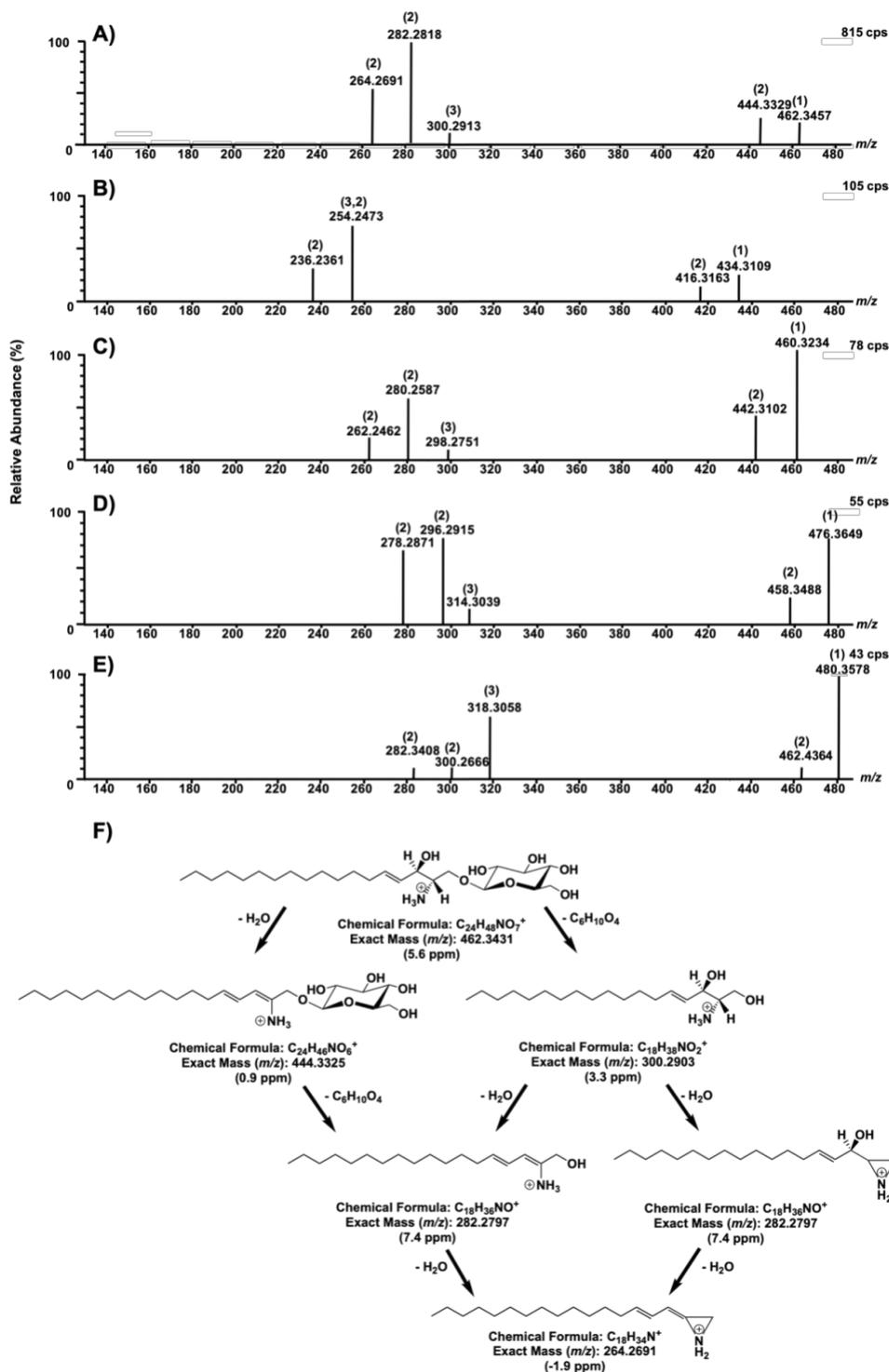
with the compound, only some metabolites located in the upper right-side corner of the graph ultimately resulted in potential GD biomarkers. Markers observed in less than 50% of GD samples, or that were present only in GD samples collected from one hospital or detected at higher concentration in one or some control samples, compared to GD samples, were automatically discarded. Ultimately, 7 compounds with mass to charge ratios ( $m/z$ ) of 434.3074, 460.3227, 462.3426, 465.3428, 476.3633, 480.3553, and 509.3335 were selected as potential GD biomarkers and further investigated using fragmentation tests to identify their structures (Figure 4).



**Figure 4.** S-plot showing the correlation in function of the covariance for the metabolites used to segregate GD patients and age- and gender-matched healthy controls in the OPLS-DA score plot. Specific positions of biomarkers (lyso-Gb<sub>1</sub>; lyso-Gb<sub>1</sub> analogs  $-28$  Da,  $-2$  Da,  $+14$  Da, and  $+18$  Da; N-palmitoyl-O-phosphocholineserine; and sphingosylphosphorylcholine) are zoomed in the lower part of the figure. Exact positions are indicated by a red square and an arrow. Accurate mass measured, as well as their respective retention times (RTs) in min, are indicated for each biomarker.

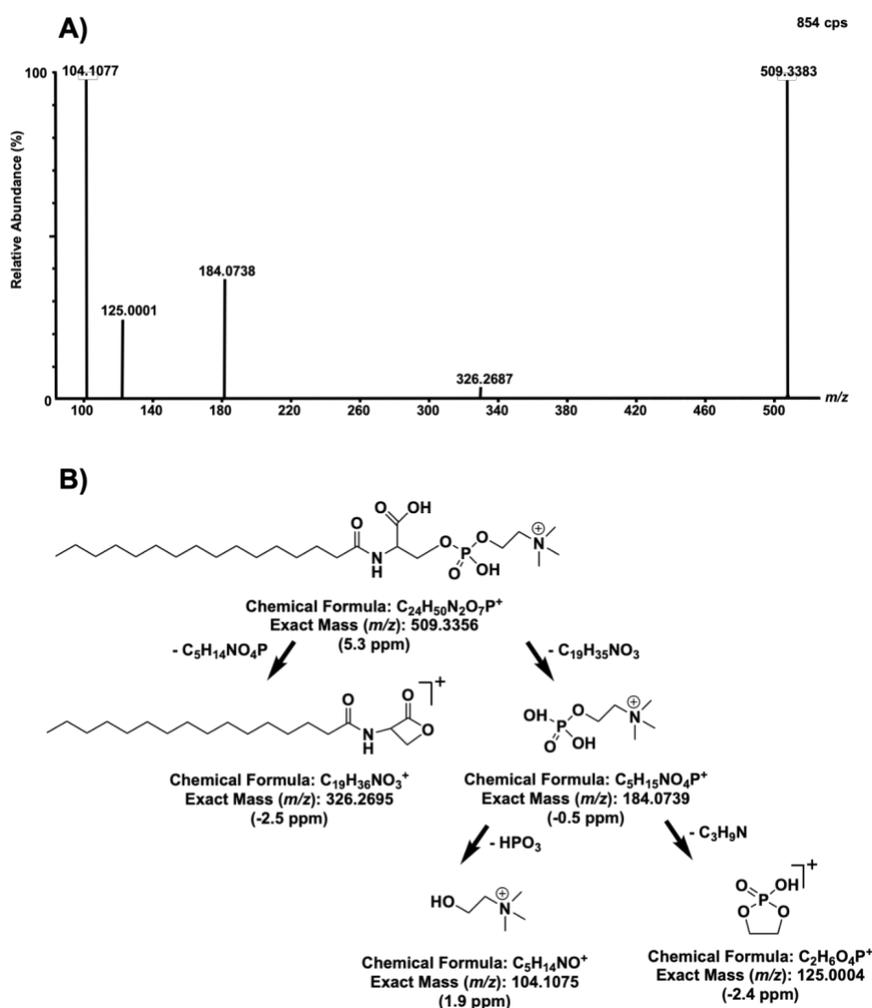
To ensure that fragmentation tests would produce fragments of sufficient intensity to obtain their accurate mass, samples were further concentrated. While sample purification remained the same, samples were resuspended in 100  $\mu$ L instead of 250  $\mu$ L to provide a

concentration factor of 2.5 for structural elucidation of all potential biomarkers, except analogs  $-24$  and  $+14$ , which were further concentrated five times to obtain a concentration factor of 12.5. Based on its  $m/z$ , the compound  $m/z$  462.3426 was suspected to be lyso-Gb<sub>1</sub>, which was later confirmed based on the fragmentation pattern. It was also observed that metabolites  $m/z$  434.3074, 476.3633, 480.3553, and 460.3227 had very similar fragmentation patterns to lyso-Gb<sub>1</sub>, suggesting that these four metabolites are analogs of lyso-Gb<sub>1</sub>. Based on the mass difference from lyso-Gb<sub>1</sub>, it is believed that these four potential biomarkers are, in fact, lyso-Gb<sub>1</sub>, with an extra double bond, which accounts for the loss of 2 H ( $-2$  Da) for metabolite  $m/z$  460.3227, a loss of C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> ( $-28$  Da) for metabolite  $m/z$  434.3074, and a loss of 2 H but a gain of O ( $+14$  Da) for metabolite  $m/z$  476.3633, and, finally, metabolite  $m/z$  480.3553 possesses a hydrated sphingosine instead of a double-bond, which accounts for the gain of 18 Da. According to the fragmentation spectra obtained, all those proposed structural modifications were located on the sphingosine. In a recent study by Mirzaian et al. [30], the authors previously identified and quantified the following lyso-Gb<sub>1</sub> analogs  $-28$  Da,  $-2$  Da, and  $+14$  Da, which were also highlighted in this study. However, the lyso-Gb<sub>1</sub> analog at  $+18$  Da has never been described in the literature. The fragmentation pattern for each molecule and a general fragmentation mechanism for lyso-Gb<sub>1</sub> is shown in Figure 5.



**Figure 5.** Fragmentation test results for compounds with  $m/z$  462.3426 (A), 460.3227 (B), 480.3553 (C) 434.3074 (D), and 76.3633 (E), with a collision energy ramp of 10–30 V. In each spectrum, (1) corresponds to the precursor ion, (2) indicates a loss of a water molecule from the previous fragment, and (3) represents a loss of a molecule of glucose. A fragmentation mechanism for lyso-Gb<sub>1</sub> ( $m/z$  462.3227) is proposed in (F).

Following fragmentation tests, it was observed for biomarkers  $m/z$  465.3428 and 509.3335 that a phosphocholine (PC) head group was present in both of these compounds based on the typical fragmentation pattern of PC heads, resulting in fragments with  $m/z$  at 184.072, 125.000, and 104.110. However, excluding the PC head, the two aforementioned molecules had different fragmentation patterns, suggesting that they may not be as closely structurally related. Fragments from biomarker  $m/z$  509 confirmed that it is a biomarker previously known as lyso-sphingomyelin-509 (lysoSM-509) (Figure 6).

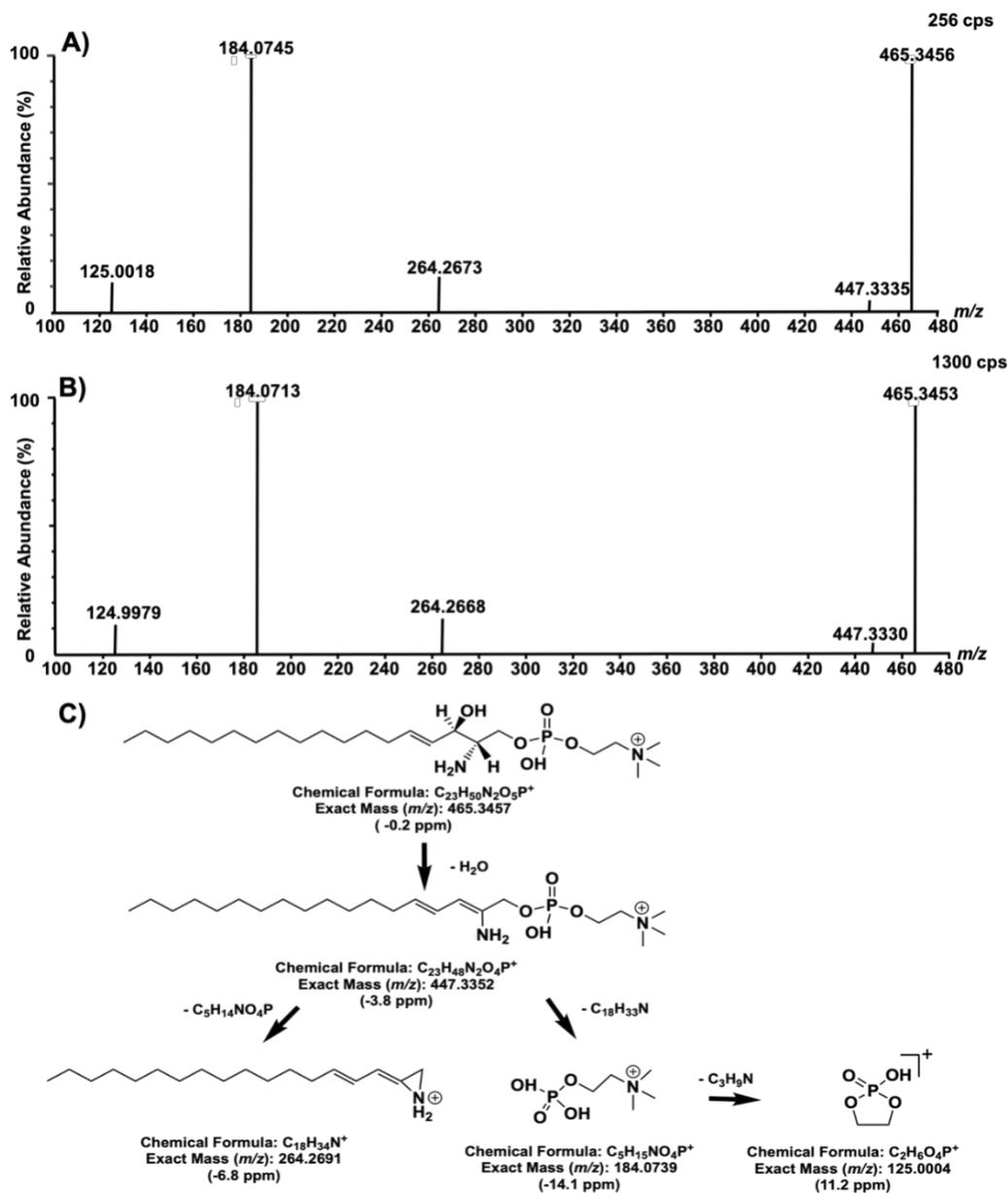


**Figure 6.** Fragmentation tests of compounds with  $m/z$  509 with a collision energy ramp of 10–25 V (A) and a fragmentation mechanism previously proposed by Sidhu et al. [30], with theoretical masses and measured mass errors in parts per million (ppm) (B).



Recently, Sidhu et al. proposed a structure for lysoSM-509 based on products obtained following precise chemical derivatization, aimed at confirming the presence of specific functional groups [34]. Ultimately, Sidhu et al. suggested that lysoSM-509 could be N-palmitoyl-O-phosphocholineserine. Fragments of the previously mentioned compound matched fragments observed in this study, confirming that the biomarker at  $m/z$  509.3383 is N-palmitoyl-O-phosphocholineserine. However, Sidhu et al. also observed N-palmitoyl-O-phosphocholineserine in Niemann–Pick disease patients, suggesting that this latter biomarker is not a specific biomarker for Gaucher disease but rather an indicator of a sphingolipidosis [34,35].

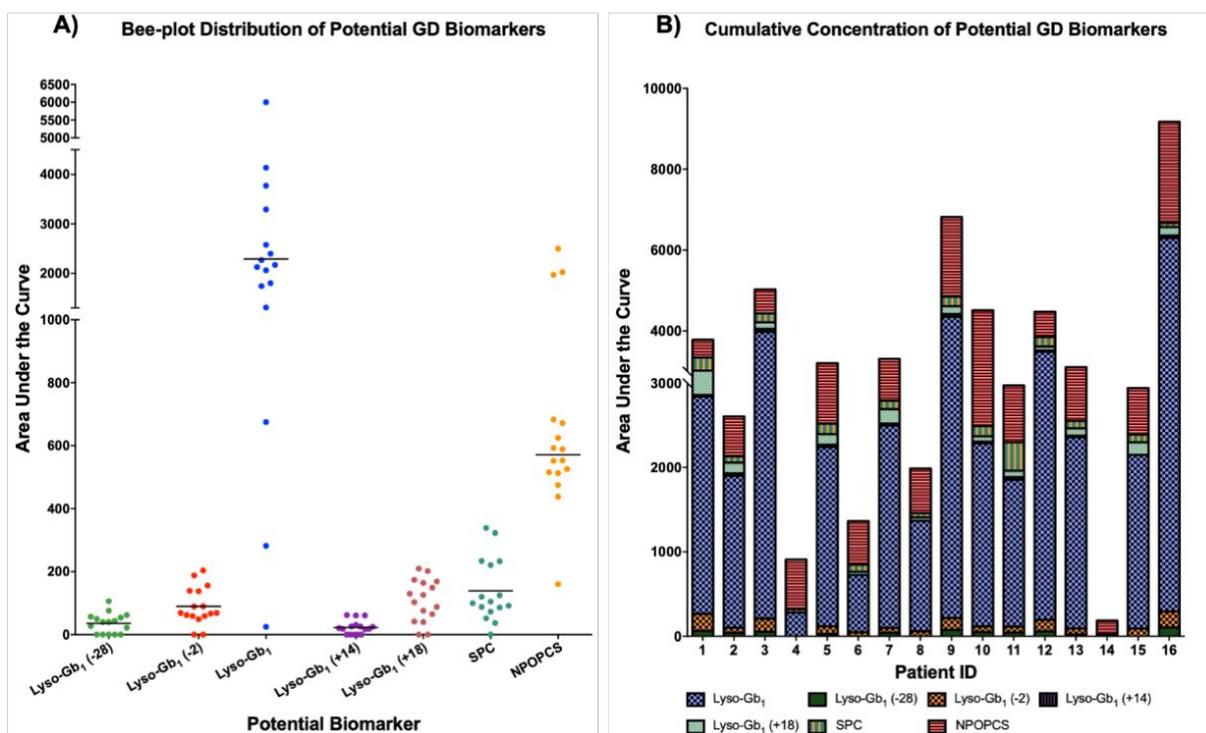
Finally, the biomarker at  $m/z$  465 was structurally elucidated based on the accurate mass measured and the fragmentation patterns (Figure 7). The proposed structure was ultimately confirmed by comparing fragments and their relative abundance, as well as the retention time of biomarker  $m/z$  465 with fragments of a standard of sphingosylphosphorylcholine (SPC) (d18:1).



**Figure 7.** Fragmentation test results of compounds with  $m/z$  465, with a collision energy ramp of 15–25 V (A). Fragmentation test results of a standard of sphingosylphosphorylcholine (d18:1) (10  $\mu$ g on column) (B) and a proposed fragmentation mechanism with theoretical and experimental exact mass differences (C).

Studies have demonstrated that SPC is a constituent of lipoproteins and a potentially important lipid mediator of cell type-specific functions in certain tissues. In fact, Thomas *et al.*, have shown evidence that SPC in rats “is a powerful vasoconstrictor of intrapulmonary arteries (IPA) and the novel finding that SPC-induced vasoconstriction

in IPA is dependent on activation of a  $Ca^{2+}$  is important, since it can mediate certain cell mechanisms, such as contractility and cell proliferation [36]. Moreover, SPC may also be implicated in chronic vascular disease with involvement in processes such as proliferation and migration of vascular smooth muscle cells by acting as a pro-inflammatory mediator by activating p38 mitogen-activated protein kinases [36]. This is consistent with inflammation being involved in the pathogenesis of GD [37]. However, SPC (similar to N-palmitoyl-O-phosphocholineserine) is not specific to Gaucher disease. Indeed, significantly increased concentrations of SPC were observed in patients with acid sphingomyelinase deficiency such as Niemann–Pick type A and type B [38,39]. However, this metabolomic study showed the importance of SPC quantitation, even in GD patients considering the segregation power of the biomarker based on its position in the S-plot graph (Figure 4). More specifically, the increase of each potential biomarker identified during this metabolomic study is shown in Figure 8 for each GD patient. These potential biomarkers were not detected in healthy control samples.



**Figure 8.** Bee-plot distribution (A) and cumulative concentrations (B) of potential GD biomarkers highlighted in the current metabolomic study. SPC and NPOPCS. The line in (A) represents the median value for each potential biomarker.

Our results show that N-palmitoyl-O-phosphocholineserine (G in Figure A2) was the only marker to be elevated in all GD samples. An increase in the concentration of lyso-Gb<sub>1</sub>, a biomarker known for its diagnostic utility, as well as its monitoring performance in GD, was observed in all samples analyzed, except for one patient (ID 14), who was affected with a more attenuated form of the disease. [40,41]. While N-palmitoyl-O-phosphocholineserine seems to be a sensitive biomarker for GD, it is not specific to the disease, but is rather an indicator of a sphingolipidosis. N-palmitoyl-O-phosphocholineserine is also a biomarker for Niemann–Pick type C disease, while SPC is a biomarker for Niemann–Pick type A and type B diseases [38,39,42]. Therefore, a diagnostic of GD only based on that compound would not be possible.

Additionally, lyso-Gb<sub>1</sub> was significantly more abundant than all the other analogs in plasma. In terms of distribution, lyso-Gb<sub>1</sub> represents over 91.4% of the total lyso-Gb<sub>1</sub> content, including the analogs. Meanwhile, the analogs at –28 Da, –2 Da, +14 Da, and +18 Da represent approximately 1.6%, 2.9%, 0.9%, and 3.2% of the total lyso-Gb<sub>1</sub> + analogs, respectively. The recovery of lyso-Gb<sub>1</sub> after solid phase extraction (SPE) was evaluated using a plasma sample spiked with 20 µg of lyso-Gb<sub>1</sub> commercial standard, either pre ( $n = 3$ ) or post-SPE ( $n = 3$ ) purification. The recovery rate for lyso-Gb<sub>1</sub> was calculated to be over 92%, thus suggesting that sample preparation was not a major source of lyso-Gb<sub>1</sub> analog loss. While lyso-Gb<sub>1</sub> seems to be a more abundant biomarker than its analogs in plasma for GD patients, we strongly believe that lyso-Gb<sub>1</sub> and its related analogs should all be evaluated and quantified, since these analogs may correlate with certain specific clinical manifestations in GD, as found in Fabry disease [43]. There seems to be a correlation between the bone marrow burden (BMB) score observed by MRI and the levels of lyso-Gb<sub>1</sub> and its analogs. Moreover, for some patients, the levels of the analog at –2 Da were higher than those measured for the analog +18 Da, while, for other patients, it was the opposite. Regarding SPC, an elevation of the biomarker was observed in all patients, except patient ID 14, who presented a less severe form of the disease and lower levels of lyso-Gb<sub>1</sub> (see Table 1, Figure A2). Unlike lyso-Gb<sub>1</sub> and its analogs, as well as N-palmitoyl-O-phosphocholineserine, increased levels of SPC did not correlate with a more severe form of the disease. In fact, GD patient ID 16 had a particularly high BMD score, as shown in Table 1, compared to all other GD patients, yet his SPC levels were not significantly more elevated than other patients. Other compounds, such

as glucosylceramide, a substrate normally catabolized by the enzyme glucocerebrosidase, which is deficient in GD patients, may potentially be an interesting biomarker for the disease. However, in order to investigate the relevancy of glucosylceramide and other similar compounds, a different sample preparation approach will be required

**Table 1.** Demographics, mutations, treatment, and signs and symptoms of GD patients.

Patient ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
Age	62	49	43	62	22	47	49	70	63	71	62	43	70	53	24	44	
Gender	F	F	F	F	F	M	F	F	M	M	F	F	F	F	M	F	
Age at diagnosis	28	40	36	16	N/E	12	40	42	19	21	3	36	N/E	44	13	27	
Mutations	N370S N370S	N370S N370S	N370S L444P	N370S	N370S W184	N370S L444P	N370S N370S	N370S L444P	N370S R120W	N370S W378G	L444P L444P	N370S N370S	N370S L444P	N370S R496H	N370S L444P	L444 84GG	
Treatment	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	
<b>Bone disease</b>																	
Bone pain	-	Mild	Moderate	Mild	-	Moderate	-	-	-	Mild	Moderate	Mild	Moderate	-	-	Mild	
Bone crisis	-	-	-	-	-	Moderate	-	-	Moderate	-	-	-	-	-	-	-	
Erlenmeyer flask deformity	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	x	
Bone marrow infiltration	x	x	x	x	-	x	-	-	-	x	-	x	x	-	x	x	
Osteopenia	-	-	-	-	-	x	-	-	x	x	x	-	x	x	-	-	
Infarction	-	-	-	-	-	x	-	-	x	-	-	-	x	-	-	x	
Avascular necrosis	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
New fractures	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Lytic lesions	x	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	
Decreased bone mineral density	-	-	-	-	-	x	-	-	-	x	-	-	-	-	x	-	
Bone marrow burden	DGS 5	LL 5 S 6-7	N/E	LL 4	S 3	N/E	LL 4 S 3	N/E	LL 7 S 5	DGS 7	N/E	N/E	LL 4 S 5-6	DGS 7	LL 2 S 3	N/E	LL 7 S 7
<b>Hematological and visceral manifestations</b>																	
Anemia	-	-	x	-	-	-	-	-	x	-	x	x	-	-	-	-	
Hemoglobin (g/L)	125	125	118	140	127	149	122	132	103	140	110	113	123	117	124	127	
Thrombocytopenia and coagulopathy	-	x	x	x	-	-	x	-	x	-	-	x	x	-	x	x	
Platelet counts (/L)	156	87	65	95	123	197	117	144	63	182	185	82	130	254	103	71	
Splenomegaly	Mild	Mild	Mild	-	-	-	x	N/A	Moderate	N/A	N/A	-	N/A	-	-	N/A	
Hepatomegaly	-	Mild	Mild	Mild	-	Mild	-	Mild	Moderate	N/E	Mild	Moderate	Mild	Moderate	Severe	-	
Splenectomized	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	x	-	-	x	
Gammopathies and malignancy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	
<b>Pulmonary disease</b>																	
Elevated arterial pressure	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	
Severe pulmonary hypertension	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Hepatopulmonary syndrome	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Respiratory failure	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Other	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

For bone marrow burden: lower limb (LL) and spine (S) score on 8. Düsseldorf Gaucher Score (DGS) score on 8. Non-applicable (N/A); not evaluated (N/E); (x) = sign or symptom observed in GD patient; (-) = sign or symptom not observed in GD patient; female (F); male (M). It should be noted that the samples sent from different hospitals had different evaluation tests and procedures for their respective patients. Moreover, certain tests, such as bone marrow burden, were not assessed for all patients

## **Materials and methods**

### **Ethics Approval**

This project was approved by the Research Ethics Board (REB) of the Faculty of Medicine and Health Sciences of the Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke (CHUS: Project ID MP-31-2017-1414, Sept 28<sup>th</sup>, 2016), as well as the REB of Montreal's Jewish General Hospital (Project ID MEO-31-2020-1937, Nov 22<sup>nd</sup>, 2019) and Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine as a multicentric evaluation (Project ID MEO-31-2021-2782, Sept 28<sup>th</sup>, 2016). Informed consent from all GD patients and healthy controls were obtained.

### **Patients and Controls**

Blood samples were collected from 16 untreated patients previously diagnosed with GD (age range: 22–71 years old; 4 males, 12 females) and 16 age- and gender-matched controls (age range: 26–66 years old; 5 males, 11 females). Adult men and women with a confirmed diagnosis of GD type 1 were included in this study. Treated GD type 1 patients, as well all GD type 2 and type 3 patients, were excluded from this study. Controls recruited did not have any LSDs or other comorbidities. The diagnosis was confirmed for each GD patient by demonstrating marked enzyme deficiency of  $\beta$ -glucosidase in peripheral blood leukocytes and sequencing of the GBA gene. Only untreated GD patient samples were considered for this metabolomic study to ensure that a significant increase of potential GD biomarkers would be observed.

### **Clinical Features and Biochemical Parameters**

GD patients' demographics, mutations, treatment, and signs and symptoms are shown in Table 1. Some patients had comorbidities, such as diabetes (patients 4 and 11), ovarian adenocarcinoma (patients 8 and 13), and hypercholesterolemia (patients 4 and 10). Patient 6 had unconjugated hyperbilirubinemia, while patient 9 was suffering from minor beta thalassemia and multiple cystic lesions in the liver and spleen.

## Whole Blood and Plasma Specimen Collection and Processing

Using a 21 G butterfly needle, whole blood samples were collected into BD Vacutainer tubes with sodium citrate as an anticoagulant. Plasma was immediately extracted by centrifugation at 2000 g for 10 min and transferred into 15 mL Falcon tubes. Plasma samples were stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until the metabolomic study was performed.

## Reagents

Glucosylsphingosine (lyso-Gb<sub>1</sub>; >98%) and galactosylsphingosine (Psychosine; >98%) were purchased from Matreya (Pleasant Gap, PA, USA). LC-MS grade acetonitrile (ACN) and HPLC grade methanol (MeOH) were purchased from EMD Chemicals Inc. (Darmstadt, Germany), while Optima LC-MS grade water, American Chemical Society (ACS) grade ammonium formate (Amm. Form.), o-phosphoric acid (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 85%), and ammonium hydroxide (NH<sub>4</sub>OH; 28% - 30% purity) were obtained from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA). ReagentPlus grade dimethyl sulfoxide (DMSO;  $\geq 99.5\%$ ) and terfenadine were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA), and, finally, formic acid (FA; >99%) was purchased from Acros Organics (Morris Plain, NJ, USA).

## Sample Preparation

Untreated GD patients or healthy control plasma samples were vortexed for 10 s, and 200  $\mu\text{L}$  of plasma was then transferred into 2 mL Eppendorf plastic tubes. A total of 500  $\mu\text{L}$  of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (2% in water) and 500  $\mu\text{L}$  of MeOH were added to the plasma sample, followed by 10 s of mixing (vortex). Sample mixtures were transferred to mixed-mode cation-exchange cartridges (Oasis MCX, 30 mg, 60  $\mu\text{m}$ , Waters Corp., Milford, MA, USA), previously conditioned with 1000  $\mu\text{L}$  of MeOH and 1000  $\mu\text{L}$  of 2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> using a glass pipette. Cartridges were washed with 1000  $\mu\text{L}$  of 2% FA in H<sub>2</sub>O solution, followed by 1000  $\mu\text{L}$  of 0.2% FA in MeOH solution. Analytes were then eluted into glass tubes using 600  $\mu\text{L}$  of 2% ammonium hydroxide in MeOH solution. Eluates were evaporated to dryness under a stream of nitrogen. Finally, samples were resuspended in 250  $\mu\text{L}$  of the resuspension solution (50  $\mu\text{L}$  DMSO mixed with 200  $\mu\text{L}$  of 94.5:2.5:2.5:0.5 ACN:MeOH:H<sub>2</sub>O:FA + 5 mM Amm. Form) and transferred into glass inserts fitted into 2 mL glass vials. A total of 10  $\mu\text{L}$  of the sample was injected into the UPLC-TOF/MS system for analysis. A quality control (QC)



sample was prepared by mixing together 20  $\mu\text{L}$  of each sample from GD patients ( $n = 16$ ) and healthy controls ( $n = 16$ ) analyzed in the study.

### Instrumentation and Parameters

The metabolomic study was performed using the Synapt G1 QTOF (Waters Corp., Milford, MA, USA) mass spectrometer coupled to an Acquity UPLC system (Waters Corp). Chromatographic separation of plasma components was achieved in a 45-min method using a HPLC Halo HILIC column ( $4.6 \times 150$  mm,  $2.7 \mu\text{m}$  particle diameter) from Advanced Materials Technology (Wilmington, DE, USA), with a constant flow rate set at  $0.5 \text{ mL}/\text{min}$  and an operating temperature of  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Chromatographic mobile phase A was 94.5:2.5:2.5:0.5 ACN:MeOH:H<sub>2</sub>O:FA + 5 mM Amm. Form., while chromatographic mobile phase B was 10:89.5:0.5 ACN:H<sub>2</sub>O:FA + 5 mM Amm. Form. The “weak” and “strong” needle wash solutions were Phase A and 100% ACN, respectively. The gradient and in-depth parameters used to separate sample components are presented in Table 2.

**Table 2.** Ultra-performance liquid chromatography (UPLC) parameters for the separation of the plasma samples analyzed during the metabolomic study.

Parameters	Description
Column	Halo HILIC 2.7
ID x Length	4.6 x 150 mm
Particle size	$2.7 \mu\text{m}$
Column temperature	$30^\circ\text{C}$
Weak Wash solvent	94.5:2.5:2.5:0.5 ACN:MeOH:H <sub>2</sub> O:FA + 5 mM Amm. Form.
Strong Wash solvent	ACN
Injection volume	$10 \mu\text{L}$
Injection mode	Partial Loop
Autosampler temperature	$10^\circ\text{C}$
Mobile phase A	94.5:2.5:2.5:0.5 ACN:MeOH:H <sub>2</sub> O:FA + 5 mM Amm. Form.
Mobile phase B	10:89.5:0.5 ACN:H <sub>2</sub> O:FA + 5 mM Amm. Form.
Flow rate	$0.5 \text{ ml}/\text{min}$
Gradient (% mobile phase B)	0.0 to 0 min: 0%
	5.0 to 20.0 min: 0 to 10% (Linear gradient)
	20.0 to 25.0 min: 10%
	25.0 to 35.0 min: 10 to 60% (Linear gradient)
	35.0 to 40.0 min: 60
	40.0 to 45.0 min: 0%

The parameters for data acquisition, lock mass calibration, and MS-TOF are presented in Table 3. In order to maintain a high level of mass accuracy throughout the entire duration of the metabolomic run analysis, a standard solution of terfenadine (500 nM, ACN 5%, FA 0.2%), used for real-time calibration, was continuously infused throughout the analysis, using a lock mass probe connected to an isocratic pump model 515 (Waters Corp.). The flow rate of the isocratic pump was set at 1 ml/min. However, since a T splitter was used in the system, linking the pump to the lock mass probe, the actual flow rate of calibrant used was approximately 12  $\mu$ l/min.

**Table 3.** Mass spectrometry (MS) parameters for the quantitation of compounds present in the plasma samples analyzed during the metabolomic study.

<b>Parameters</b>	<b>Description</b>
Scan Mode	MS-TOF
Ionization Mode	Electrospray Ionization
Polarity	Positive
Analyzer Mode	V
Dynamic Range	Extended
Capillary Voltage	1.4 kV
Sampling Cone Voltage	10 V
Extraction Cone Voltage	5.0 V
Source Temperature	150 °C
Desolvation Temperature	450 °C
Cone Gas Flow	30 L/h
Desolvation Gas Flow	700 L/h
Trap Collision Energy	4.0 V
Transfer Collision Energy	2.0 V
Data Format	Centroid
Mass Range	50–1000 Da
Scan Time	0.1 s
<b>Lock mass</b>	
Compound	Terfenadine (500 nM)
Exact Mass	472.3215 Da
Solvent	94.5:5:0.5 H <sub>2</sub> O:ACN:FA
Scan Time	0.5 s
Interval	5.0 s
Sampling Cone Voltage	5 V
Trap Collision Energy	10
Mass Window	+/- 0.2 Da
Scan Average	3

Following the UPLC-TOF/MS analysis, the peaks detected were processed using the software MarkerLynx XS (Waters Corp., Version 4.1) in order to align markers detected in samples based on their UPLC retention times and mass to charge ratios ( $m/z$ ) and to evaluate their peak areas. Markers with a mass below 50 Da and above 1000 Da were also excluded in this step. Based on data obtained from the QC samples analyzed periodically throughout the metabolomic run in alternance with GD patient samples and healthy control samples, the mass window and the retention time window were set at 0.05 Da and 0.20 min. The intensity threshold was set at 5 counts. Data from over 91,000 different peaks detected in the samples analyzed were then transferred to EZinfo, a software of Umetrics (Umeå, Sweden) integrated to the Extended Statistics Tools Box of MassLynx v4.1 (Waters Corp.), for multivariate statistical analysis in order to identify compounds expressed differently in the GD patients group compared to the healthy control group. The Unit Variance (UV) and Pareto scaling algorithms, with and without logarithmic transformation, were tested.

Ultimately, UV scaling with logarithmic transformation was selected, since all the most promising biomarkers highlighted with the other scaling methods were also detected with this algorithm. UV scaling is expressed by the equation  $UV = \frac{x - \bar{x}}{SD}$ , where  $x$  is the area under the curve for a marker in a specific sample, whereas  $\bar{x}$  and SD are the average and the standard deviation of the areas under the curve for the same marker measured in all samples, respectively. UV scaling reduces the emphasis of more abundant compounds while increasing the contribution of less abundant compounds, making all metabolites similarly important regardless of their respective abundance [44]. Logarithmic transformation, on the other hand, is used in order to correct the heteroscedasticity observed in the analyses [44]. Once an optimal scaling method was selected, the system stability throughout the study was inspected by evaluating the distribution of QC sample replicate injections ( $n = 8$ ) performed periodically during the metabolomic run in a principal component analysis (PCA) chart. Following PCA analysis, an orthogonal partial least-square discriminant analysis (OPLS-DA) was used to target compounds with differential expression in the two groups under investigation. Finally, an S-plot was used to select metabolites contributing the most to the discrimination between the GD patients' samples and the healthy control samples during OPLS-DA. Based on the trend plot chart distributions, metabolites that were expressed differently in the two groups were selected and further investigated.

Fragmentation tests using UPLC-quadrupole time-of-flight (QTOF) mode were performed to structurally elucidate the compounds of interest. These compounds were isolated in the quadrupole and fragmented in the collision cell, and the produced fragments were analyzed using the TOF analyzer to obtain their accurate masses. Main source ionization parameters and UPLC parameters remained unchanged for this procedure, while lock mass sampling cone voltage was increase to 12 to obtain a good signal for terfenadine

## **Conclusion**

The current metabolomic study has successfully identified and characterized seven potential biomarkers in the plasma of untreated GD patients using rapid SPE purification followed by a UPLC-TOF/MS analysis. As previously mentioned, some were already identified but not characterized by fragmentation studies. In summary, out of the 91,197 markers observed in plasma samples of GD patients and age- and gender-matched controls, lyso-Gb<sub>1</sub> and four related analogs (-28 Da, -2 Da, +14 Da, and +18 Da), SPC, and N-palmitoyl-O-phosphocholineserine were highlighted as relevant to the disease by multivariate statistical analyses, such as OPLS-DA and S-plot charts. The lyso-Gb<sub>1</sub> analog +18 Da has never been described in the literature, while lyso-Gb<sub>1</sub> analogs -28 Da, -2 Da, and +14 Da have never been characterized using chromatographic separation or mass spectrometry fragmentation tests.

Although lyso-Gb<sub>1</sub>, SPC, and N-palmitoyl-O-phosphocholineserine have previously been observed in GD plasma samples, the metabolomic study has demonstrated the importance of evaluating a group of potential biomarkers to achieve a high level of sensitivity for a potential GD diagnostic test. Indeed, patient ID 14 did not have significantly elevated plasma levels of lyso-Gb<sub>1</sub> or its related analogs. However, he did have increased levels of N-palmitoyl-O-phosphocholineserine. Therefore, a potential diagnostic test based solely on lyso-Gb<sub>1</sub> would have provided a false negative result for this latter patient. This emphasizes the importance of having a diagnostic test based on a profile of biomarkers to be analyzed rather than only one biomarker. Considering that two biomarkers are not specific for GD (SPC and N-palmitoyl-O-phosphocholineserine) since they can be detected in other LSDs, we strongly recommend that these seven biomarkers be part of a biomarker profile for GD diagnosis, thus improving the overall specificity. In fact, having biomarkers that are not specific for GD

highlights the importance of performing the enzyme analysis or molecular testing to confirm the diagnosis. However, the suggestion to use a profile of biomarkers might help for the early detection of GD patients. Potential test results, where N-palmitoyl-O-phosphocholineserine and SPC are increased, while lyso-Gb<sub>1</sub> and its related analogs are not detected, might lead to a false differential diagnosis. While biomarker quantitation analysis is often the first test performed for potential GD patients, a thorough enzyme activity testing and molecular genetics analyses are necessary to confirm the diagnosis. Future perspectives will involve the development of a novel validated method for the quantitation of these biomarkers using a tandem mass spectrometry approach to thoroughly investigate potential correlations between biomarker concentrations and age, as well as clinical manifestations in treated and untreated GD patients for additional insights into the pathophysiology of the disease.

### **Study Limitations**

Study limitations include the small number of untreated GD patients, as well as a low number of different mutations.

### **Author Contributions**

I.M. was involved in the sample preparation, analysis, and data processing. I.M. was also involved in the original draft preparation, as well as the review and editing process. M.B. was involved in the supervision of the study and the interpretation of results, in the drafting and revision of the manuscript. A.A., F.M., and G.-E.R. provided the samples used for this study, as well as pertinent patient clinical information. They were also involved in the revision of the manuscript. C.A.-B. was involved in the design and supervision of the study and in the interpretation of results. C.A.-B. also facilitated the recruitment of specimens from healthy controls and GD patients and secured the resources and funding required for this study. C.A.-B. was also involved in the drafting and revision of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Shire/Takeda Pharmaceutical.

### **Acknowledgments**

We would like to acknowledge Shire/Takeda Pharmaceutical for funding this research project. We are grateful to the Faculty of Medicine and Health Sciences at the Université de

Sherbrooke for a doctoral student grant for Iskren Menkovic. We would also like to thank Waters Corporation for their technical expertise and continuous support.

### Conflicts of Interest

F.M. was paid for an advisory board by Sanofi-Genzyme. A.A. and G.-E.R. declare that they have no conflict of interest. I.M. received a student stipend from Shire/Takeda Pharmaceutical for this project. M.B. received a salary. C.A.-B. received research grants and honoraria from Shire/Takeda Pharmaceutical.

### References

1. Smith, L.; Mullin, S.; Schapira, A. Insights into the structural biology of Gaucher disease. *Exp. Neurol.* **2017**, *298 Pt B*, 180–190, doi:10.1016/j.expneurol.2017.09.010.
2. Aerts, J.M.; Kuo, C.L.; Lelieveld, L.T.; Boer, D.E.; Lienden, M.J.V.D.; Overkleeft, H.S.; Artola, M. Glycosphingolipids and lysosomal storage disorders as illustrated by Gaucher disease. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2019**, *53*, 204–215, doi:10.1016/j.cbpa.2019.10.006.
3. Andrade-Campos, M.; Alfonso, P.; Irun, P.; Armstrong, J.; Calvo, C.; Dalmau, J.; Domingo, M.R.; Barbera, J.L.; Cano, H.; Fernandez-Galán, M.A.; et al. Diagnosis features of pediatric Gaucher disease patients in the era of enzymatic therapy, a national-base study from the Spanish Registry of Gaucher disease. *Orphanet. J. Rare Dis.* **2017**, *12*, doi:10.1186/s13023-017-0627-z.
4. Zeid, N.; Stauffer, C.; Yang, A.; Naik, H.; Fierro, L.; Ganesh, J.; Balwani, M. The N370S/R496H genotype in type 1 Gaucher disease—Natural history and implications for pre-symptomatic diagnosis and counseling. *Mol. Genet. Metab. Rep.* **2020**, *22*, 100567, doi:10.1016/j.ymgmr.2020.100567.
5. Stirnemann, J.; Belmatoug, N.; Camou, F.; Serratrice, C.; Froissart, R.; Caillaud, C.; Levade, T.; Astudillo, L.; Serratrice, J.; Brassier, A.; et al. Review of Gaucher disease pathophysiology, clinical presentation and treatments. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 441, doi:10.3390/ijms18020441.
6. Fraga, C.; Medeiros, S.; Serpa, S.; Silva, D. Case Series Synopsis: Gaucher disease type 1 patients treated with eliglustat over 6 years. *Int. J. Rare Dis. Disord.* **2020**, *3*, doi:10.23937/2643-4571/1710014.

7. Mistry, P.K.; Lopez, G.; Schiffmann, R.; Barton, N.W.; Weinreb, N.J.; Sidransky, E. Gaucher disease: Progress and ongoing challenges. *Mol. Genet. Metab.* **2017**, *120*, 8–21, doi:10.1016/j.ymgme.2016.11.006.
8. Dandana, A.; Khelifa, S.B.; Chahed, H.; Miled, A.; Ferchichi, S. Gaucher disease: Clinical, biological and therapeutic aspects. *Pathobiology* **2015**, *83*, 13–23, doi:10.1159/000440865.
9. Lal, T.R.; Sidransky, E. The spectrum of neurological manifestations associated with Gaucher disease. *Diseases* **2017**, *5*, 10, doi:10.3390/diseases5010010.
10. Schiffmann, R.; Sevigny, J.; Rolfs, A.; Davies, E.H.; Goker-Alpan, O.; Abdelwahab, M.; Vellodi, A.; Mengel, E.; Lukina, E.; Yoo, H.W.; et al. The definition of neuronopathic Gaucher disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2020**, 1–4, doi:10.1002/jimd.12235.
11. Van Rossum, A.; Holsopple, M. Enzyme replacement or substrate reduction? A Review of Gaucher disease treatment options. *Hosp. Pharm.* **2016**, *51*, 553–563, doi:10.1310/hpj5107-553.
12. Gary, S.E.; Ryan, E.; Steward, A.M.; Sidransky, E. Recent advances in the diagnosis and management of Gaucher disease. *Expert Rev. Endocrinol. Metab.* **2018**, *13*, 107–118, doi:10.1080/17446651.2018.1445524.
13. Giraldo, P.; Frutos, L.L.D.; Cebolla, J.J. Biomarker combination is necessary for the assessment of Gaucher disease? *Ann. Transl. Med.* **2018**, *6*, doi:10.21037/atm.2018.10.69.
14. Raskovalova, T.; Deegan, P.B.; Yang, R.; Pavlova, E.; Stirnemann, J.; Labarère, J.; Zimran, A.; Mistry, P.; Berger, M. Plasma chitotriosidase activity versus CCL18 level for assessing type I Gaucher disease severity: Protocol for a systematic review with meta-analysis of individual participant data. *Syst. Rev.* **2017**, *6*, doi:10.1186/s13643-017-0483-x.
15. Bernstein, K.E.; Khan, Z.; Giani, J.F.; Cao, D.Y.; Bernstein, E.A.; Shen, X.Z. Angiotensin-converting enzyme in innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Nephrol.* **2018**, *14*, 325–336, doi:10.1038/nrneph.2018.15.
16. van Dussen, L.; Lips, P.; Everts, V.E.; Bravenboer, N.; Jansen, I.D.; Groener, J.E.; Maas, M.; Blokland, J.A.; Aerts, J.M.; Hollak, C.E. Markers of bone turnover in Gaucher

- disease: Modeling the evolution of bone disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *96*, 2194–2205, doi:10.1210/jc.2011-0162.
17. Murugesan, V.; Chuang, W.L.; Liu, J.; Lischuk, A.; Kacena, K.; Lin, H.; Pastores, G.M.; Yang, R.; Keutzer, J.; Zhang, K.; et al. Glucosylsphingosine is a key biomarker of Gaucher disease. *Am. J. Hematol.* **2016**, *91*, 1082–1089, doi:10.1002/ajh.24491.
  18. Ferraz, M.J.; Marques, A.R.; Appelman, M.D.; Verhoek, M.; Strijland, A.; Mirzaian, M.; Scheij, S.; Ouairy, C.M.; Lahav, D.; Wisse, P.; et al. Lysosomal glycosphingolipid catabolism by acid ceramidase: Formation of glycosphingoid bases during deficiency of glycosidases. *FEBS Lett.* **2016**, *590*, 716–725, doi:10.1002/1873-3468.12104.
  19. Rolfs, A.; Giese, A.K.; Grittner, U.; Mascher, D.; Elstein, D.; Zimran, A.; Böttcher, T.; Lukas, J.; Hübner, R.; Gölnitz, U.; et al. Glucosylsphingosine is a highly sensitive and specific biomarker for primary diagnostic and follow-up monitoring in Gaucher disease in a non-Jewish, Caucasian cohort of Gaucher disease patients. *PLoS ONE* 2013, *8*, e79732, doi:10.1371/journal.pone.0079732.
  20. Dekker, N.; van Dussen, L.; Hollak, C.E.; Overkleeft, H.; Scheij, S.; Ghauharali, K.; van Breemen, M.J.; Ferraz, M.J.; Groener, J.E.; Maas, M.; et al. Elevated plasma glucosylsphingosine in Gaucher disease: Relation to phenotype, storage cell markers, and therapeutic response. *Blood* 2011, *118*, e118–e127, doi:10.1182/blood-2011-05-352971.
  21. Arkadir, D.; Dinur, T.; Revel-Vilk, S.; Becker Cohen, M.; Cozma, C.; Hovakimyan, M.; Eichler, S.; Rolfs, A.; Zimran, A. Glucosylsphingosine is a reliable response biomarker in Gaucher disease. *Am. J. Hematol.* 2018, *93*, E140–E142, doi:10.1002/ajh.25074.
  22. Mucci, J.M.; Rozenfeld, P. Pathogenesis of bone alterations in Gaucher disease: The role of immune System. *J. Immunol. Res.* **2015**, *2015*, 192761, doi:10.1155/2015/192761.
  23. Irún, P.; Cebolla, J.J.; López de Frutos, L.; De Castro-Orós, I.; Roca-Espiau, M.; Giraldo, P. LC-MS/MS analysis of plasma glucosylsphingosine as a biomarker for diagnosis and follow-up monitoring in Gaucher disease in the Spanish population. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2020**, *58*, 798–809, doi:10.1515/cclm-2019-0949.
  24. Cozma, C.; Cullufi, P.; Kramp, G.; Hovakimyan, M.; Velmishi, V.; Gjipopulli, A.; Tomori, S.; Fischer, S.; Oppermann, S.; Grittner, U.; et al. Treatment efficiency in Gaucher patients can reliably be monitored by quantification of Lyso-Gb1

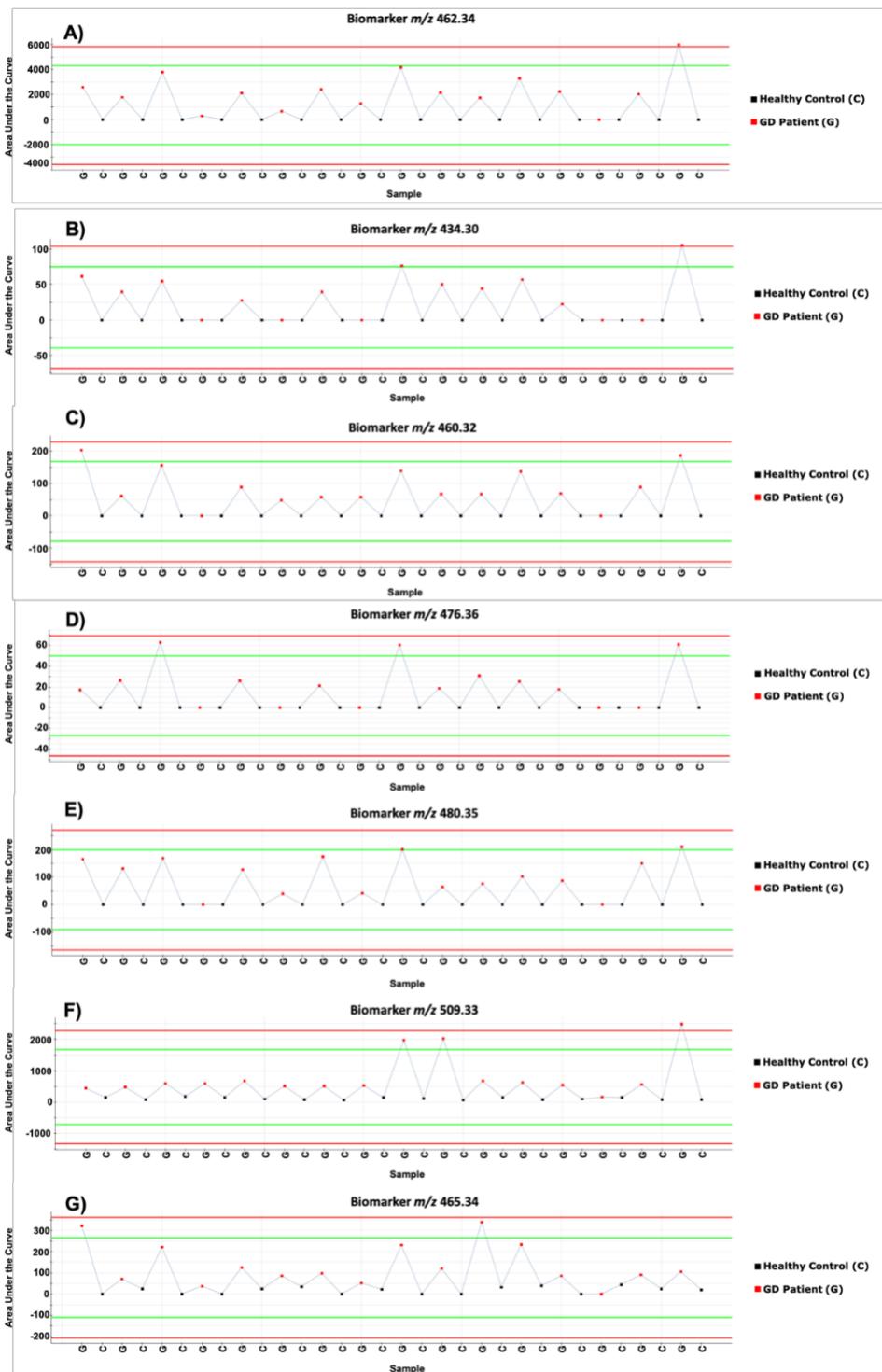


- concentrations in dried blood spots. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4577, doi:10.3390/ijms21134577.
25. Dinur, T.; Zimran, A.; Becker-Cohen, M.; Arkadir, D.; Cozma, C.; Hovakimyan, M.; Oppermann, S.; Demuth, L.; Rolfs, A.; Revel-Vilk, S. Long term follow-up of 103 untreated adult patients with type 1 Gaucher disease. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 1662, doi:10.3390/jcm8101662.
26. Lavoie, P.; Boutin, M.; Auray-Blais, C. Multiplex analysis of novel urinary lyso-Gb<sub>3</sub>-related biomarkers for Fabry disease by tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* **2013**, *85*, 1743–1752, doi:10.1021/ac303033v.
27. Boutin, M.; Auray-Blais, C. Multiplex tandem mass spectrometry analysis of novel plasma lyso-Gb<sub>3</sub>-related analogues in Fabry disease. *Anal Chem.* **2014**, *86*, 3476–3483, doi:10.1021/ac404000d.
28. Boutin, M.; Auray-Blais, C. Metabolomic Discovery of novel urinary galabiosylceramide analogs as Fabry disease biomarkers. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2015**, *26*, 499–510, doi:10.1007/s13361-014-1060-3.
29. Auray-Blais, C.; Boutin, M.; Gagnon, R.; Dupont, F.O.; Lavoie, P.; Clarke, J.T. Urinary globotriaosylsphingosine-related biomarkers for Fabry disease targeted by metabolomics. *Anal Chem.* **2012**, *84*, 2745–2753, doi:10.1021/ac203433e.
30. Mirzaian, M.; Wisse, P.; Ferraz, M.J.; Gold, H.; Donker-Koopman, W.E.; Verhoek, M.; Overkleeft, H.S.; Boot, R.G.; Kramer, G.; Dekker, N.; et al. Mass spectrometric quantification of glucosylsphingosine in plasma and urine of type 1 Gaucher patients using an isotope standard. *Blood Cells Mol. Dis.* **2015**, *54*, 307–314, doi:10.1016/j.bcmd.2015.01.006.
31. O’Sullivan, C.; Dev, K.K. Galactosylsphingosine (psychosine)-induced demyelination is attenuated by sphingosine 1-phosphate signalling. *J. Cell Sci.* **2015**, *128*, 3878–3887, doi:10.1242/jcs.169342.
32. Herbst, Z.; Turgeon, C.T.; Biski, C.; Khaledi, H.; Shoemaker, N.B.; Dearmond, P.D.; Smith, S.; Orsini, J.; Matern, D.; Gelb, M.H. Achieving congruence among reference laboratories for absolute abundance measurement of analytes for rare diseases: Psychosine for diagnosis and prognosis of Krabbe disease. *Int. J. Neonatal. Screen* **2020**, *6*, 29, doi:10.3390/ijns6020029.

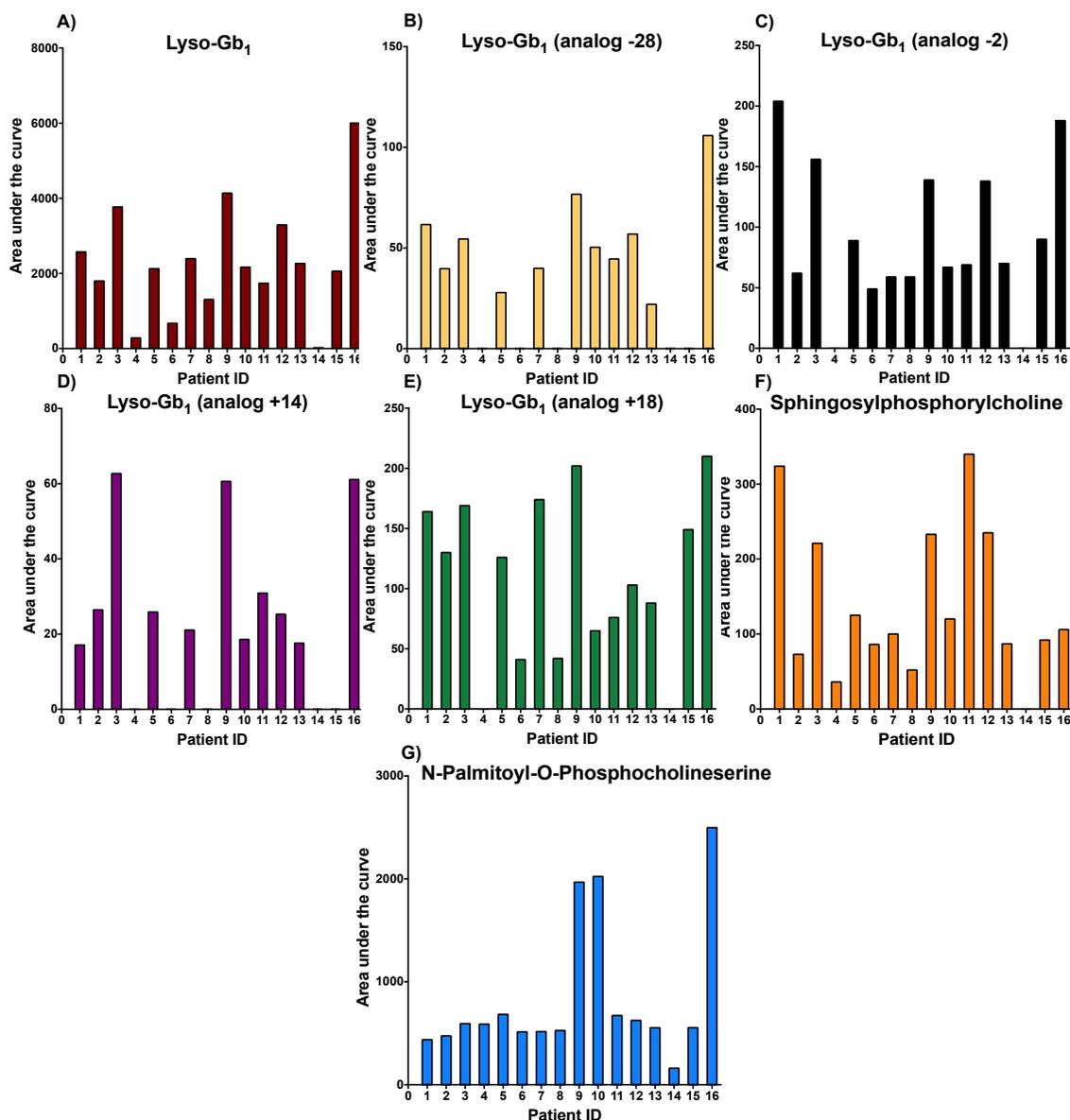
33. Boutin, M.; Sun, Y.; Shacka, J.J.; Auray-Blais, C. Tandem mass spectrometry multiplex analysis of glucosylceramide and galactosylceramide isoforms in brain tissues at different stages of Parkinson disease. *Anal Chem.* **2016**, *88*, 1856–1863, doi:10.1021/acs.analchem.7b03609.
34. Sidhu, R.; Mondjinou, Y.; Qian, M.; Song, H.; Kumar, A.B.; Hong, X.; Hsu, F.F.; Dietzen, D.J.; Yanjanin, N.M.; Porter, F.D.; et al. N-acyl-O-phosphocholineserines: Structures of a novel class of lipids that are biomarkers for Niemann-Pick C1 disease. *J. Lipid Res.* **2019**, *60*, 1410–1424, doi:10.1194/jlr.RA119000157.
35. Sidhu, R.; Kell, P.; Dietzen, D.J.; Farhat, N.Y.; Do, A.; Porter, F.D.; Berry-Kravis, E.; Vite, C.H.; Reunert, J.; Marquardt, T.; et al. Application of N-palmitoyl-O-phosphocholineserine for diagnosis and assessment of response to treatment in Niemann-Pick type C disease. *Mol. Genet. Metab.* **2020**, *129*, 292–302, doi:10.1016/j.ymgme.2020.01.007.
36. Thomas, G.D.; Snetkov, V.A.; Patel, R.; Leach, R.M.; Aaronson, P.I.; Ward, J.P. Sphingosylphosphorylcholine-induced vasoconstriction of pulmonary artery: Activation of non-store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Cardiovasc. Res.* **2005**, *68*, 56–64, doi:10.1016/j.cardiores.2005.05.013.
37. Ługowska, A.; Hetmańczyk-Sawicka, K.; Iwanicka-Nowicka, R.; Fogtman, A.; Cieśla, J.; Purzycka-Olewiecka, J.K.; Sitarska, D.; Płoski, R.; Filocamo, M.; Lualdi, S.; et al. Gene expression profile in patients with Gaucher disease indicates activation of inflammatory processes. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 6060, doi:10.1038/s41598-019-42584-1.
38. Deodato, F.; Boenzi, S.; Taurisano, R.; Semeraro, M.; Sacchetti, E.; Carrozzo, R.; Dionisi-Vici, C. The impact of biomarkers analysis in the diagnosis of Niemann-Pick C disease and acid sphingomyelinase deficiency. *Clin. Chim. Acta* **2018**, *486*, 387–394, doi:10.1016/j.cca.2018.08.039.
39. Zhang, K.; Chuang, W.-L.; Pacheco, J.; Cooper, S.; McGovern, M.; Cox, G.; Keutzer, J. Lyso-sphingomyelin is elevated in dried blood spots of Niemann-Pick disease type B patients. *Mol. Genet. Metab.* **2014**, *111*, 209–211, doi:10.1016/j.ymgme.2013.11.012.
40. Saville, J.T.; McDermott, B.K.; Chin, S.J.; Fletcher, J.M.; Fuller, M. Expanding the clinical utility of glucosylsphingosine for Gaucher disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2020**, *43*, 558–563, doi:10.1002/jimd.12192.

41. Hurvitz, L.; Dinur, T.; Becker-Cohen, M.; Cozma, C.; Hovakimyan, M.; Oppermann, S.; Demuth, L.; Rolfs, A.; Abramov, A.; Zimran, A.; et al. Glucosylsphingosine (lyso-Gb<sub>1</sub>) as a Biomarker for Monitoring Treated and Untreated Children with Gaucher Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3033, doi:10.3390/ijms20123033.
42. Giese, A.K.; Mascher, H.; Grittner, U.; Eichler, S.; Kramp, G.; Lukas, J.; te Vruchte, D.; Al Eisa, N.; Cortina-Borja, M.; Porter, F.D.; et al. A novel, highly sensitive and specific biomarker for Niemann-Pick type C1 disease. *Orphanet. J. Rare Dis.* **2015**, *10*, 78, doi:10.1186/s13023-015-0274-1.
43. Auray-Blais, C.; Lavoie, P.; Boutin, M.; Ntwari, A.; Hsu, T.; Huang, C.; Niu, D. Biomarkers associated with clinical manifestations in Fabry disease patients with a late-onset cardiac variant mutation. *Clin. Chim. Acta* **2017**, *466*, 185–193, doi:10.1016/j.cca.2017.01.018.
44. van den Berg, R.A.; Hoefsloot, H.C.; Westerhuis, J.A.; Smilde, A.K.; van der Werf, M.J. Centering, scaling, and transformations: Improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genom.* **2006**, *7*, 142, doi:10.1186/1471-2164-7-142.

## Appendix A



**Figure A1:** Trend plot charts for lyso-Gb<sub>1</sub> (A), lyso-Gb<sub>1</sub> analogs – 28 Da (B), –2 Da (C), + 14 Da (D), +18 Da (E), N-palmitoyl-O-phosphocholineserine (F), and sphingosylphosphorylcholine (G). G = Gaucher patient, C = healthy control.



**Figure A2.** Areas under the curve are shown for lyso-Gb<sub>1</sub> (A), lyso-Gb<sub>1</sub> analog +18 Da (B), lyso-Gb<sub>1</sub> analog –2 Da (C), lyso-Gb<sub>1</sub> analog –28 Da (D), lyso-Gb<sub>1</sub> analog +14 Da (E), sphingosylphosphorylcholine (F), and N-palmitoyl-O-phosphocholineserine (G).

## 22 ARTICLE 2

### **Quantitation of a Plasma Biomarker Profile for the Early Detection of Gaucher Disease Type 1 Patients**

**Auteurs de l'article:** Iskren Menkovic, Michel Boutin, Abdulfatah Alayoubi, Filipa Curado, Peter Bauer, François E. Mercier, Georges-Étienne Rivard, Christiane Auray-Blais

**Statut de l'article:** Publié le 4 février 2022 dans *Bioanalysis* 21(21), 7869.

**Avant-propos:** Iskren Menkovic a fait la préparation des échantillons, le développement et la validation de la méthode, de même que de l'analyse des différents échantillons. Il a également rédigé le manuscrit présenté ci-dessous. Tout le travail réalisé par Iskren a été sous les conseils, les recommandations et la supervision des professeurs Michel Boutin et Christiane Auray-Blais.

**Mise en contexte :** Les travaux présentés dans l'Article 2 découlent directement des résultats de l'étude métabolomique présentée dans l'Article 1. Plus précisément, une méthode quantitative sensible, fiable et robuste a été développée puis validée pour étudier la distribution des biomarqueurs identifiés lors de l'étude métabolomique présentée dans l'Article 1. L'usage d'un spectromètre de masse différent et d'une méthode chromatographique différente permet d'augmenter les limites de détection et de quantification des différents analytes tout en diminuant significativement la durée des analyses. Ultiment, l'objectif de cet article était de produire des résultats préliminaires pour étudier les corrélations entre les nouveaux biomarqueurs identifiés dans le cadre de l'étude métabolomique dans le plasma (Article 1) et les manifestations cliniques observées chez les patients.

**Résumé:** La maladie de Gaucher est une maladie autosomique récessive causée par un défaut au niveau de l'enzyme lysosomale  $\beta$ -glucocérébrosidase. Ce déficit enzymatique entraîne l'accumulation de glycolipides au niveau des tissus occasionnant des

manifestations cliniques chez les patients. Dans les laboratoires cliniques, l'un des biomarqueurs pouvant être utilisés pour le pronostic ainsi que pour le suivi des patients est le lyso-Gb<sub>1</sub> plasmatique. Toutefois, les études métabolomiques récentes ont révélé la présence d'autres biomarqueurs associés à la maladie, soit des analogues du lyso-Gb<sub>1</sub> ainsi que deux phosphocholines. Cependant, relativement peu d'information était disponible quant à la signification clinique de ces nouvelles molécules. L'objectif principal de cette étude était de développer et de valider une méthode d'analyse quantitative du lyso-Gb<sub>1</sub> ainsi que des analogues -28, -12, -2, +14, +16 et +18 Da, de même que du sphingosylsphosphorylcholine et du N-palmitoyl-O-Phosphocholine sérine dans le plasma. Une fois la méthode développée, des échantillons de patients Gaucher ont été analysés dans le but d'établir des corrélations entre la présence/abondance des différents biomarqueurs et les manifestations cliniques présentes chez les patients. Nos résultats démontrent une corrélation significative entre les atteintes viscérales et le lyso-Gb<sub>1</sub> de même que les analogues -28, -12, -2 +14 et +18 Da. Au niveau des manifestations hématologiques, des corrélations significatives ont été observées entre le lyso-Gb<sub>1</sub> et les analogues -2, +14 et +18 Da. Par ailleurs, aucune corrélation significative n'a été observée avec les manifestations osseuses. De plus, au niveau des patients traités, une diminution rapide de la concentration de la plupart des biomarqueurs fut observée lors du suivi clinique de 3 mois après le traitement par thérapie enzymatique de remplacement. Cette diminution s'est poursuivie 15 mois après le début des traitements.

## Quantitation of a Plasma Biomarker Profile for the Early Detection of Gaucher Disease Type 1 Patients

Iskren Menkovic<sup>1</sup>, Michel Boutin<sup>1</sup>, Abdulfatah Alayoubi<sup>2,3</sup>, Filipa Curado<sup>4</sup>, Peter Bauer<sup>4</sup>, François E. Mercier<sup>2</sup>, Georges-Étienne Rivard<sup>5</sup>, and Christiane Auray-Blais<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Medical Genetics, Department of Pediatrics, Centre de Recherche-CHUS, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, CIUSSS de l'Estrie-CHUS, 3001, 12th Avenue North, Sherbrooke, QC J1H 5N4, Canada;

<sup>2</sup>Divisions of Experimental Medicine and Hematology, Department of Medicine, Faculty of Medicine, McGill University, Lady Davis Institute for Medical Research, Jewish General Hospital, 3755, Côte Sainte-Catherine, Montreal, QC H3T 1E2, Canada;

<sup>3</sup>Department of Biochemistry and Molecular Medicine, College of Medicine, Taibah University, University Road, Madinah 42353, Saudi Arabia;

<sup>4</sup>CENTOGENE GmbH, 18055 Rostock, Germany.

<sup>5</sup>Division of Hemato-Oncology, Department of Pediatrics, Université de Montréal, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, 3175, Côte Sainte-Catherine, Montreal, QC H3T 1C5, Canada;

### Abstract

**Aim:** Gaucher Disease (GD) is caused by a deficiency of the lysosomal enzyme acid beta-glucocerebrosidase. Recent metabolomic studies highlighted several new metabolites increased in the plasma of GD patients. We aimed to develop and validate a UPLC-MS/MS method allowing a relative quantitation of lyso-Gb<sub>1</sub> and lyso-Gb<sub>1</sub> analogs -28, -12, -2, +14, +16, and +18 Da in addition to sphingosylphosphorylcholine, N-palmitoyl-O-phosphocholine to study potential correlations with clinical manifestations. **Results/methodology:** Following solid-phase extraction, plasma samples were evaporated and resuspended in 100 µl of resuspension solution. Three µl are injected into the UPLC-MS/MS for analysis. **Conclusions:** All biomarkers studied were increased in GD patients. Significant correlations were observed between specific analogs and hematological, and visceral complications, as well as overall disease severity.



Keywords: Gaucher Disease, Biomarker, Glucosylsphingosine, Lyso-Gb<sub>1</sub>, Lyso-Gb<sub>1</sub> Analogs, N-Palmitoyl-O-Phosphocholine Serine, Sphingosylphosphorylcholine, Tandem Mass Spectrometry, Plasma

## Introduction

Gaucher disease (GD; OMIM 230800) is a rare inherited lysosomal storage disorder due to biallelic mutations in the *GBA* (1q22.1) gene which encodes for the enzyme acid beta-glucocerebrosidase (GCase; EC 3.2.1.45) [1]. Enzymatic deficiencies in GCase result in the accumulation of sphingolipids such as glucosylceramide and glucosylsphingosine into reticuloendothelial cells, and more specifically into macrophages. These cells infiltrate numerous tissues such as the spleen, liver, bone marrow, and sometimes the lungs which ultimately lead to multisystemic manifestations of the disease [2,3].

From a clinical standpoint, GD can be separated into 3 different types based on the presence, absence, and severity of neurological impairments. More specifically, in GD type 1, which represents approximately 95% of all GD cases, neurological impairments are either non-existent or mild. GD type 3 is a chronic neuronopathic form of the disease with neurological impairments generally appearing in childhood [4]. On the other hand, GD type 2 represents the acute infantile neuronopathic form, with an onset occurring in the first few months of life and death within the first year or two of life [4]. While there is no cure for GD yet, there are treatments like enzyme replacement therapy (ERT) and oral substrate reduction therapy (SRT) which can significantly improve the patient's condition and quality of life [5-9]. Moreover, past studies have demonstrated the importance and numerous benefits of an early intervention with GD patients requiring treatment [10,11]. Nevertheless, patients may still experience significant diagnostic delays, and some may even be misdiagnosed [12]. Experts have expressed that this can be related to the fact that GD is a rare disease with a wide variability in age of onset, severity, as well as the type of clinical manifestations observed [13]. While biomarkers such as C-C motif chemokine ligand (CCL18/PARC), angiotensin-converting enzyme (ACE), tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRAP5b), and C-terminal telopeptide of type 1 collagen (CTx) can assist physicians with GD monitoring, they are not systematically tested [13-17]. Moreover, the

aforementioned biomarkers are not necessarily the ideal tools used for the diagnosis of GD patients as they lack sensitivity, specificity, and/or can be subject to variability in the general population [15].

In 2011, Dekker *et al.*, investigated glucosylsphingosine (lyso-Gb<sub>1</sub>) as a potential GD biomarker [18]. Studies that followed revealed that lyso-Gb<sub>1</sub> is indeed a GD biomarker with higher sensitivity and specificity than previously used biomarkers. Furthermore, lyso-Gb<sub>1</sub> levels in plasma appear to correlate with the severity of the disease [18,19]. These findings subsequently led to more studies on the identification of new potential GD biomarkers. Indeed, Mirzaian *et al.*, in 2015 [20], identified 5 molecules related to lyso-Gb<sub>1</sub> known as lyso-Gb<sub>1</sub> analogs with different modifications on the sphingosine moiety. These compounds were identified using extrapolations from results obtained with metabolomic studies done using Fabry disease patient's urine and plasma samples performed in our laboratory [20]. The identified compounds were later confirmed to be lyso-Gb<sub>1</sub> analogs using enzymatic tests [20]. More recently, our group performed a semi-targeted metabolomic study using a time-of-flight mass spectrometry approach in GD patient's plasma to identify potential GD type 1 biomarkers. This study highlighted 7 potential GD biomarkers, namely lyso-Gb<sub>1</sub> and 4 related analogs (-28, -2, +14, and +18 Da), sphingosylphosphorylcholine (SPC), and N-palmitoyl-O-phosphocholineserine (NPOPCS) [21]. These latter results suggest that a panel of biomarkers should be considered for the early detection of GD. Moreover, these results also suggest that some analogs of lyso-Gb<sub>1</sub> might potentially be correlated to disease severity. Therefore, the objectives of the current study were: 1) to develop and validate a robust method for the relative quantitation of lyso-Gb<sub>1</sub> and all related analogs previously identified by us [21] and others [20] (lyso-Gb<sub>1</sub> analogs -28, -12, -2, +14, +16, and +18 Da), SPC, and NPOPCS using a tandem mass spectrometry approach; 2) to investigate the correlations between these potential GD biomarker levels and clinical manifestations, disease severity, and response to treatment.

## Materials and methods

### Reagents

Glucosylsphingosine (lyso-Gb<sub>1</sub>), <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-glucosylsphingosine (lyso-Gb<sub>1</sub>-(<sup>13</sup>C<sub>6</sub>)), sphingosylphosphorylcholine (SPC), and deuterated sphingosylphosphorylcholine (SPC-(D<sub>9</sub>)) were purchased from Matreya (Pleasant Gap, PA, USA). HPLC grade acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH) were obtained from EMD Chemicals Inc. (Darmstadt, Germany) while Optima LC/MS grade water, American Clinical Society (ACS) grade ammonium formate (Amm. Form.), o-phosphoric acid (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 85%), and ammonium hydroxide (NH<sub>4</sub>OH; 28%–30% purity) were obtained from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA), and formic acid (FA; >99%) was from Acros Organics (Morris Plain, NJ, USA). Dimethyl sulfoxide (DMSO) and fatty acid-free bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma Aldrich (St-Louis, MO, USA). Finally, phosphate buffer saline (PBS) was obtained from Wisent Bioproduct (Montreal, QC, CAN).

### Ethics Approval

This research project was approved by the Research Ethics Board (REB) of the Faculty of Medicine and Health Sciences of the Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke (CHUS) under the project ID MP-31-2017-1414. Collaborating centers REB also approved the project for their respective centers. Moreover, patients recruited from Centogene were part of the Lyso-Prove project, approved by the Universität Rostock REB under project ID A 2015-0025. Informed consent from all patients and healthy controls were obtained.

### Study Population

Plasma samples from treated and untreated Gaucher disease type 1 patients, as well as controls, were obtained from clinical centers from Canada, Albania, Germany, Greece, and Israel. All samples were kept at -30°C until analysis. The diagnosis for each GD patient was confirmed by demonstrating marked enzyme deficiency of β-glucosidase in peripheral blood leukocytes and sequencing of the *GBA* gene. Samples from untreated male and female GD patients were used to investigate potential correlations between the different biomarkers and specific clinical manifestations, while treated patient samples were used as

part of a longitudinal study to evaluate the biomarker level variability following ERT treatment. Healthy controls did not have any LSDs or other comorbidities.

### **Calibration Curve and Quality Control Samples Working Solution Preparation**

The lyso-Gb<sub>1</sub> stock solution was used to prepare the 11 calibration curve points with concentrations of 0, 0.1, 1, 5, 20, 80, 250, 400, 600, 800, and 1 000 nM in 95:5 MeOH: DMSO, as well as a low, medium, and high-quality controls (QC) samples with concentrations of 30, 250, and 500 nM also prepared in 95:5 MeOH: DMSO, respectively. This calibration curve was also used to quantify all lyso-Gb<sub>1</sub> analogs.

Similarly, SPC stock solutions were used to prepare the 11 calibration curve points with concentrations of 0, 0.2, 2, 10, 40, 100, 160, 250, 320, 640, and 1 200 nM prepared in 95:5 MeOH: DMSO as well as a low, medium, and high-quality control (QC) samples with concentrations of 60, 500, and 750 nM also prepared in 95:5 MeOH: DMSO, respectively. Calibration curve point solutions were sonicated for 1 min and vortexed 30 sec twice before use to achieve a uniform solution and accurate concentrations. This calibration curve was also used to quantify NPOPCS.

### **Internal Standard Stock Solution Preparation**

An internal standard working stock solution at 10 nM of lyso-Gb<sub>1</sub>-(<sup>13</sup>C<sub>6</sub>) and SPC-(D<sub>9</sub>) was prepared in MeOH. This working solution was used for the sample preparation.

### **Surrogate Matrix Preparation**

Since lyso-Gb<sub>1</sub> and SPC are both found endogenously in plasma from healthy controls, a proxy matrix was used to simulate plasma for the calibration curve point samples [22]. Briefly, the surrogate matrix was obtained by dissolving 75 mg of fatty-acid-free BSA in 10 ml of PBS.

### **Sample Preparation**

Plasma samples (or surrogate matrix) were vortexed for 10 seconds and 200 µl was transferred into a 2 ml Eppendorf plastic tube. For calibration point samples, 20 µl of the calibration curve point solution were added to the surrogate matrix mix while 20 µl of MeOH were added to plasma samples. Five hundred µl of an H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2% solution prepared

in water, and 500  $\mu\text{l}$  of a MeOH solution containing 10 mM SPC-(D<sub>9</sub>), and 10 mM lyso-Gb<sub>1</sub>-(<sup>13</sup>C<sub>6</sub>) were added to each sample. Samples were then vortexed and transferred to mixed-mode cation-exchange cartridges (Oasis MCX, 30 mg, 60  $\mu\text{m}$ , Waters Corp., Milford, MA, USA) previously conditioned with 1 200  $\mu\text{l}$  of MeOH and 1 200  $\mu\text{l}$  of 2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> solution prepared in water. MCX cartridges were first washed with 1 200  $\mu\text{l}$  of a 2% formic acid solution prepared in H<sub>2</sub>O, followed by a second wash using 1 200  $\mu\text{l}$  of 0.2% FA solution prepared in MeOH. Finally, adsorbed compounds were eluted from the MCX cartridge into 13x100 mm glass tubes using 600  $\mu\text{l}$  of 2% ammonium hydroxide solution prepared in MeOH. Samples were evaporated to dryness under a stream of nitrogen and resuspended in 100  $\mu\text{l}$  of the resuspension solution (94.5:2.5:2.5:0.5 ACN: MeOH: H<sub>2</sub>O: FA + 5 mM Amm. Form.). Finally, samples were transferred into glass inserts fitted into 2 ml glass vials for the UPLC-MS/MS analysis.

### **Instrumentation and Parameters**

The quantitation of lyso-Gb<sub>1</sub> and 6 related analogs, as well as SPC and NPOPCS, was done by a multiplex method using a Xevo TQ-S tandem mass spectrometer (MS/MS) coupled to an Acquity I-Class UPLC system (Waters Corp.). The UPLC-MS/MS parameters are indicated in Table 1.

**Table 1.** Ultra-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS) Method Parameters

Parameters	Description			
<b>Chromatographic Parameters</b>				
HPLC Column	Halo HILIC 2.7 Advanced Materials Technology (Wilmington, DE, USA)			
Column Dimension	4.6 x 150 mm			
Particle Size	2.7 $\mu\text{m}$			
Column Temperature	60°C			
Weak Wash Solvent	ACN			
Strong Wash Solvent	ACN			
Injection Mode	Partial Loop Injection			
Injection Volume	10 $\mu\text{l}$			
Mobile Phase A	94.5:2.5:2.5:0.5 ACN: MeOH: H <sub>2</sub> O: FA + 5 mM Amm. Form.			
Mobile Phase B	10:89.5:0.5 ACN: H <sub>2</sub> O: FA + 5 mM Amm. Form.			
Flow rate	0.85 ml/min			
Gradient (% Mobile Phase B)	0.0 to 1.0 min: 15%			
	1.0 to 6.0 min: 15%			
	6.0 to 7.0 min: 60% (linear gradient from 15% to 60% B)			
	7.0 to 10.0 min: 60%			
	10.0 to 12.0 min: 15%			
<b>Mass Spectrometry Parameters</b>				
Ionization Mode	Electrospray Ionization (ESI)			
Polarity	Positive			
Acquisition Mode	Multiple Reaction Monitoring (MRM)			
Capillary Voltage	3.2 kV			
Desolvation Temperature	550°C			
Desolvation Gas Flow	750 l/h			
Cone Gas Flow	150 l/h			
Source Temperature	150°C			
<b>Analytes</b>				
Compound	Transitions ( <i>m/z</i> )	Cone (V)	Collision (V)	Dwell (s)
Lyso-Gb <sub>1</sub> -28 Da	434.31 > 254.25	38	18	0.028
Lyso-Gb <sub>1</sub> -12 Da	450.31 > 252.23	38	18	0.028
Lyso-Gb <sub>1</sub> -2 Da	460.32 > 280.26	38	18	0.028
Lyso-Gb <sub>1</sub>	462.34 > 282.29	38	18	0.028
Lyso-Gb <sub>1</sub> -( <sup>13</sup> C <sub>6</sub> )	468.32 > 282.28	38	18	0.028

Lyso-Gb <sub>1</sub> +14 Da	476.36 > 296.29	38	18	0.028
Lyso-Gb <sub>1</sub> +16 Da	478.34 > 280.31	38	18	0.028
Lyso-Gb <sub>1</sub> +18 Da	480.36 > 318.31	38	18	0.028
SPC	465.35 > 184.05	18	21	0.028
SPC-(D <sub>9</sub> )	474.40 > 193.13	18	21	0.028
NPOPCS	509.34 > 104.11	18	21	0.028

### Relative Quantitation of Gaucher Disease Biomarkers

Considering that there are no commercially available standards at this time for lyso-Gb<sub>1</sub> analogs and NPOPCS, we thus performed a relative quantitation for these molecules. The most abundant fragment was chosen for lyso-Gb<sub>1</sub> and related analogs. Lyso-Gb<sub>1</sub> analogs were quantified based on the response factor obtained with the lyso-Gb<sub>1</sub> calibration curve while NPOPCS was quantified based on the SPC calibration curve response factor. Considering the important variability in concentration levels for the different biomarkers, the relative quantitation of the different compounds was achieved using an 11-point calibration curve with an extended range of concentrations as stated previously. Moreover, a quadratic calibration curve with a weighing 1/x was used for the quantitation. Data processing was achieved with QuanLynx software (Waters).

### Method Validation

Intraday (5 replicates in a day) and interday (5 different days) precision and accuracy parameters were evaluated using 200 µl of control plasma samples spiked with lyso-Gb<sub>1</sub> and SPC standards to obtain QC samples at 3 different concentrations: low (30 nM and 60 nM), medium (250 nM and 500 nM), and high (500 nM and 750 nM) for lyso-Gb<sub>1</sub> and SPC, respectively. Bias percentages (Bias%) and relative standard deviation percentages (RSD%) were assessed by spiking control plasma with standards for each analyte and then subtracting baseline values measured in the same control plasma but not spiked. RSD was evaluated by preparing QC samples at different concentrations and monitoring the variability in measured concentrations during intra- and interday assays.

A fresh 11-point calibration curve was prepared for both lyso-Gb<sub>1</sub> and SPC for each validation day, and the correlation coefficient was monitored each time for both compounds. Sample stability for a period of 24 hours, 48 hours, 1 week, and 1 month at

-30°C, 4°C, and room temperature (22°C) was evaluated by comparing baseline values of spiked plasma samples at 3 different concentrations (low, medium, and high) with values obtained for samples stored under the aforementioned conditions. Freeze/thaw bias was evaluated by comparing measured levels of lyso-Gb<sub>1</sub> and SPC in a sample using a typically extraction procedure and samples that went through 3 freeze/thaw cycles before the extraction procedure. Finally, glassware and plastic adhesions were assessed by transferring resuspended samples 3 times into a different glass or plastic vial. More precisely, a plastic tip was used for the transfer to evaluate the plastic adhesion while a Pasteur pipette was used to evaluate the glass adhesion. The matrix effect was measured by post-column infusion. Briefly, a plasma sample is injected while standards are being infused continuously during the analysis. The stability of the matrix effect was evaluated for the elution regions of the different metabolites in comparison with the elution of the related internal standards. The recovery was evaluated in a previously published study by comparing samples spiked with the same concentrations of standards before and after the SPE extraction [21].

### **Classification of Patients Severity**

Biomarker levels were quantified in 4 different groups namely treated, untreated GD type 1 (severe form and attenuated form), as well as healthy controls. All participants were adults. The untreated GD patients were separated into 2 different groups (severe and attenuated) based on the severity of clinical manifestations. Clinical manifestations regarding bone mineral density and bleeding were not evaluated as the clinical information was not available for all patients. In case of missing clinical information, data have been normalized according to the number of clinical evaluations available. Moreover, data regarding the organomegaly was classified as mild, moderate, and severe considering that the sonography was not available for all patients.

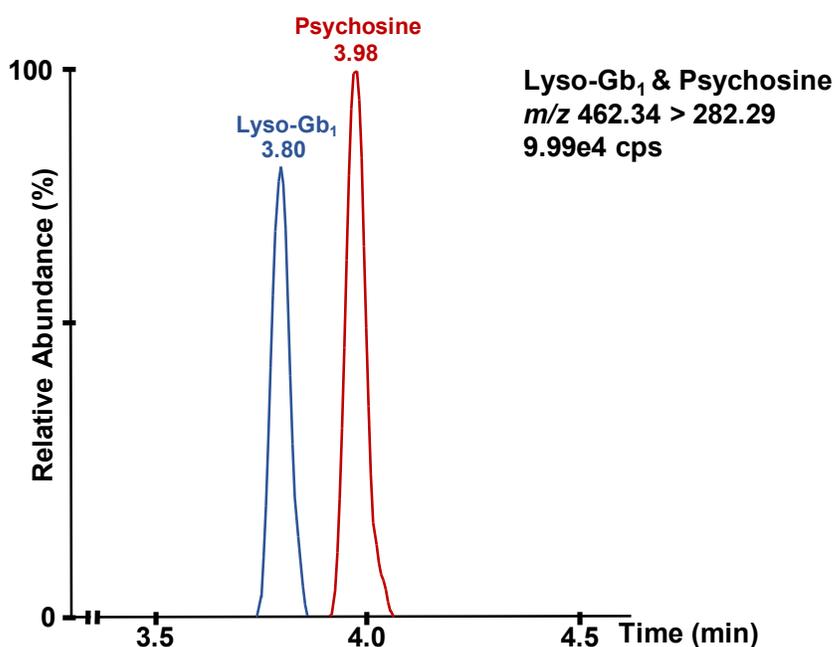
## **Results and Discussion**

### **Method Development and Validation**

Some methods described in the literature involve the quantitation of total hexosylsphingosine rather than the individual lyso-Gb<sub>1</sub> and galactosylsphingosine



(psychosine) metabolites. This implies that the proposed quantitation methods cannot separate lyso-Gb<sub>1</sub> from its structural isomer psychosine, which is a biomarker for Krabbe disease [23]. For severely affected Gaucher or Krabbe patients having important levels of lyso-Gb<sub>1</sub> or psychosine, the amount of the other structural isomer may not lead to significant changes in biomarker levels. However, when analyzing patient samples with lower biomarker levels, the presence of the other isomer may significantly affect the quantitation accuracy. To reduce the overestimation and/or misdiagnosis due to the presence of a contaminant, some have suggested the use of a 2<sup>nd</sup> tier test to confirm the nature of the analyte and accurately measure its plasma concentration [24]. On the other hand, we found that by choosing an appropriate column, such as the HPLC Halo HILIC column, we were able to separate lyso-Gb<sub>1</sub> from psychosine in 12-minute method (Figure 1) thus preventing the need of a 2<sup>nd</sup> tier test.

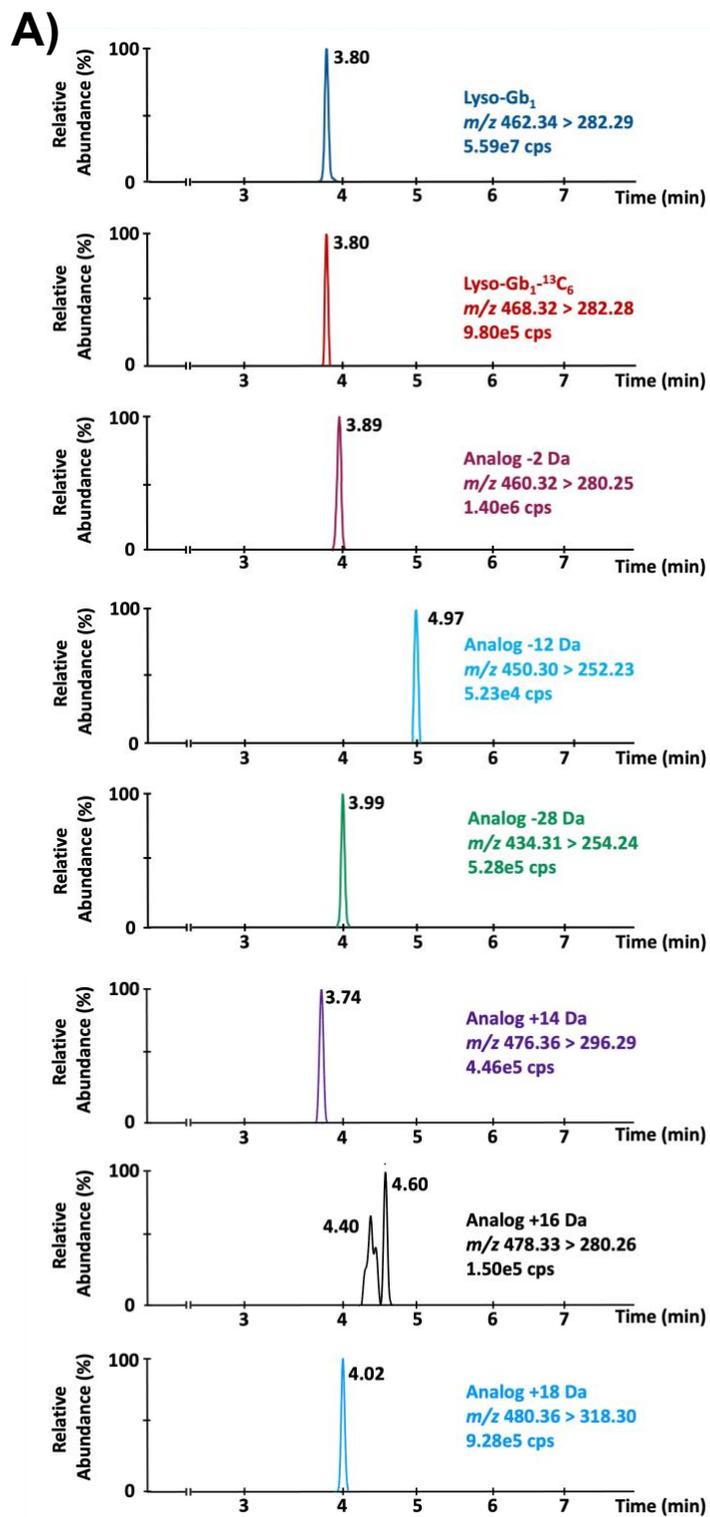


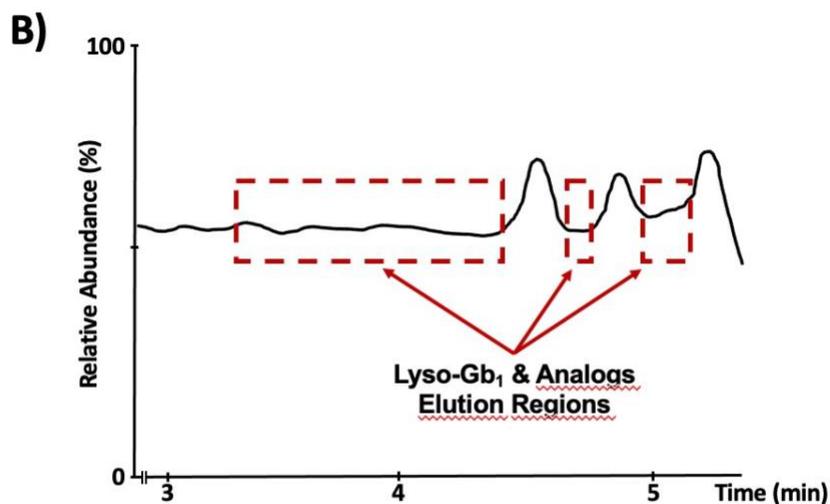
**Figure 1.** Chromatographic separation of lyso-Gb<sub>1</sub> (blue, 50 ng on-column, retention time: 3.80 min) and psychosine (red, 50 ng on-column, retention time: 3.98 min).

The separation of lyso-Gb<sub>1</sub> and psychosine is highly important for the method developed during this research project, considering that psychosine was found in the surrogate matrix used to prepare the calibration curve points. Indeed, it was observed that psychosine is present endogenously at an approximate concentration of 0.65 nM. This bias might

significantly impact the quantitation of lower concentrations of lyso-Gb<sub>1</sub> and related analogs, hence the importance of separating both compounds to achieve the highest possible accuracy. The other analytes, namely lyso-Gb<sub>1</sub> and related analogs, as well as NPOPCS and SPC were not found in the surrogate matrix.

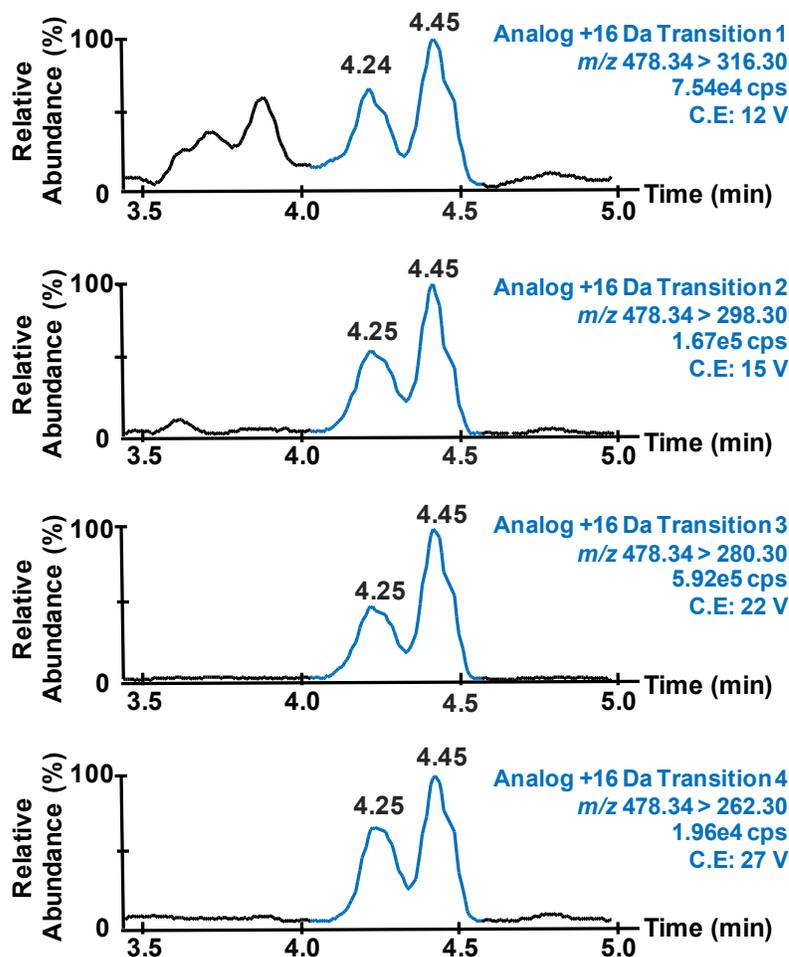
The chromatographic separation and relative retention time of lyso-Gb<sub>1</sub> and related analogs are shown in Figure 2A. As shown in Figure 2B, the proposed chromatographic method achieves a relatively stable signal for the entire region where lyso-Gb<sub>1</sub> and its related analogs elute, without any ion suppression or ion enhancement effects.





**Figure 2.** A) Ion chromatograms of lyso-Gb<sub>1</sub> and related analogs. The peaks at analog +16 Da are structural isomers; B) Ion chromatogram showing the post-column infusion of lyso-Gb<sub>1</sub>-(<sup>13</sup>C<sub>6</sub>) (1 μg/ml; 0.15 μl/min) during the injection of a plasma sample from a healthy control. No significant matrix effect was detected in the elution regions of the biomarkers analyzed.

This aspect is essential considering there are no commercially available standards or internal standards for lyso-Gb<sub>1</sub> analogs and that they are quantified based on the lyso-Gb<sub>1</sub> response factor. Indeed, a significant matrix effect on lyso-Gb<sub>1</sub> or its analogs would have led to a major overestimation or underestimation value considering that only one internal standard was used to quantify all 6 lyso-Gb<sub>1</sub> analogs. Regarding the lyso-Gb<sub>1</sub> analog +16 Da specifically, split peaks were visible in the chromatogram as shown in Figure 2A). To confirm the nature of these peaks, fragmentation tests with collision energies ranging from 12 to 27 V were performed. Our tests revealed that both peaks produced identical fragments at similar collision energies as shown in Figure 3.

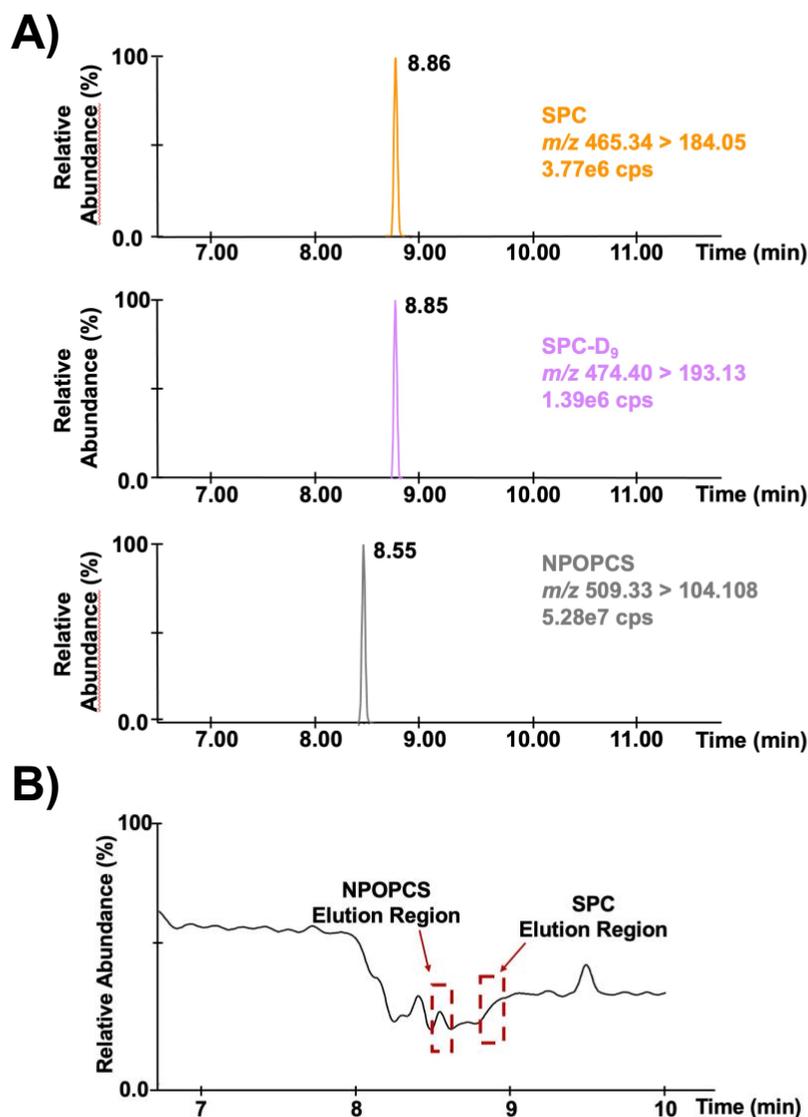


**Figure 3.** Ion chromatograms of the lyso-Gb<sub>1</sub> analog +16 Da with different transitions using collision energies ranging from 12 to 27 V. C.E represents collision energies used. Selected transitions are based on theoretical data obtained when similar compounds are fragmented using collision energy ramps from 12 to 27 V.

Moreover, when comparing healthy controls to GD patients, neither peak was found in the healthy control samples, whereas both peaks were always observed in GD patients. This led us to believe that both peaks are isomers of the lyso-Gb<sub>1</sub> analog +16 Da.

Considering that no standard or internal standard was available for NPOPCS, it was quantified using the SPC's calibration curve and internal standard. Therefore, the matrix effect needed to be similar for both molecules to achieve accurate quantitation based on the response factor (area under the curve measured for the analyte divided by the area under

the curve measured for the internal standard). Indeed, our results show a variability of 10% or less for the regions of elution of the two targeted metabolites (Figure 4).



**Figure 4.** A) Ion chromatograms of SPC and NPOPCS; B) Ion chromatogram showing the post-column infusion of SPC-(D<sub>9</sub>) (1 µg/ml; 0.15 µl/min) during the injection of a plasma sample from a healthy control.

Regarding the validation of the method, different parameters were evaluated using lyso-Gb<sub>1</sub> and SPC standards since these were the only commercially available standards for the molecules targeted at this time. Considering the chemical similarities, namely similar

ionization sites, pKa, and overall structures between lyso-Gb<sub>1</sub> and its related analogs, it is expected that these compounds will produce comparable signals under identical ionization conditions. This assumption was also made regarding NPOPCS and SPC, as we expected these molecules to have a similar behavior for the quantitation. Results for each validation parameter are shown in Table 2. Intraday and interday precision and accuracy results are shown for each QC (LQC, MQC, and HQC) in Supplementary Table 1. Data regarding the stability of both compounds are presented in Supplementary Table 2 and 3.

**Table 2.** Method validation parameters using commercially available standards of lyso-Gb<sub>1</sub> and SPC

Validation Parameter	Results	
	Lyso-Gb <sub>1</sub>	SPC
Average intraday precision (RSD*)	3.7%	3.8%
Average intraday accuracy (Bias)	6,5%	12.2%
Average interday precision (RSD*)	3.1%	3.2%
Average interday accuracy (Bias)	6.5%	9.6%
Calibration curve**	$r^2 > 0.998$	$r^2 > 0.997$
Stability*** at -30°C	Over a month	Over a month
Stability*** at 4°C	At least 48 hours	At least 48 hours
Stability*** at room temperature	At least 24 hours	At least 24 hours
Injector stability	At least 24 hours	At least 24 hours
Freeze/Thaw (3 cycles) (Bias)	2.7%	4.1%
Limit of detection (LOD)	0.0281 nM	0.0621 nM
Limit of quantitation (LOQ)	0.0936 nM	0.2071 nM
Recovery	92.7%	86.1%
Glassware adhesion (Bias)	≤ 3.9%	≤ 4.7%
Plastic adhesion (Bias)	≤ 5.4%	≤ 3.9%

\*RSD: Relative Standard Deviation

\*\* $r^2$  refers to Pearson's correlation coefficient

\*\*\* Stability is defined by less than 15% variability from baseline values.

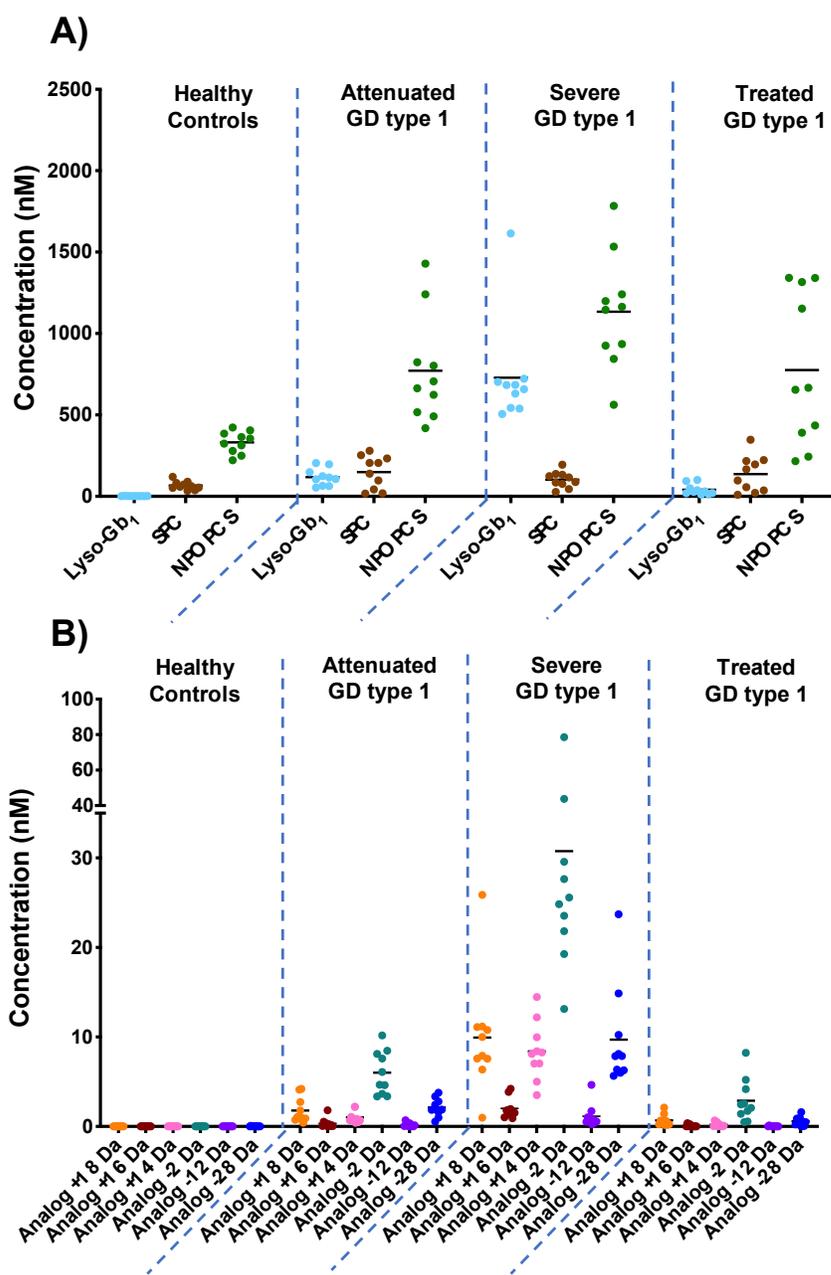
**Biomarker Distribution in Controls, Treated and Untreated GD Type 1 Patients**

As previously mentioned, some clinical data were not available for all patients. Therefore, the scoring system presented by Weinreb *et al.*, in 2010 [25] was adapted to match available clinical information of patients included in this study (Table 3).



**Table 3.** Scoring table used to assess the GD severity based on clinical manifestations

Disease Domaine	Assessments	Disease Severity Score										Assessment Score	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9		10
<b>Bone</b>	Lytic Lesions, Avascular necrosis Pathological Fractures	No								Yes			<b>8</b>
	Bone/Joint Pain	No		Mild			Moderate			Severe		Extreme	<b>10</b>
	Bone Crisis	No		Yes									<b>2</b>
	Bone Marrow Infiltration	0 to 4								5 to 8		9 to 16	<b>10</b>
	Decreased Mineral Density	No										Yes	<b>10</b>
<b>Hematologic</b>	Thrombocytopenia	$>120 \times 10^3$		21 to $120 \times 10^3$		$<20 \times 10^3$							<b>4</b>
	Anemia	$>12$ g/dl (M) $>11$ g/dl (F)		8 to 12 g/dl (M) 8 to 11 g/dl (F)		$< 8$ g/dl (M & F)							<b>4</b>
<b>Visceral</b>	Splenomegaly	No	Mild	Moderate			Severe/ Splenectomized						<b>5</b>
	Hepatomegaly	No	Mild	Moderate		Severe							<b>4</b>
	Pulmonary Disease	No								Yes			<b>8</b>



**Figure 5.** Distribution of A) Lyso-Gb<sub>1</sub>, SPC, and NPOPCS; B) Lyso-Gb<sub>1</sub> analogs +18, +16, +14, -2, -12, and -28 Da in treated (n=10), untreated with severe (n=10) and attenuated (n=10) GD type 1 adults, and healthy adult controls (n=10). GD patients were separated into 2 different groups (severe and attenuated) based on the severity of the clinical manifestations. Treated patients had varying degrees of severity before ERT initiation. Plasma biomarker concentrations are expressed in nanomoles per liter (nM). The mean biomarker level for each molecule is indicated by a horizontal bar.

As shown in Figure 5, lyso-Gb<sub>1</sub> is barely detectable (1.22 - 1.44 nM) in healthy controls while lyso-Gb<sub>1</sub> analogs are not found. However, these molecules were all observed in GD patients, with levels matching the severity of the disease. Indeed, lyso-Gb<sub>1</sub> and related analogs were measured in higher concentrations in patients affected with a more severe form of GD type 1 compared to the group of patients with the attenuated form. Patients who were treated had a lower concentration of these molecules than untreated patients. These latter untreated patients were GD type 1 attenuated or severe patients where samples were collected at baseline (therefore not receiving any treatment). This was further supported by the Mann-Whitney U test which revealed that lyso-Gb<sub>1</sub> and the related analog levels are significantly different in controls compared to GD patients. The statistical significance was established at  $p < 0.01$ . There is a significant difference between attenuated and severely affected GD patients for lyso-Gb<sub>1</sub> and all related analogs. Moreover, the Mann-Whitney U test indicated that treated GD patients had significantly lower levels of lyso-Gb<sub>1</sub> compared to severely affected patients. Furthermore, regarding treated patients, lyso-Gb<sub>1</sub> as well as analogs -28, -2, +14, and +18 Da concentrations were deemed statistically different from healthy controls. Analogs -12, and +16 Da, however, did not differ significantly between treated patients and healthy controls. Therefore, our data suggest that lyso-Gb<sub>1</sub> and related analogs are metabolites potentially suitable for the prognosis and monitoring of patients as the levels increase with the severity of the disease and decrease upon ERT treatment.

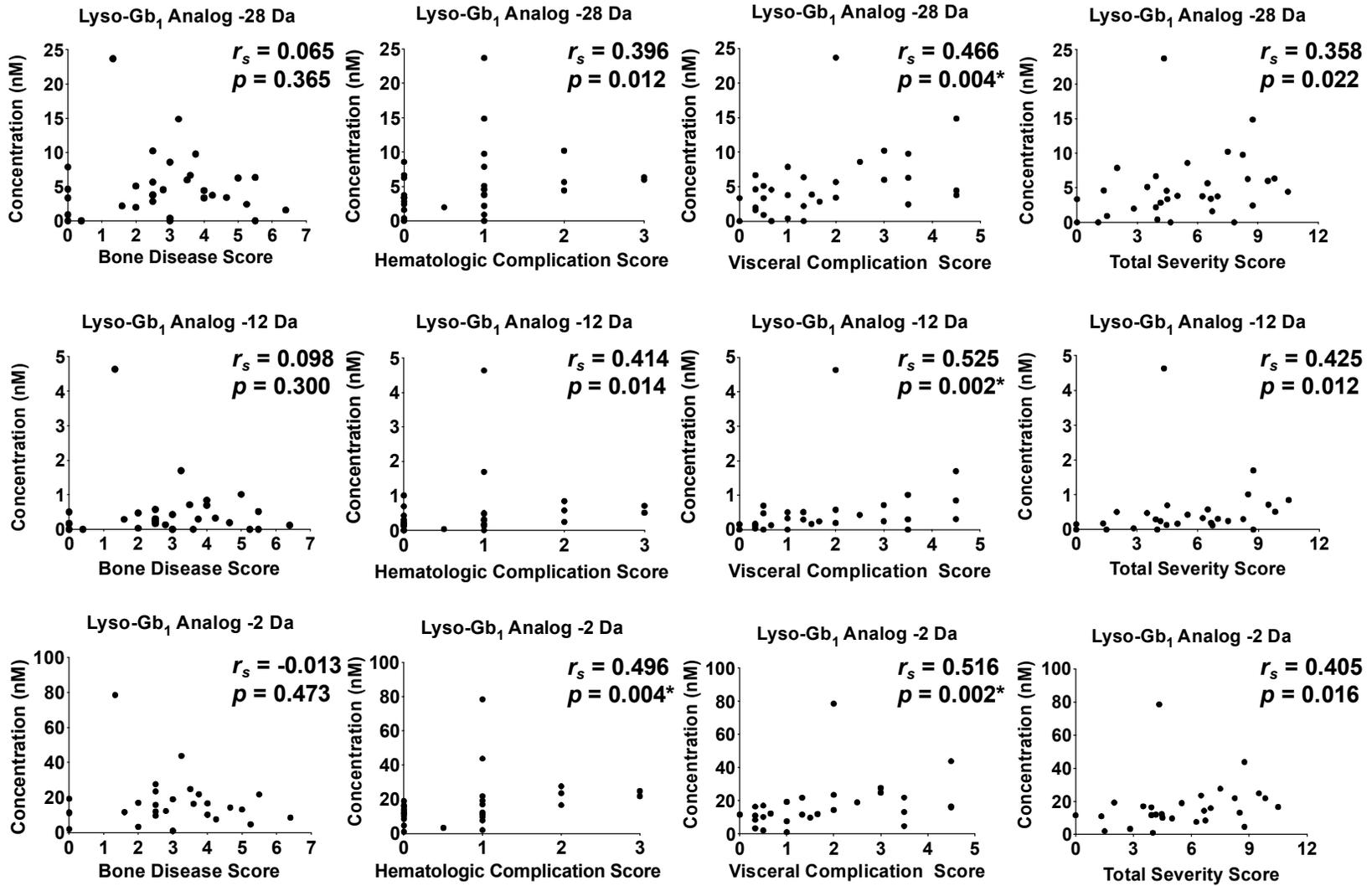
SPC was observed in both healthy controls and GD type 1 patients. SPC levels did not match the severity of the disease with several patients with a severe form of GD having less elevated levels of SPC than those with the attenuated form of the disease. This was further supported by the Mann-Whitney U test as the differences between severe, attenuated, and healthy controls were deemed not significant ( $p > 0.01$ ). Moreover, the Mann-Whitney U test also indicated that patients who received ERT treatment did not have significantly lower levels of SPC compared to untreated patients ( $p > 0.01$ ). This suggests that SPC is likely subject to variation within the GD population and specific levels may not be in direct correlation with the patient's clinical manifestations and severity of the disease.

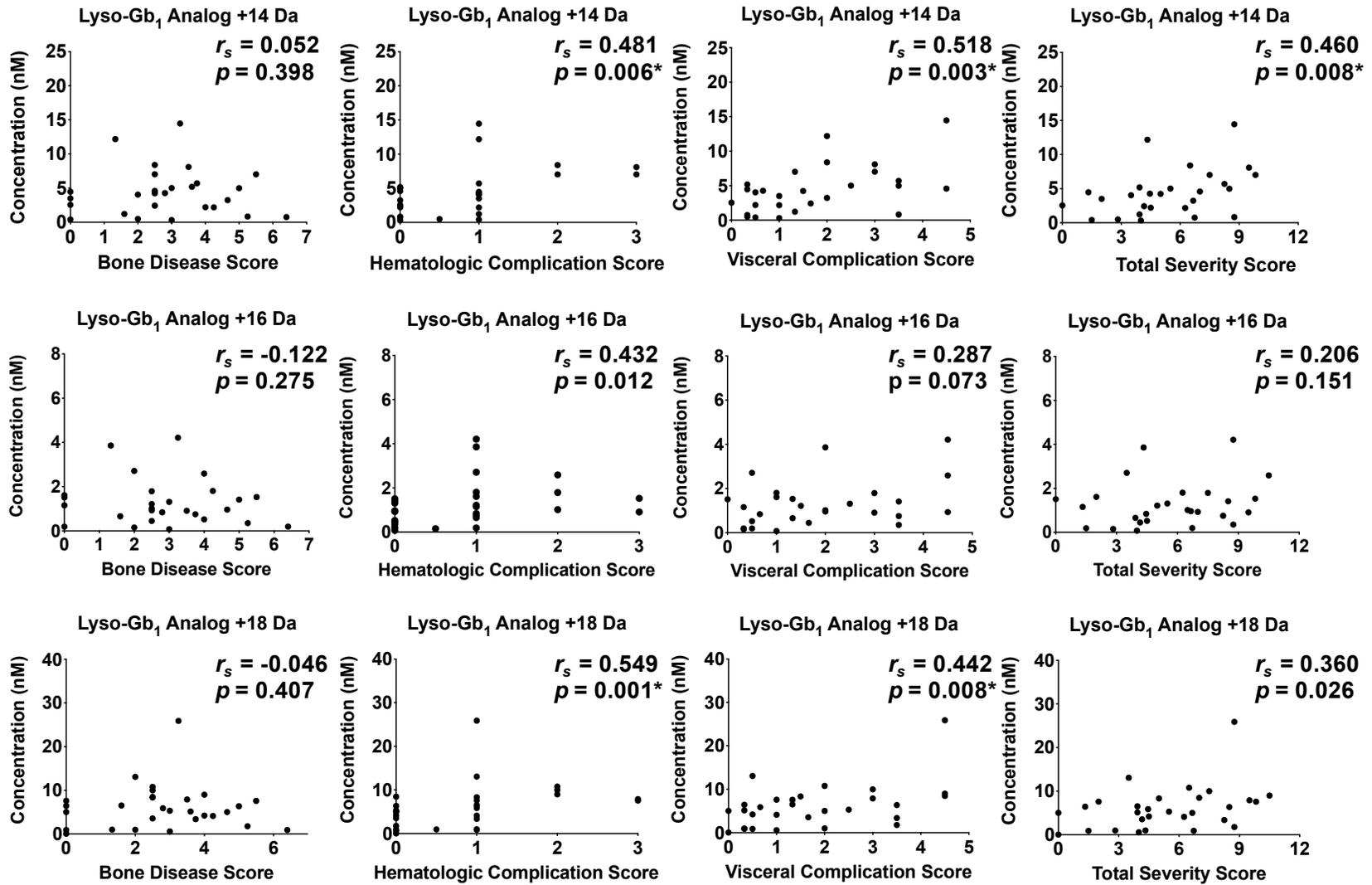
Considering that SPC is increased in other diseases such as Niemann-Pick type A and B [26], it seems to provide limited information regarding the diagnosis and prognosis of GD, and therefore is not a suitable and reliable biomarker for GD patients.

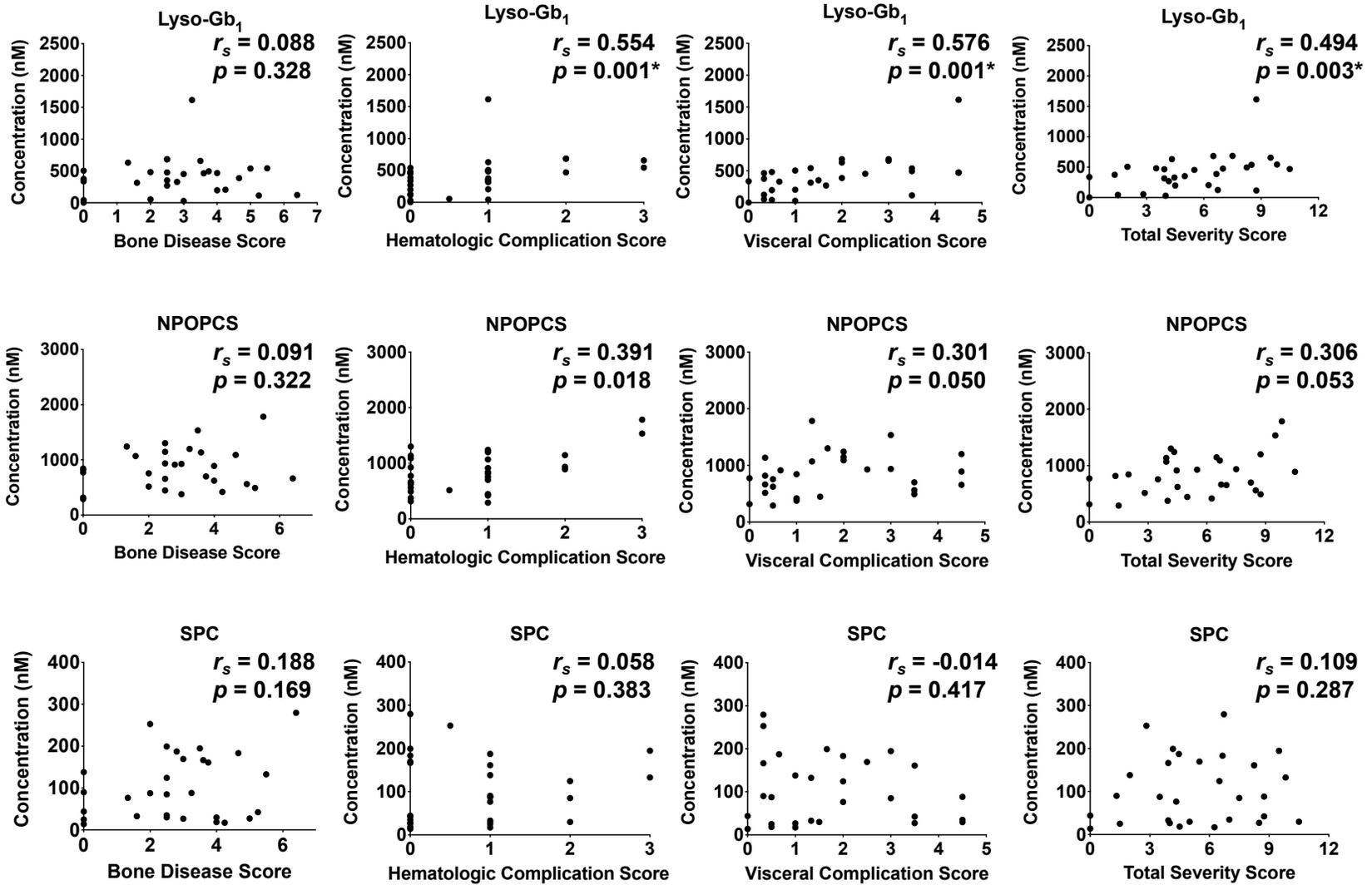
Similar to SPC, NPOPCS was observed in relatively abundant concentrations in healthy controls. Moreover, measured levels of NPOCS did not appear to correlate with the severity of the disease as the differences in biomarkers levels in the attenuated and severe groups were deemed not significant ( $p > 0.01$ ). Also, there were no statistically significant differences between the treated and untreated GD patients, suggesting that NPOPCS is likely subject to important variations within the GD population. Moreover, while NPOPCS is found in healthy controls with relatively high levels (222 nM - 422 nM), these levels are still significantly lower than those seen in patients with an attenuated form of GD type 1 (419 nM - 1428 nM) as revealed by the Mann-Whitney U test ( $p < 0.01$ ). Therefore, this suggests that, unlike SPC, the plasma increase of NPOPCS found in suspected GD patients might be an indicator that the patient is affected with the disease. However, it is important to point out that NPOPCS is not specific to GD as it is increased in Niemann-Pick type C disease and therefore this biomarker must be used in combination with other more specific GD biomarkers such as lyso-Gb<sub>1</sub> [27]. The  $p$ -values associated with each group are summarized in Supplementary Table 4.

### **Biomarker Levels and Disease Severity**

To evaluate the correlations between disease severity and biomarker levels, 38 patients were assigned a Gaucher Severity Score based on their clinical manifestations as shown in Table 3 [25]. We would like to emphasize that there was no hemolysis encountered in all plasma samples analyzed. The score for each disease domain was plotted with the individual concentration for each biomarker. Potential correlations were investigated using the Spearman rank-order statistical test. Statistical significance was established at  $p < 0.01$ .







**Figure 6.** Correlations between each disease domain and individual biomarker concentration in an untreated adult GD type 1 patient. Scores were based on clinical manifestations and corresponding scores presented in Table 3. Biomarker concentrations are expressed in nanomoles per liter of plasma.  $r_s$  refers to the Spearman correlation factor and  $p$  refers to the  $p$ -value. An “\*” highlights a statistically significant result with a  $p < 0.01$ .

As shown in Figure 6, there were no significant correlations between the targeted markers and clinical bone disease manifestations. The lowest  $p$ -values and highest  $r_s$  regarding bone disease were observed with SPC at 0.188 and 0.169, respectively, being far from statistically significant. Typically, a  $r_s$  value  $\pm [1 - 0.7]$  is considered a strong correlation,  $\pm [0.7 - 0.4]$  is a moderate correlation, while  $\pm [0.4 - 0.1]$  is a weak correlation between 2 variables [28]. Consequently, our results suggest that the severity of bone disease cannot be predicted using markers evaluated in this research project. Based on literature data, we expected to see relatively strong correlations between lyso-Gb<sub>1</sub> and visceral, and/or hematological complications for other disease domains [19,29]. As initially hypothesized, lyso-Gb<sub>1</sub> had the strongest correlation with hematological complications with a  $r_s = 0.554$  and  $p$ -value = 0.001. Lyso-Gb<sub>1</sub> analogs -2, +14, and +18 Da also had a statistically significant correlations with hematological complications at  $p < 0.01$  with  $r_s = 0.496$ , 0.481 and 0.549, respectively. Therefore, our data suggest that a patient with a significant increase in lyso-Gb<sub>1</sub> as well as lyso-Gb<sub>1</sub> analogs -2, +14, and +18 Da is more at risk of developing hematological complications, namely anemia, and thrombocytopenia than patients without significant concentrations of these markers.

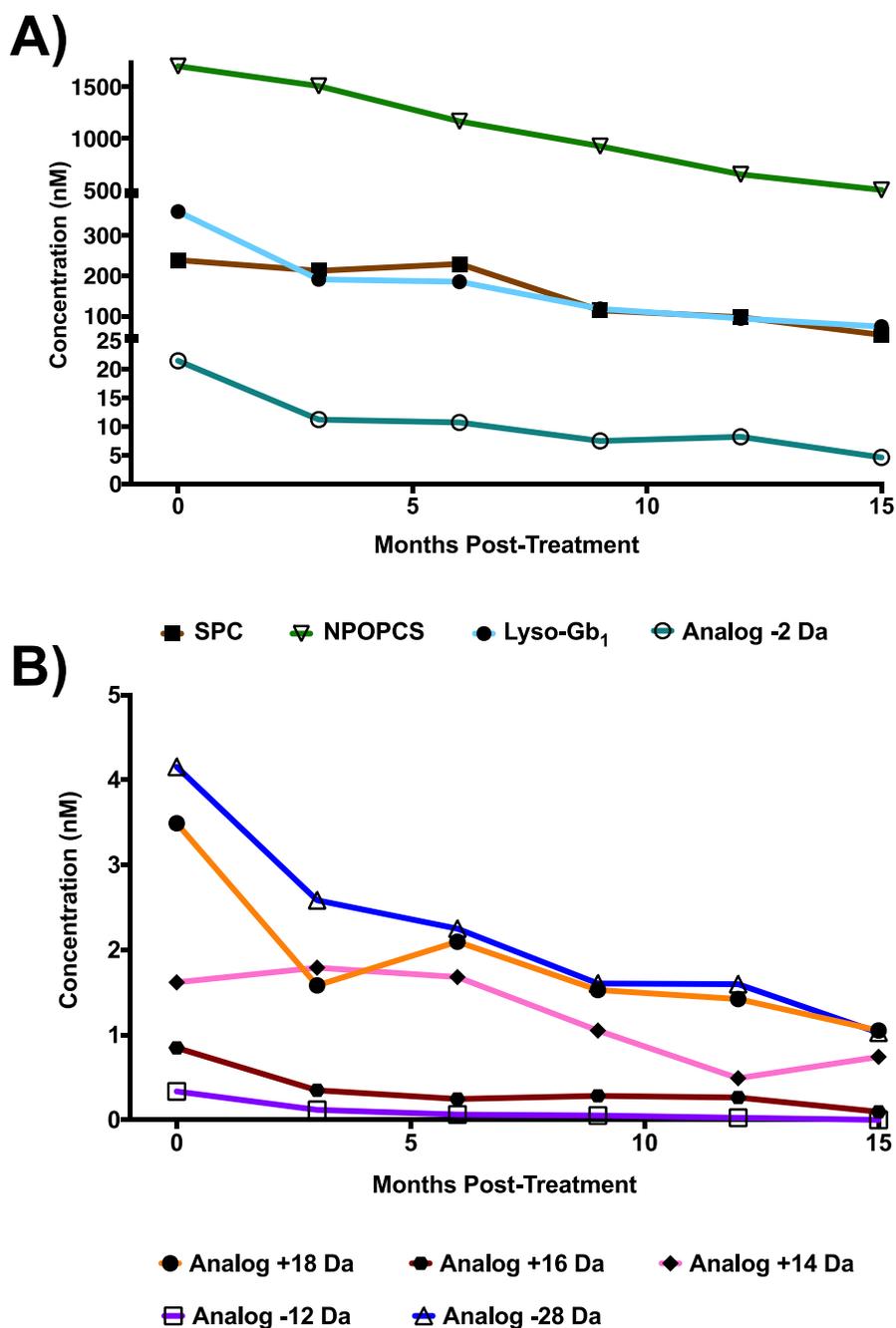
Moreover, statistically significant correlations between visceral complications, such as organomegaly, and biomarker levels were found for lyso-Gb<sub>1</sub> and most analogs, except the analog +16 Da ( $p = 0.073$ ) (Figure 6). The strongest  $r_s$  value was observed in lyso-Gb<sub>1</sub> ( $r_s = 0.576$ ), followed by analogs -12 ( $r_s = 0.525$ ), +14 ( $r_s = 0.518$ ), -2 ( $r_s = 0.516$ ), -28 ( $r_s = 0.466$ ), and +18 Da ( $r_s = 0.442$ ), respectively. Overall, correlations with visceral complications were deemed not statistically significant for NPOPCS, SPC, and the lyso-Gb<sub>1</sub> analog +16 Da. Lyso-Gb<sub>1</sub> and analog +14 Da were the only biomarkers with a



significant correlation with the overall disease severity at  $p < 0.01$ . More precisely, lyso-Gb<sub>1</sub> had the highest correlation with disease severity at  $r_s = 0.494$  while the analog +14 Da had a  $r_s = 0.460$ . Therefore, based on the results obtained in this section of the study, we believe that lyso-Gb<sub>1</sub> as well as analogs -28, -12, -2, +14, and +18 Da should be included in any biomarker quantitation assay, as they have highly significant correlations with hematological and/or visceral and/or overall disease severity. These data might help clinicians assessing the best approach for following each patient.

### *3.4 Biomarker Levels and Treatment Follow Up*

Several patients pre-and post-ERT were evaluated to assess the variability in biomarker levels following treatment. As shown in Figure 7, a decreasing trend in biomarker levels was observed following ERT. Three patients had over a year of longitudinal follow-up but only one patient is shown for clarity purposes. All patients displayed a similar biomarker reduction pattern following ERT treatment even at the first follow-up visit post-treatment.



**Figure 7.** Biomarker reduction following ERT treatment in a 55-year-old female GD type 1 patient. A) Decreased levels of SPC, NPOPCS, lyso-Gb<sub>1</sub>, and lyso-Gb<sub>1</sub> analog -2 Da post-ERT; B) Decreased levels of Lyso-Gb<sub>1</sub> analogs +18, +14, +16, -12, and -28 Da post-ERT. Patients received their first treatment following timepoint 0 and blood samples were collected at each follow-up visit (every 3 months). Biomarker concentrations are expressed in nanomoles per liter of plasma.

Also, as expected, the reduction in biomarker concentrations matched the patient's improvement in several systems affected by the condition as shown in Table 4, namely hematological and visceral complications.

**Table 4.** Effects of ERT on hematological and visceral complications in a 55-year-old female GD type 1 patient (Same patient as in Figure 7)

<b>Months post-ERT</b>	<b>Platelet Count (x10<sup>3</sup> mm<sup>3</sup>)</b>	<b>Hemoglobin (g/dl)</b>	<b>Liver Volume (by MRI*)</b>	<b>Spleen Volume (by MRI*)</b>
0	94	12.9	1666	976
3	105	13.3	-	-
6	136	13.0	1200	750
9	185	13.8	-	-
12	184	13.9	1302	570
15	124	14.5	-	-

\*MRI: Magnetic Resonance Imaging

It should be noted that while the results of only one patient are shown in Figure 7 and Table 4 for clarity purposes, a similar phenomenon, namely a decreasing trend in biomarker levels was observed for all 3 patients with longer term follow-up (See Supplementary Figures 1 and 2). Moreover, a decrease in biomarker concentrations at the first clinical evaluation following ERT was also noted in most of the 20 ERT-treated patients who were part of the study. This decrease in biomarker levels matched improvement in the patient's overall condition. Furthermore, our analog quantitation results show that there were no major distribution changes observed in patients pre- or post-treatment (after 3, 6, 9, 12 or 15 months) (Supplementary Figures 3, 4, and 5). Overall, these data suggest that the proposed panel of biomarkers used in this study is decreasing upon treatment, and improvement in the patient's condition suggests that they are suitable for the patients' follow-up. It is, however, important to remember there were no significant differences between SPC or NPOPCS and disease severity in treated and untreated patients (Figure 5). Therefore, these 2 markers might not be reliable to evaluate the severity of the clinical manifestations based on general reference values. These data should only be compared

with the patient's baseline values, in combination with other biomarkers, to assess the efficacy of a specific treatment over time.

## **Conclusion**

In this study, we have developed and validated a new UPLC-MS/MS method to perform a relative quantitation of potential biomarkers previously highlighted during a recent plasma metabolomic study [21]. We have also investigated potential correlations between biomarker levels and clinical manifestations of GD. We have found that all biomarkers studied in this research project were significantly elevated in all Gaucher patients compared to healthy controls. Our data revealed no correlation between any of the studied markers and bone complications associated with GD. However, lyso-Gb<sub>1</sub> and most of the related analogs, except analog +16 Da, had statistically significant correlations with visceral complications such as hepatomegaly and/or splenomegaly. For hematological complications, namely anemia and thrombocytopenia, lyso-Gb<sub>1</sub> and analogs -2, +14, and +18 Da showed statistically significant correlations. Finally, lyso-Gb<sub>1</sub> and the lyso-Gb<sub>1</sub> analog +14 Da were the only biomarkers with significant correlations with overall disease severity. Longitudinal studies revealed that biomarkers tend to decrease rapidly following treatment which is in accordance with the improvement in the overall patients' conditions. Therefore, we suggest including lyso-Gb<sub>1</sub> and related analogs in a profile of biomarkers for GD which might efficiently guide clinicians towards a more precise and accurate prognosis assessment of their patients. Unfortunately, for most patients included in this study, data on other biomarkers such as CCL18/PARC, ACE, TRAP5b, or chitotriosidase were not available.

## **Future perspectives**

Future perspectives will involve a comparison between these latter biomarkers and those targeted in the current study. This would help to understand the advantages and limitations of these biomarkers for the early detection, monitoring, and follow-up of GD patients.

**Study limitations**

Considering samples from GD patients were collected in different countries, available clinical information, as well as clinical evaluations, might have varied from one center to the other. A larger cohort would probably have increased the statistical power analysis for the correlations between biomarker levels and clinical manifestations. Another limitation of this study regards the volume of plasma available from GD patients which did not allow us to perform an extensive validation using patients' samples. Moreover, regarding the quantification method itself, only a relative quantification was possible for lyso-Gb<sub>1</sub> analogs and NPOPCS, since standards and internal standards were not available at this time for these latter molecules. Also, purity of the standards purchased from Matreya was not evaluated by a proton-NMR assay.

**Executive Summary****Background:**

- Biomarkers previously used for GD were not always suitable for diagnosis, monitoring, and follow-up of patients as they lack sensitivity, specificity, and/or are subject to important variation within the general population.
- In recent years, a new biomarker, glucosylsphingosine, emerged as the gold standard for follow-up and monitoring GD patients.
- A metabolomic study revealed the presence of other potential biomarkers related to GD. The clinical significance of these potential new biomarkers needed further investigation.

**Experimental:**

- Plasma is extracted from whole blood samples using a 10-min centrifugation procedure.
- Samples are purified using solid-phase extraction (Oasis MCX, Waters).
- A 12-min UPLC-MS/MS method was developed and validated to perform an absolute quantitation of lyso-Gb<sub>1</sub> and 6 related analogs (-28, -12, -2, +14, +16, and +18 Da), as well as sphingosylphosphorylcholine, and N-palmitoyl-O-phosphocholine.
- Correlations were investigated between biomarker concentrations and clinical manifestations of GD disease.

**Results:**

- There are statistically significant correlations between visceral complications (hepatomegaly and/or splenomegaly) and lyso-Gb<sub>1</sub>, as well as lyso-Gb<sub>1</sub> analogs -28, -12, -2, +14, and +18 Da.
- Lyso-Gb<sub>1</sub> and analogs -2, +14, and +18 Da showed statistically significant correlations with hematological complications.
- The only biomarkers with significant correlations with overall disease severity were lyso-Gb<sub>1</sub> and lyso-Gb<sub>1</sub> analog +14 Da.
- No metabolite showed a statistically significant correlation with bone disease.

**Conclusions:**

- A robust UPLC–MS/MS method was developed and validated to investigate potential correlations between metabolites typically elevated in the plasma of GD patients and specific clinical manifestations.
- This method represents an interesting tool for monitoring and follow-up of GD patients.

**References**

- [1] Regenboog M, van Kuilenburg AB, Verheij J, Swinkels, DW, Hollak CE. Hyperferritinemia and iron metabolism in Gaucher disease: Potential pathophysiological implications. *Blood Rev.* 30(6), 431–437 (2016).
- [2] Ruchlemer R, Mittelman M, Zimran A. (2020). Gaucher disease, myelodysplastic syndrome and ICUS. *Blood Cells Mol Dis.* 80, 102373 (2020).
- [3] Stirnemann J, Belmatoug N, Camou F *et al.* A review of Gaucher disease pathophysiology, clinical presentation and treatments. *Int J Mol Sci.* 18(2), 441 (2017).
- [4] Sidransky E. Gaucher disease: insights from a rare Mendelian disorder. *Discov Med.* 14(77), 273–281 (2012).
- [5] Zimran, A, Gonzalez-Rodriguez DE, Abrahamov A., *et al.* Safety and efficacy of two dose levels of taliglucerase alfa in pediatric patients with Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis.* 54(1), 9–16 (2015).
- [6] van Dussen L, Biegstraaten M, Dijkgraaf MG, Hollak CE. Modelling Gaucher disease progression: long-term enzyme replacement therapy reduces the incidence of splenectomy and bone complications. *Orphanet J Rare Dis.* 9, 112 (2014).
- [7] Bennett LL, Mohan D. Gaucher disease and its treatment options. *Ann Pharmacother.* 47(9), 1182–1193 (2013).

- [8] Lachmann RH. Substrate-reduction therapy with miglustat for glycosphingolipid storage disorders affecting the brain. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 4(3), 217–224 (2009).
- [9] Lukina E, Watman N, Arreguin EA, *et al.* A phase 2 study of eliglustat tartrate (Genz-112638), an oral substrate reduction therapy for Gaucher disease type 1. *Blood.* 116(6), 893–899 (2010).
- [10] Mistry PK, Deegan P, Vellodi A, Cole JA, Yeh M, Weinreb NJ. Timing of initiation of enzyme replacement therapy after diagnosis of type 1 Gaucher disease: effect on incidence of avascular necrosis. *Br J Haematol.* 147(4), 561–570 (2009).
- [11] Barney AM, Danda S, Abraham A *et al.* Clinicogenetic Profile, Treatment Modalities, and Mortality Predictors of Gaucher Disease: A 15-Year Retrospective Study. *Public Health Genomics.* 24(3-4), 139–148 (2021).
- [12] Nalysnyk L, Rotella P, Simeone JC, Hamed A, Weinreb N. Gaucher disease epidemiology and natural history: a comprehensive review of the literature. *Hematology.* 22(2), 65–73 (2017).
- [13] Thomas AS, Mehta AB, Hughes DA. Diagnosing Gaucher disease: an on-going need for increased awareness amongst haematologists. *Blood Cells Mol Dis.* 50(3), 212–217 (2013).
- [14] Gary SE, Ryan E, Steward AM, Sidransky E. Recent advances in the diagnosis and management of Gaucher disease. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 13(2), 107–118 (2018).
- [15] Giraldo P, López de Frutos L, Cebolla JJ. Biomarker combination is necessary for the assessment of Gaucher disease? *Ann Transl Med.* 6(Suppl 1), S81 (2018).
- [16] Bernstein KE, Khan Z, Giani JF, Cao DY, Bernstein EA, Shen XZ. Angiotensin-converting enzyme in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Nephrol.* 14(5), 325–336 (2018).
- [17] van Dussen L, Lips P, Everts VE *et al.* Markers of bone turnover in Gaucher disease: modeling the evolution of bone disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 96(7), 2194–2205 (2011).
- [18] Dekker N, van Dussen L, Hollak CE *et al.* Elevated plasma glucosylsphingosine in Gaucher disease: relation to phenotype, storage cell markers, and therapeutic response. *Blood.* 118(16), e118–e127 (2011).
- [19] \* Hurvitz N, Dinur T, Becker-Cohen M, *et al.* Glucosylsphingosine (lyso-Gb1) as a biomarker for monitoring treated and untreated children with Gaucher disease. *Int J Mol Sci.* 20(12), 3033 (2019).

- [20] \*\* Mirzaian M, Wisse P, Ferraz MJ *et al.* et Mass spectrometric quantification of glucosylsphingosine in plasma and urine of type 1 Gaucher patients using an isotope standard. *Blood Cells Mol Dis.* 54(4), 307–314.
- [21] \*\* Menkovic I, Boutin M, Alayoubi A, Mercier FE, Rivard GÉ, Auray-Blais C. Identification of a reliable biomarker profile for the diagnosis of Gaucher disease type 1 patients using a mass spectrometry-based metabolomic approach. *Int J Mol Sci.* 21(21), 7869 (2020).
- [22] \* Basit A, Piomelli D, Armirotti A. (2015). Rapid evaluation of 25 key sphingolipids and phosphosphingolipids in human plasma by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* 407(17), 5189–5198 (2015).
- [23] Kopytova AE, Rychkov GN, Nikolaev MA, *et al.* Ambroxol increases glucocerebrosidase (GCCase) activity and restores GCCase translocation in primary patient-derived macrophages in Gaucher disease and Parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord.* 84, 112–121 (2021).
- [24] \* Polo G, Burlina AP, Kolamunnage TB *et al.* Diagnosis of sphingolipidoses: a new simultaneous measurement of lysosphingolipids by LC-MS/MS. *Clin Chem Lab Med.* 55(3), 403–414 (2017).
- [25] Weinreb NJ, Cappellini MD, Cox TM *et al.* A validated disease severity scoring system for adults with type 1 Gaucher disease. *Genet Med.* 12(1), 44–51 (2010).
- [26] Schuchman, EH, Desnick RJ. Types A and B Niemann-Pick disease. *Mol Genet Metab.* 120(1-2), 27–33 (2017).
- [27] Maekawa M, Iwahori A, Mano N. Biomarker analysis of Niemann-Pick disease type C using chromatography and mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 191, 113622 (2020).
- [28] Akoglu H. User's guide to correlation coefficients. *Turk J Emerg Med.* 18(3), 91–93 (2018).
- [29] Cozma C, Cullufi P, Kramp G *et al.* Treatment efficiency in Gaucher patients can reliably be monitored by quantification of lyso-Gb<sub>1</sub> concentrations in dried blood spots. *Int J Mol Sci.* 21(13), 4577 (2020).

### Reference Annotations

- [19] \* Hurvitz N, Dinur T, Becker-Cohen M, *et al.* Glucosylsphingosine (lyso-Gb<sub>1</sub>) as a biomarker for monitoring treated and untreated children with Gaucher disease. *Int J Mol Sci.* 20(12), 3033 (2019).



Lyso-Gb<sub>1</sub> was analyzed in plasma for numerous GD patients. The authors observed some degree of correlation between lyso-Gb<sub>1</sub> and the severity of the disease in children.

[20] \*\* Mirzaian M, Wisse P, Ferraz MJ *et al.* et Mass spectrometric quantification of glucosylsphingosine in plasma and urine of type 1 Gaucher patients using an isotope standard. *Blood Cells Mol Dis.* 54(4), 307–314.

A study showing the presence of lyso-Gb<sub>1</sub> related metabolites. Using enzymatic testing, these metabolites were confirmed to be lyso-Gb<sub>1</sub> analogs.

[21] \*\* Menkovic I, Boutin M, Alayoubi A, Mercier FE, Rivard GÉ, Auray-Blais C. Identification of a reliable biomarker profile for the diagnosis of Gaucher disease type 1 patients using a mass spectrometry-based metabolomic approach. *Int J Mol Sci.* 21(21), 7869 (2020).

A recent metabolomic study using untreated GD patients reveals the existence of new lyso-Gb<sub>1</sub> analogs. This study also highlighted several other metabolites potentially related to GD.

[24] \* Polo G, Burlina AP, Kolamunnage TB *et al.* Diagnosis of sphingolipidoses: a new simultaneous measurement of lysosphingolipids by LC-MS/MS. *Clin Chem Lab Med.* 55(3), 403–414 (2017).

A UPLC-MS/MS method was developed for the quantitation of several biomarkers related to sphingolipidoses. Patient's samples were analyzed using the proposed method to show that it is reliable and might potentially be used in the clinical setting.

[22] \* Basit A, Piomelli D, Armirotti A. (2015). Rapid evaluation of 25 key sphingolipids and phosphosphingolipids in human plasma by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* 407(17), 5189–5198 (2015).

A rapid and robust method using UPLC-MS/MS technology to quantify 25 sphingolipids in plasma samples. A surrogate matrix was used to overcome the presence of endogenous analytes in control samples.

### **Author Contributions**

I.M. was involved in the development and validation of the quantitation method, the sample preparation, analysis, data processing steps, and in the original draft preparation, reviewing, and editing processes of the manuscript. M.B. supervised the study and was involved in the manuscript drafting, editing, and revision process. A.A., F.E.M., G.-É.R., and F.C provided the samples used for this study, as well as pertinent patient clinical information, and reviewed the manuscript. C.A.-B. designed and supervised the study. She was also involved in the interpretation of data, the drafting, editing, and revision of the manuscript. C.A.-B. also secured the resources and funding required for this study. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

### **Acknowledgements**

We acknowledge Shire/Takeda Pharmaceutical for funding this research project under a collaborative research agreement. We would like to thank the Faculty of Medicine and Health Sciences at the Université de Sherbrooke for a doctoral student grant for Iskren Menkovic. Moreover, we would sincerely like to thank Caroline Barr, Nurse-Coordinator at CR-CHUS, Sherbrooke, QC and Claude Meilleur, Clinical Nurse as well as Clemence Merlen, Ph.D., CHU Sainte-Justine for their involvement in this research project. Finally, we are grateful for the instrumental expertise and continuous support received from Waters Corporation.

### **Disclosures**

C.A.-B. received research grants and honoraria from Shire/Takeda Pharmaceutical. F.E.M. was paid for an advisory board by Sanofi-Genzyme. F.C. is a clinical project manager for Centogene GmbH. P.B is the Chief Genomic Officer at Centogene GmbH. I.M. received a student stipend from Shire/Takeda Pharmaceutical. M.B. received a salary from Shire/Takeda Pharmaceutical. A.A., and G.-É.R. declare that they have no conflicts of interest.

This research project was approved by the Research Ethics Board (REB) of the Faculty of Medicine and Health Sciences of the Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke (CHUS) under the project ID MP-31-2017-1414. Collaborating centers REB also approved the project for their respective centers. Moreover, patients recruited from Centogene were part of the Lyso-Prove project, approved by the Universität Rostock REB under project ID A 2015-0025. Informed consent from all patients and healthy controls were obtained.

**Supplementary Table 1.** Low (LQC), Medium (MQC), and High (HQC) quality control samples precision and accuracy results for intra- and interday analyses

Analyte	Precision (RSD%)						Accuracy (Bias%)					
	Intraday (n=5)			Interday (n=5)			Intraday (n=5)			Interday (n=5)		
	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC
Lyso-Gb <sub>1</sub>	4.1	3.2	3.6	4.2	2.7	2.5	9.6	6.8	3.1	5.2	8.1	6.3
SPC	3.1	3.3	4.8	3.8	2.9	3.0	15.1	13.9	7.7	9.1	9.7	10.1

**Supplementary Table 2** Stability of lyso-Gb<sub>1</sub> in plasma samples expressed in bias (%) after 24 hours, 48 hours, 1 week and 1 month at -30°C, 4°C and 22°C

Temperature	Stability Duration											
	24 hours			48 hours			1 week			1 month		
	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC
-30°C	10.4	7.3	5.9	3.8	2.9	6.3	-12.1	8.7	11.4	14.4	6.2	-8.2
4°C	4.3	8.1	-4.8	-6.9	5.5	2.0	-19.1	13.4	-14.0	-	-	-
22°C	9.1	-3.2	5.1	-18.7	-14.8	11.6	19.7	-14.0	-15.3	-	-	-

**Supplementary Table 3.** Stability of SPC in plasma samples expressed in bias (%) after at 24 hours, 48 hours, 1 week and 1 month at -30°C, 4°C and 22°C

Temperature	Stability Duration											
	24 hours			48 hours			1 week			1 month		
	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC
-30°C	9.5	7.6	13.9	6.7	7.3	5.7	-4.8	17.1	-2.6	11.2	16.4	6.8
4°C	6.7	5.4	-9.3	21.3	16.4	10.3	26.3	19.2	28.7	-	-	-
22°C	9.1	-3.2	5.1	19.2	14.3	30.1	-	-	-	-	-	-

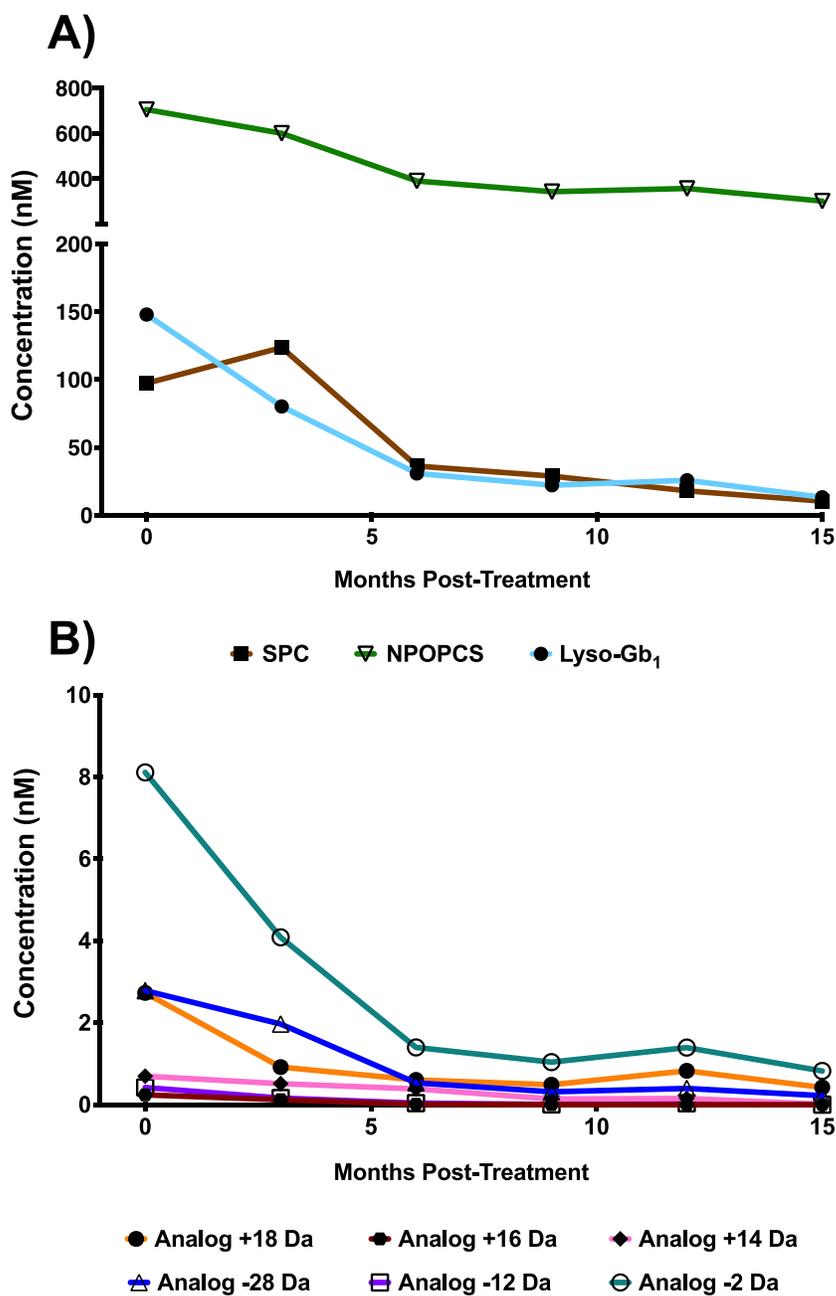
**Supplementary Table 4.** Calculated *p*-values in treated, untreated severe and attenuated GD patients as well as healthy controls using

Group comparison	Biomarker <i>p</i> -values								
	Analog -28 Da	Analog -12 Da	Analog -2 Da	Lyso-Gb <sub>1</sub>	Analog +14 Da	Analog +16 Da	Analog +18 Da	SPC	NPOPCS
Control/Attenuated	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	0.123	< 0.001*
Control/Severe	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	0.075	< 0.001*
Control/Treated	< 0.001*	0.870	< 0.001*	< 0.001*	0.003*	0.033	< 0.001*	0.315	0.029
Severe/Attenuated	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	0.280	0.023
Treated/Attenuated	< 0.001*	0.013	0.009*	< 0.001*	< 0.001*	0.042	0.011	0.684	0.739

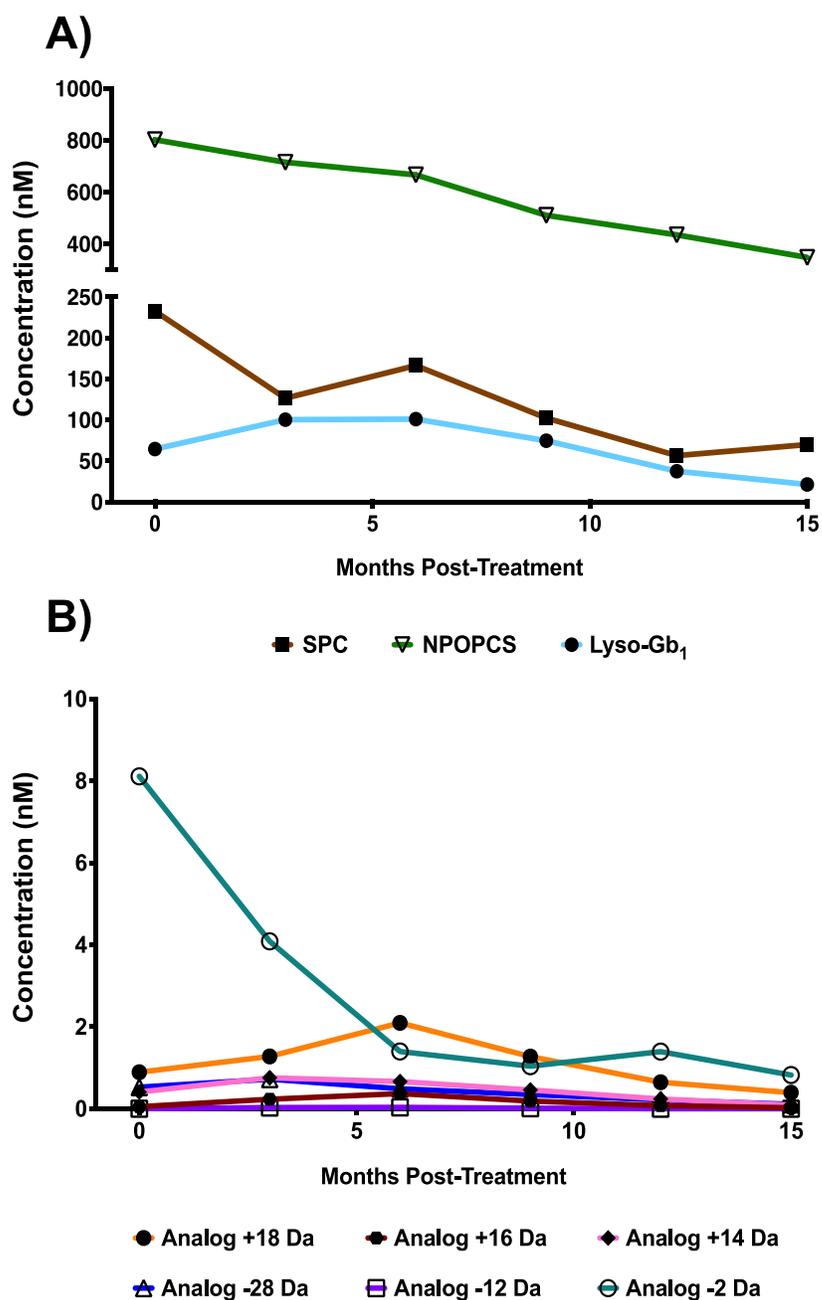
the non-parametric Mann-Whitney U test.

Statistical significance was established at  $p < 0.01$

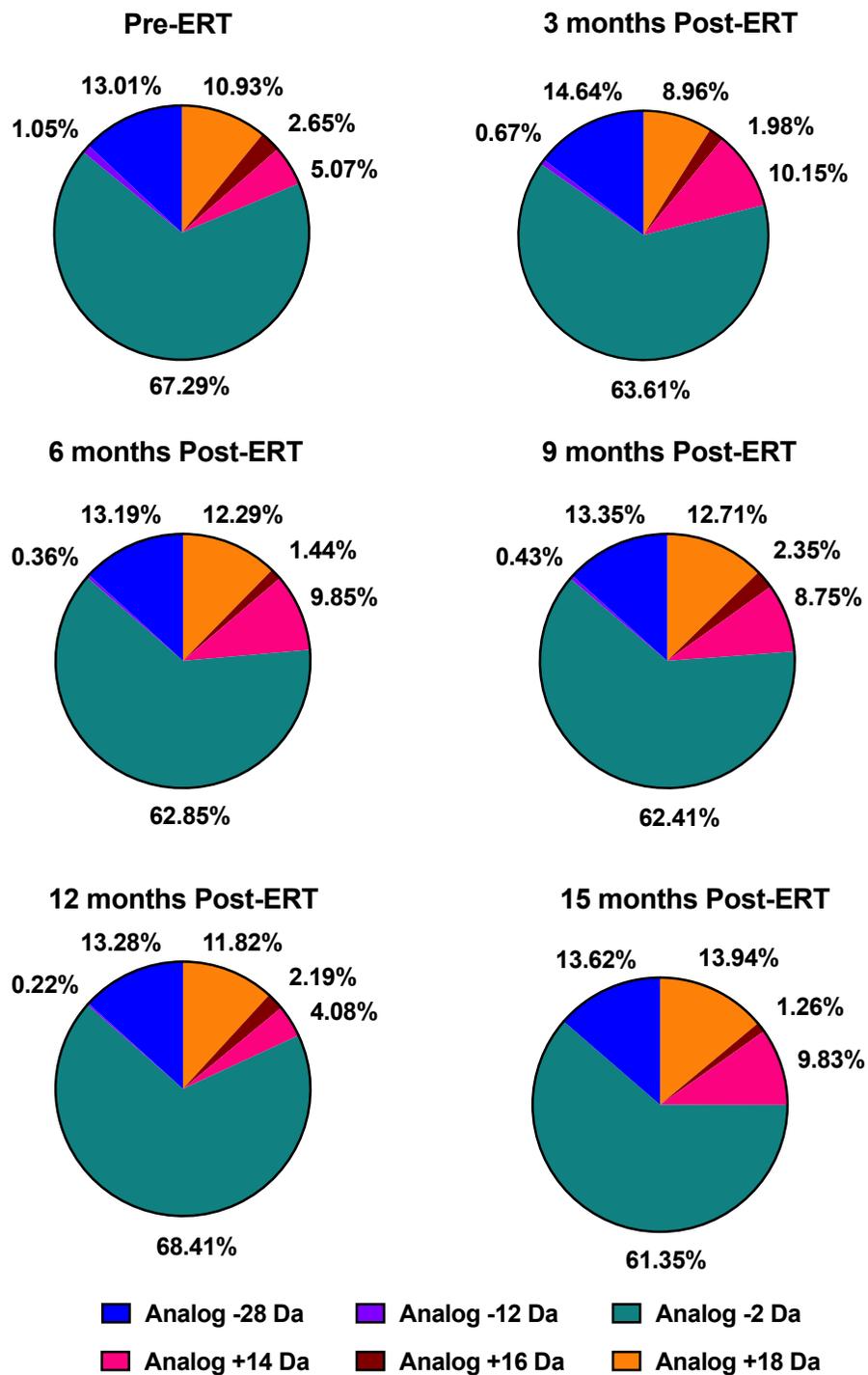
(\*) Shows a statistically significant difference between compared datasets



**Supplementary Figure 1.** Biomarker reduction following ERT treatment in a 55-year-old male GD type 1 patient. A) Decreased levels of SPC, NPOPCS, and lyso-Gb<sub>1</sub> post-ERT; B) Decreased levels of Lyso-Gb<sub>1</sub> analogs +18, +14, +16, -2, -12, and -28 Da post-ERT. Patients received their first treatment following timepoint 0 and blood samples were collected at each follow-up visit (every 3 months). Biomarker concentrations are expressed in nanomoles per liter of plasma.

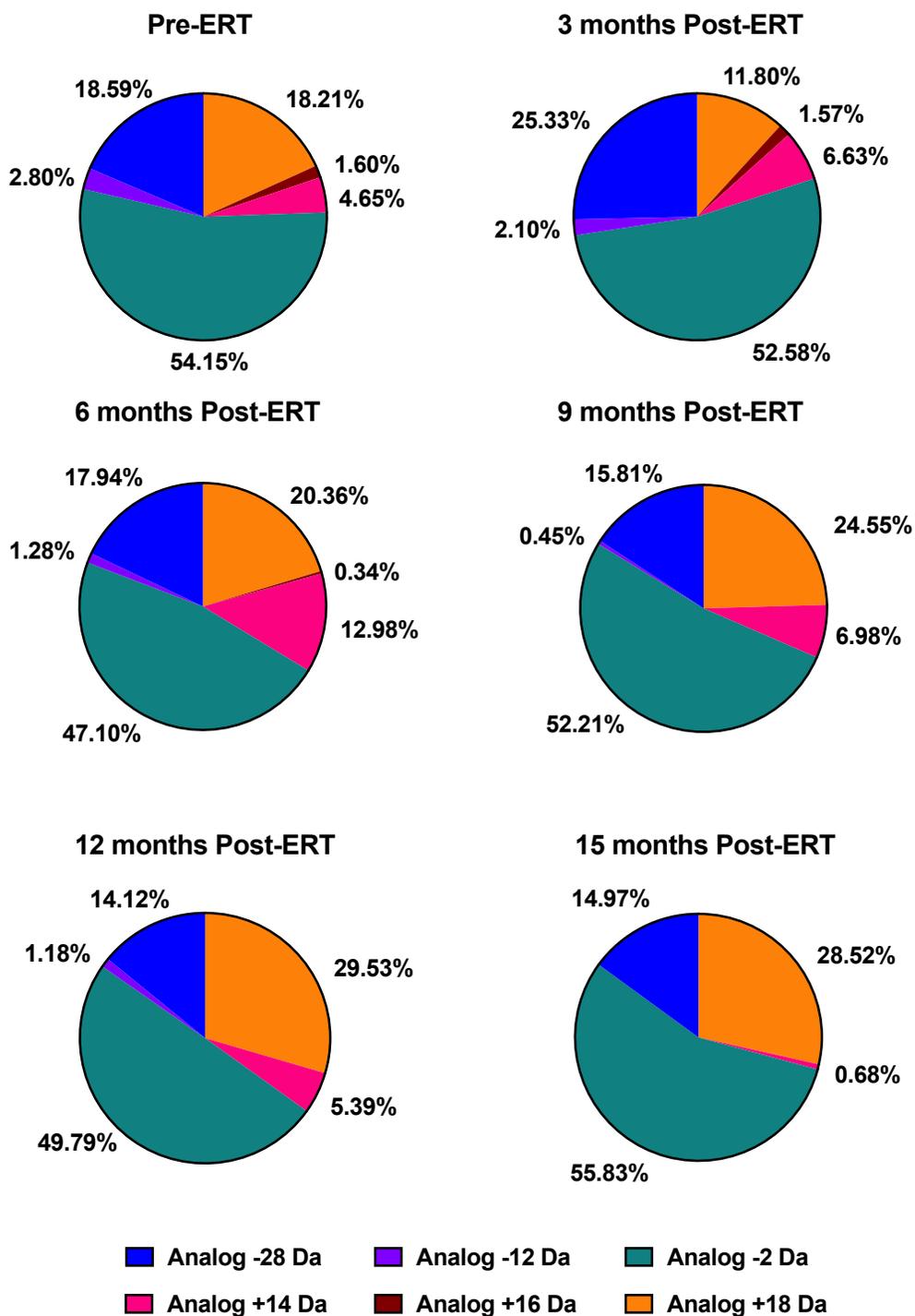


**Supplementary Figure 2.** Biomarker reduction following ERT treatment in an 18-year-old male GD type 1 patient. A) Decreased levels of SPC, NPOPCS, and lyso-Gb<sub>1</sub> post-ERT; B) Decreased levels of Lyso-Gb<sub>1</sub> analogs +18, +14, +16, -2, -12, and -28 Da post-ERT. Patients received their first treatment following timepoint 0 and blood samples were collected at each follow-up visit (every 3 months). Biomarker concentrations are expressed in nanomoles per liter of plasma.

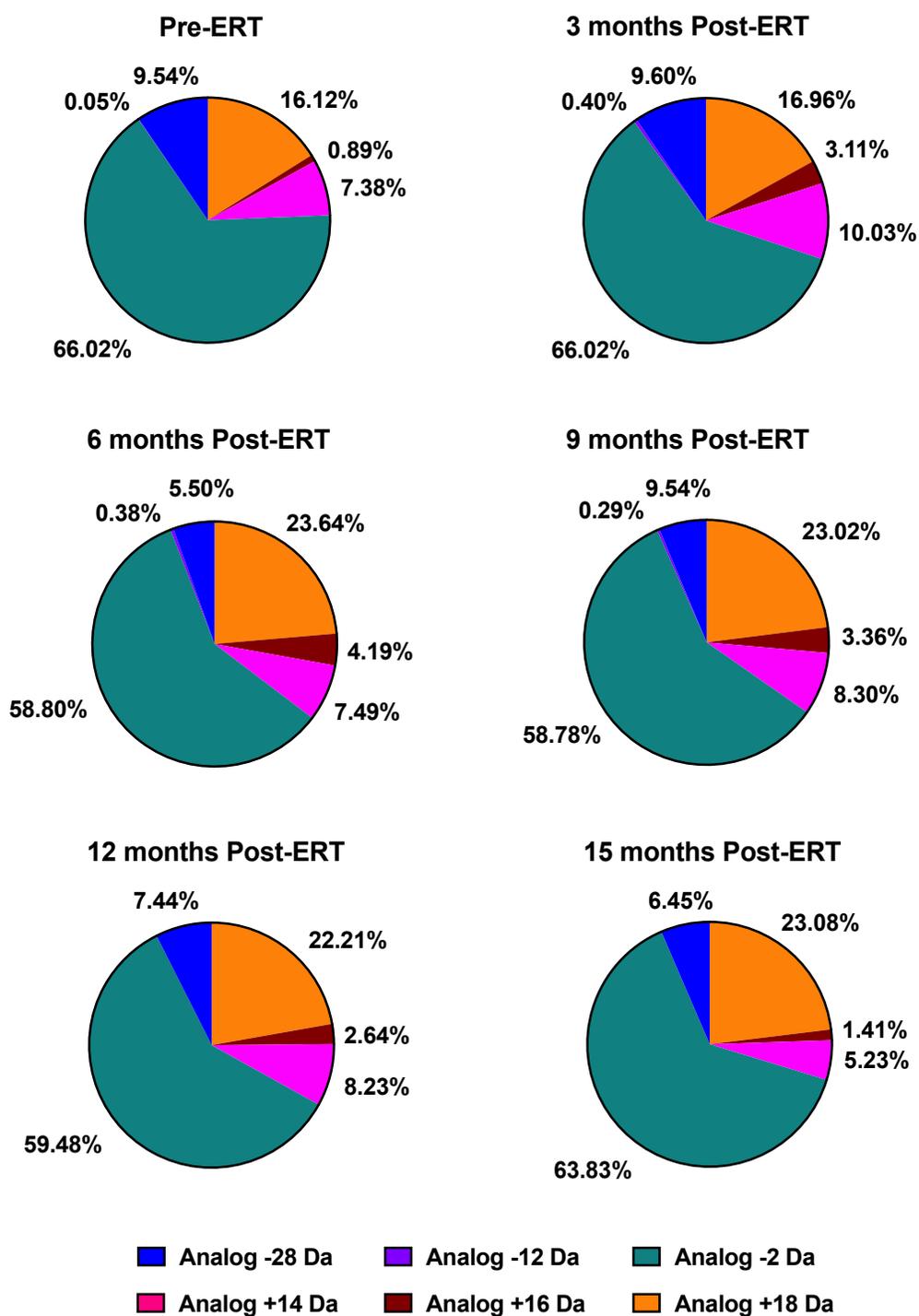


**Supplementary Figure 3.** Pie chart distribution of lyso-Gb<sub>1</sub> analogs +18, +14, +16, -2, -12, and -28 Da pre- and post-ERT in a 55-year-old female GD type 1 patient.





**Supplementary Figure 4.** Pie chart distribution of lyso-Gb<sub>1</sub> analogs +18, +14, +16, -2, -12, and -28 Da pre- and post-ERT in a 55-year-old male GD type 1 patient.



**Supplementary Figure 5.** Pie chart distribution of lyso-Gb<sub>1</sub> analogs +18, +14, +16, -2, -12, and -28 Da pre- and post-ERT in an 18-year-old male GD type 1 patient.

## 23 ARTICLE 3

### **Metabolomic study using time-of-flight mass spectrometry reveals novel urinary biomarkers for Gaucher disease type 1**

**Auteurs de l'article:** Iskren Menkovic, Michel Boutin, Abdulfatah Alayoubi, Filipa Curado, Peter Bauer, François E. Mercier, Christiane Auray-Blais

**Statut de l'article:** Publié le 29 mars 2022 dans *Journal of Proteome Research*, 21(5), 1321–1329.

**Avant-propos:** Iskren Menkovic a fait la préparation pré-analytique des échantillons, le développement de la méthode d'analyse, le traitement de données et la fragmentation des molécules d'intérêt. Michel Boutin et Iskren Menkovic ont participé à l'élucidation de structures des molécules ciblées. Iskren a également rédigé le manuscrit présenté ci-dessous. Tout le travail réalisé par Iskren a été sous les conseils, les recommandations et la supervision des professeurs Michel Boutin et Christiane Auray-Blais.

**Mise en contexte:** Le but de l'Article 3 était d'identifier de nouveaux biomarqueurs dans une matrice autre que le sang/plasma, soit l'urine. Ainsi, les Articles 2 et 3 ne sont pas directement liés. L'urine est une matrice facilement accessible impliquant des prélèvements non invasifs. Ceci représente donc une opportunité de choix pour l'analyse de biomarqueurs pour différentes maladies pour des fins de diagnostic, de pronostic, de monitoring et de suivi. De plus, considérant la physiopathologie de la maladie, relativement peu d'études se sont intéressées à l'existence des biomarqueurs urinaires pour la maladie de Gaucher. Cette lacune ouvre donc la porte à de nouvelles découvertes. La méthodologie utilisée pour produire cette étude métabolomique est basée sur le développement de la méthode utilisée dans le cadre de l'étude métabolomique dans le plasma (Article 1). Plus précisément, les paramètres en lien avec la méthode chromatographique, la méthode d'analyse par spectrométrie de masse ainsi que le processus de traitement des données utilisées dans le cadre de l'étude métabolomique dans l'urine (Article présenté ci-bas) sont les mêmes que ceux optimisés et utilisés pour l'étude métabolomique dans le plasma.

**Résumé :**

La maladie de Gaucher est une maladie lysosomale causée par une mutation au niveau du gène *GBA1* qui code pour l'enzyme  $\beta$ -glucocérébrosidase. L'incapacité de cette enzyme à dégrader son substrat, le glucosylcéramide, entraîne une accumulation de glycolipides au niveau des tissus et des liquides biologiques. À plus long terme, ces accumulations entraînent d'importantes manifestations cliniques multisystémiques. Au niveau des biomarqueurs, le lyso-Gb<sub>1</sub> plasmatique a su se démarquer par sa spécificité et la corrélation avec la sévérité de la maladie. Cependant, alors que des études métabolomiques se sont intéressées à la découverte de nouveaux biomarqueurs au niveau plasmatique en lien avec la maladie de Gaucher, relativement peu d'études ont considéré l'urine comme une matrice source de biomarqueurs potentiels pour la maladie. Par conséquent, l'objectif principal de cet article était de réaliser une étude métabolomique par spectrométrie de masse en temps de vol couplée à la chromatographie liquide dans le but d'identifier de nouveaux biomarqueurs urinaires pour la maladie de Gaucher. À la suite de l'étape d'analyse et de traitement des données, 14 molécules d'intérêt ont été ciblées comme biomarqueurs potentiels. Des tests de fragmentation ont révélé que ces molécules sont en réalité le lyso-Gb<sub>1</sub> ainsi que les analogues +44, +32, +30, +16 (A et B), +15, +2, -12 et -26 Da de même que les analogues polycycliques 362, 366, 390 et 394 Da. D'ailleurs, les analogues polycycliques du lyso-Gb<sub>1</sub> n'ont jamais été décrits dans la littérature. Les composés identifiés dans le cadre du présent projet semblent variés en fonction de la sévérité de certaines atteintes observables chez les patients Gaucher.

## **Metabolomic study using time-of-flight mass spectrometry reveals novel urinary biomarkers for Gaucher disease type 1**

Iskren Menkovic<sup>1</sup>, Michel Boutin<sup>1</sup>, Abdulfatah Alayoubi<sup>2,3</sup>, Filipa Curado<sup>4</sup>, Peter Bauer<sup>4</sup>, François E. Mercier<sup>2</sup>, and Christiane Auray-Blais<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Medical Genetics, Department of Pediatrics, Centre de Recherche-CHUS, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, CIUSSS de l'Estrie-CHUS, 3001, 12th Avenue North, Sherbrooke, QC J1H 5N4, Canada.

<sup>2</sup>Divisions of Experimental Medicine and Hematology, Department of Medicine, Faculty of Medicine, McGill University, Lady Davis Institute for Medical Research, Jewish General Hospital, 3755, Côte Sainte-Catherine, Montreal, QC H3T 1E2, Canada.

<sup>3</sup>Department of Biochemistry and Molecular Medicine, College of Medicine, Taibah University, University Road, Madinah, 42353, Saudi Arabia.

<sup>4</sup>CENTOGENE GmbH, Am Strande 7, 18055 Rostock, Germany.

### **Abstract**

Gaucher disease is a lysosomal storage disorder resulting from a biallelic mutation in gene *GBA1*, leading to deficiencies in the enzyme  $\beta$ -glucocerebrosidase (Gcase). Inabilities of the Gcase to catabolize its substrate results in the accumulation of sphingolipids in macrophages, which impairs the cell functions and ultimately leads to multisystemic clinical manifestations. Important variability in symptoms and manifestations may lead to challenging diagnosis and patient care. Plasma glucosylsphingosine (lyso-Gb<sub>1</sub>) is a biomarker frequently used for prognosis, monitoring, and patient follow-up. While lyso-Gb<sub>1</sub> appears to be a valid biomarker, few studies have investigated other matrices for potential GD biomarkers were published. Therefore, the main objective of this study was to investigate the urine matrix as a potential source of new GD biomarkers by performing a metabolomic study using time-of-flight mass spectrometry. The secondary objective

involved the structural elucidation of the newly identified biomarkers. Our study highlighted a significant increase of 8 urinary lyso-Gb<sub>1</sub> analogs with chemical modifications on the sphingosine moiety. Our results show a novel class of biomarkers, named polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> analogs, including 4 novel molecules that were identified. These molecules were more elevated than lyso-Gb<sub>1</sub> and related analogs in urine specimens of Gaucher type 1 patients. Further investigations are warranted to validate the efficiency of these newly found biomarkers on a larger cohort of Gaucher patients and to compare them with plasma biomarkers currently quantified in clinical laboratories.

## **Introduction**

Gaucher disease (GD; OMIM 230800) is an inherited lysosomal storage disorder characterized by an impaired glycosphingolipid metabolism [1]. More specifically, biallelic mutations in the *GBA* gene (1q22) lead to an absence or to a functional deficiency of the lysosomal enzyme  $\beta$ -glucocerebrosidase (EC 3.2.1.45), which is involved in the degradation of glucosylceramide [2]. This deficiency results in the accumulation of glucosylceramide in macrophages of numerous tissues namely the spleen, the liver, the bone marrow, and the lungs, ultimately resulting in progressive and multisystemic clinical manifestations [3]. GD patients present a wide spectrum of clinical manifestations where 3 subtypes can be distinguished. GD type 1 is a more attenuated form of the disease and corresponds to approximately 95% of all GD cases [4,5]. Patients can, in some cases, experience mild neurological impairments in addition to bone, hematological, visceral, and occasionally pulmonary complications. GD type 2 refers to acute neuronopathic GD, is the most severe form of the disease, and is associated with an early onset and important neurological impairments [6]. It is generally observed in infancy and tends to progress very rapidly, ultimately resulting in death within the first 2 years of life [7]. In GD type 3, also known as the chronic neuronopathic GD, patients may display neurological impairments, however, the progression of the disease is slower than in type 2 [8].

Treatments such as enzyme replacement therapy (ERT) and substrate reduction (SRT) are available for GD patients [9,10]. Past studies have demonstrated the importance of an early initiation of treatment, when required, to avoid severe and irreversible clinical

manifestations [11,12]. While biomarkers such as chitotriosidase, C-C motif chemokine ligand (CCL18/PARC), angiotensin-converting enzyme (ACE), tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRAP5b), or C-terminal telopeptide of type 1 collagen (CTX) can be used for follow-up, they are not suitable for diagnostic purposes since they are subject to a lack of sensitivity and/or specificity and, in some cases, show variable baseline levels in the general population [13-18]. Unlike the aforementioned biomarkers, glucosylsphingosine (lyso-Gb<sub>1</sub>) is more sensitive and specific to GD [19]. Lyso-Gb<sub>1</sub> studies have demonstrated that its plasma levels correlate with disease severity, and therefore it could be used as a tool for clinicians on the type of approach and/or treatment to favor in specific cases [19-20]. In recent years, plasma lyso-Gb<sub>1</sub> quantitation appears to be accepted as a gold standard among clinicians for the prognostic, monitoring, and follow-up of patients [21]. While plasma lyso-Gb<sub>1</sub> seems to be a valid biomarker, nevertheless and based on our previous experiences, we have hypothesized that there might be reliable GD biomarkers in other biological matrices such as urine. To our knowledge, there are few studies evaluating urine as a possible matrix for GD biomarkers thus, potentially overlooking other biomarkers which might have strong correlations with disease severity and specific clinical manifestations. Moreover, urine holds some advantages over plasma in terms of collection and processing, considering that urine is more accessible and a less invasive matrix to obtain. The main goal of the study was to identify new GD biomarkers in urine by using a metabolomic approach and a ultra-performance liquid chromatography (UPLC) coupled to time-of-flight (TOF) mass spectrometry (MS) technology. The second objective was to elucidate the chemical structures of the targeted biomarkers for eventual quantitation.

## **Experimental Section**

### **Ethics Approval**

This study was approved by the Research Ethics Board (REB) at the Faculty of Medicine and Health Sciences at the Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke (CHUS) under the project ID MP-31-2017-1414. REB at the collaborating center in Montreal also approved the project (REB Project ID MEO-31-2020-1937). Patients recruited in Europe were part of the Lyso-Prove project initiated by Centogene. This latter study was reviewed

and accepted by Universität Rostock REB under project ID A 2015-0025. Informed consent was obtained from all patients and healthy controls included in the study.

### **Sample Collection**

After informed consent was obtained, samples from 15 untreated GD patients were collected (6 males, 9 females, age range: 3 to 71 years old, average age: 47.5 years old). All patients received a diagnosis of GD confirmed by  $\beta$ -glucocerebrosidase deficiency in peripheral blood leukocytes and sequencing of the *GBA* gene. Age- and gender-matched healthy controls were also included in the study (6 males, 9 females, age range: 3 to 72, average age: 51.2 years old). Healthy controls did not have any LSDs or other comorbidities. Urine samples were collected and kept at  $-30^{\circ}\text{C}$  until use.

### **Reagents**

Optima LC/MS grade water, American Chemical Society (ACS) grade ammonium formate, ammonium hydroxide ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ; 28%-30% purity), and o-phosphoric acid ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ; 85%), were purchased from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA). HPLC grade acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH) were obtained from EMD Chemicals Inc. (Darmstadt, Germany) while formic acid (FA; >99%) was purchased from Acros Organics (Morris Plain, NJ, USA). Finally, dimethyl sulfoxide (DMSO) and terfenadine were obtained from Sigma Aldrich (St-Louis, MO, USA).

### **Instrumentation and Parameters**

The analyses were performed using an ACQUITY UPLC coupled to a Synapt G1 from Waters Corp. (Milford, MA). Both instruments were linked via a Rheodyne injection valve model MXP9900-000 from IDEX Health and Science (Oak Harbor, WA). Moreover, a Waster's 515 HPLC Pump was connected to the Synapt G1 to continuously infuse terfenadine, which was used as a lock mass for real-time mass calibration. It should be noted that a T-splitter was used and therefore the actual flow rate of the lock mass was reduced to  $11\ \mu\text{l}/\text{min}$ . Detailed UPLC and MS parameters are presented in Table 1. These



parameters were previously optimized using commercially available standards for lyso-Gb<sub>1</sub> and were successful in identifying novel lyso-Gb<sub>1</sub> analogs in plasma samples [23].

**Table 1.** UPLC-TOF MS parameters for the discovery of novel GD type 1 related metabolites in urine samples

Method Parameters			
UPLC Parameters		TOF-MS Parameters	
Column	Halo HILIC 2.7 (Advanced Materials Technology)	Scan mode	MS-TOF
ID x Length	4.6 × 150 mm	Ionization mode	ESI
Particle size	2.7 μm	Polarity	Positive
Column temperature	30°C	Analyzer mode	V
Weak wash solvent	94.5:2.5:2.5:0.5 ACN:MeOH:H <sub>2</sub> O:FA + 5 mM Amm. Form.	Dynamic range	Extended
Strong wash solvent	ACN	Capillary voltage	1.4 kV
Injection volume	10 μl	Sampling cone voltage	10 V
Injection mode	Partial Loop	Extraction cone voltage	5.0 V
Autosampler temperature	10°C	Source temperature	150°C
Mobile phase A	94.5:2.5:2.5:0.5 ACN:MeOH:H <sub>2</sub> O:FA + 5 mM Amm. Form.	Desolvation temperature	450°C
Mobile phase B	10:89.5:0.5 ACN:H <sub>2</sub> O:FA + 5 mM Amm. Form.	Cone gas flow	30 l/h
Flow rate	0.5 ml/min	Desolvation gas flow	700 l/h
Gradient (% mobile phase B)	0 to 5 min: 0% 5 to 20 min: 0–10% 20 to 25 min: 10% 25 to 35 min: 10–60% 35 to 40 min: 60 40 to 45 min: 0	Trap collision energy	4.0 V
		Transfer collision energy	2.0 V
		Data format	Centroid
		Mass range	50 to 1000 Da
		Scan time	0.1 s
		Scan mode	MS-TOF
		<b>Lock Mass Parameters</b>	
Compound		Terfenadine (12.5 nM)	
Exact Mass		472.3215 Da	
Solvent		94.5:5:0.5 H <sub>2</sub> O:ACN:FA	
Scan Time		0.5 s	
Interval		5.0 s	
Sampling Cone Voltage		5 V	
Trap Collision Energy		10 V	
Mass Window		+/- 0.2 Da	
Scan Average		3	
Flow rate		11 μl/min	

## Sample Preparation

Considering that urine samples are subject to a marked concentration variability, it was important to normalize the specimens so that metabolites detected could be compared on the same basis. Creatinine was chosen to overcome the variability caused by urine concentration [24]. Indeed, before proceeding with the metabolomic study, creatinine was measured in all samples using a methodology previously described [25]. Once creatinine concentration levels were assessed, the volume of each urine sample analyzed for the metabolomic study was normalized to obtain a creatinine concentration corresponding to 10 mM for 500  $\mu$ l of urine. Therefore, the actual used volume per sample analyzed ranged from 250 to 1250  $\mu$ l. Once normalized, samples were purified using 3 CC 60 mg Oasis mixed-mode strong cation exchange (MCX, Waters Corp.) solid-phase extraction cartridges. Briefly, 1000  $\mu$ l of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2% in water and 1000  $\mu$ l of MeOH were added to a 500  $\mu$ l of urine sample. As previously mentioned, the amount of urine used for each sample may vary based on the concentration. The amount of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2% in water and MeOH added was adjusted accordingly. This mixture was then loaded onto an MCX column previously conditioned with 2 ml of MeOH and 2 ml of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2%, respectively. Samples were then washed using 2 ml of a 2% formic acid solution prepared in H<sub>2</sub>O and 2 ml of a 0.2% FA solution prepared in MeOH. Following wash steps, samples were eluted in a separate glass tube with 1 ml of a 2% NH<sub>4</sub>OH solution in MeOH. Ultimately, eluted samples were evaporated to dryness under a nitrogen stream and resuspended in 100  $\mu$ l of a 80:20 mobile phase A:DMSO solution. Ten  $\mu$ l were injected into the UPLC-TOF-MS system for analysis. QC samples were prepared by sampling 10  $\mu$ l from each sample (patient and control) and pooling it into 1 single sample. This QC sample was injected periodically during the study to assess the system stability throughout the study.

## Data Processing

Thirty samples were analyzed for this metabolomic study (15 GD type 1 patient samples, 15 healthy controls samples). The QC sample was also injected 15 times throughout the analytical sequence. The data obtained were processed by MarkerLynx XS (Waters Corp.). The software was used to align metabolites detected based on their respective mass to

charge ratio ( $m/z$ ) and chromatographic retention times. The individual parameters used for data alignment, mass range, intensity threshold, and mass window were set at 50-1000 Da, 5 counts, and 0.05 Da, respectively. The retention time window was set 0.2 min. Data processing was performed between 5 – 45 min. Upon data alignment with MarkerLynx XS software, the resulting data were then transferred to EZInfo software (Umeå, Sweden) for multivariate statistical analysis. Using lyso-Gb<sub>1</sub> as a positive control, it was established that the unit variance scaling ( $UV = \frac{x - \bar{x}}{SD}$ ) with logarithmic transformation would provide optimal results. In this mathematical formula,  $x$  represents the area under the curve for a single mass spectrometry peak in a specific sample. Whereas  $\bar{x}$  and SD represent the average area under the curve and the standard deviation for the areas under the curve corresponding to the same mass spectrometry peak in all samples. This type of scaling is typically used to increase the statistical contribution of compounds of lesser concentration while reducing the heteroscedasticity in data processed [26]. An assessment of the system stability was performed via a principal component analysis (PCA). Markers expressed differentially in the GD sample group and healthy control sample group were highlighted and then individually visualized via orthogonal partial least square-discriminant analysis (OPLS-DA) and S-plot analysis.

### **System Stability Assessment**

System stability was evaluated using a PCA score plot and a QC sample injected 15 times throughout the metabolomic study. Considering that the QC replicates are in fact only one sample prepared by pooling a defined volume of each sample analyzed, it is expected that they remain relatively close and centered on the PCA score plot. Results obtained confirmed that the system was stable for the duration of the study. Therefore, any variability observed between the different samples analyzed is related to biological factors rather than instrumental factors.

### **Structural Identification of Potential GD Biomarkers**

Metabolites deemed to be potential GD biomarkers by data provided by the S-plot and the trendplot were structurally identified by fragmentation tests and accurate mass

measurements. These analyses were performed on the same system as the metabolomic study. Briefly, precursor ions were isolated in the quadrupole, fragmented into the collision trap using an appropriate collision ramp energy, and accurate masses of resulting compounds were measured using a time-of-flight mass analyzer. UPLC and MS parameters were the same as the ones presented in Table 1.

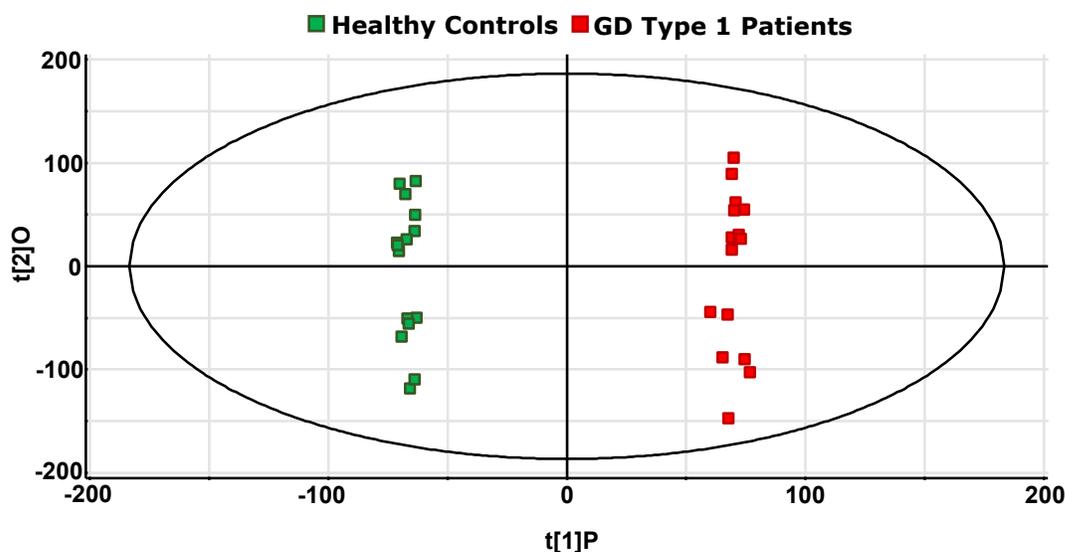
## **Results and Discussion**

### **Chromatographic Separation of Glucosyl- and Galactosylsphingosine Isomers**

The chromatographic separation method used for this study was developed to efficiently separate lyso-Gb<sub>1</sub> from its structural isomer galactosylsphingosine (psychosine). Considering that psychosine levels are increased in Krabbe disease [23], which is another sphingolipidosis, it was important to be able to adequately separate these compounds. As shown in Figure S-1, the method described herein achieved this goal, allowing the use of the retention time as an indicator when fragmentation tests were inconclusive (i.e., 2 molecules with identical fragmentation profiles).

### **Data Processing and Multivariate Statistical Analyses**

Following the data alignment step with the MarkerLynx software, a total of 129 181 markers (mass spectrometry peaks) were observed in the samples analyzed. An OPLS-DA score plot was then used to separate the 2 groups under investigation (healthy controls and GD type 1 patients) based on the biochemical composition of their samples. As shown in Figure 1, a clear separation between the 2 groups was achieved. This suggests the presence of specific markers in samples that allow to clearly separate GD type 1 patients from healthy controls in the cohorts under study.

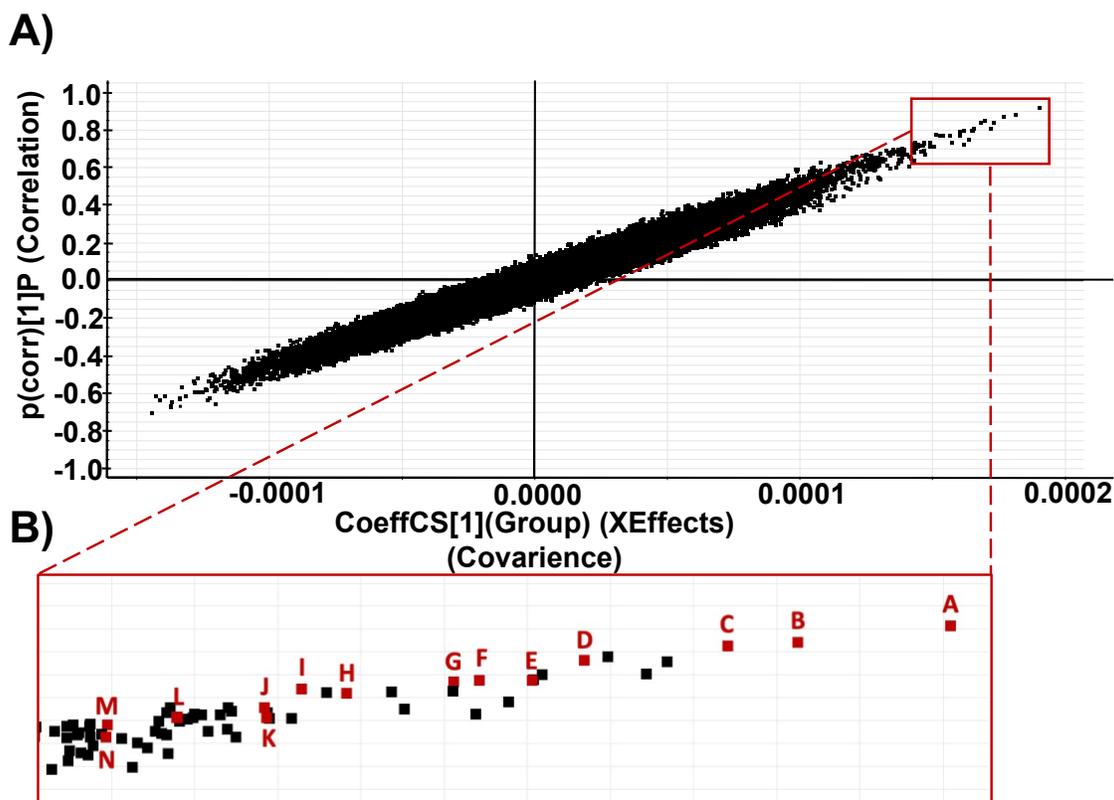


**Figure 1.** Orthogonal partial least square-discriminant analysis (OPLS-DA) score plot obtained following the analysis of GD patient samples ( $n = 15$ ) and age- and gender-matched healthy controls ( $n = 15$ ). The ellipse corresponds to the Hotelling T2 range with a significance level of  $p = 0.05$ .

There were no outliers in any of the 2 study groups since no samples were plotted outside the Hotelling T2 range with a significance level of  $p = 0.05$ . Therefore, all patients and healthy controls initially included in the study were taken into consideration for the entire duration of the study. The separation between the two groups indicates that it is possible to discriminate them based on the composition of their samples.

An S-plot was used to visualize which markers contributed most to the separation of healthy controls and GD patients observed in the OPLS-DA score plot. Typically, markers located at the extremities have the highest separation power. In this study, markers observed in the upper right corner of the S-plot are markers that are increased in the GD patient group compared to the healthy control group while markers located on the opposite side (lower left corner) are increased in the healthy control group compared to the GD type 1 group. While both sides were investigated for potential GD biomarkers, all compounds deemed of interest were in the upper right corner of the S-plot (Figure 2A and Figure 2B). More specifically, selection criteria for potential biomarkers were: 1) more abundant in one group compared to the other (Gaucher or control samples) and detected in at least 50% of

the samples from the same group; and 2) detected in samples from different collection sites



**Figure 2.** A) S-plot indicating the correlation in function of the covariance for the metabolites used to differentiate GD patients as well as age- and gender-matched healthy controls. B) Zoom of the region of interest, with exact positions of potential GD biomarkers with experimental  $m/z$  394.2062 (A), 366.1752 (B), 464.2867 (C), 478.3006 (D), 362.1800 (E), 492.3159 (F), 390.2114 (G), 450.3007 (H), 494.3312 (I), 436.2503 (J), 462.3422 (K), 476.3199 (L), 478.3357 (M), 506.3300 (N) indicated by red squares.

Based on their respective position on the S-plot and maker distribution visualized using trendplot charts (Figure S-2), markers were selected and deemed as potential GD biomarkers. For these 15 markers with  $m/z$  of 362.1800, 366.1752, 390.2114, 394.2062, 436.2503, 450.3007, 462.3422, 464.2867, 476.3202, 478.3006, 478.3357, 492.3159, 494.3312, and 506.3300 fragmentation tests using parameters previously described were done to elucidate their structure.

### Structural Identification of Potential Novel GD Biomarkers

Biomarker with  $m/z$  462.3422 was confirmed to be lyso-Gb<sub>1</sub> based on the fragmentation pattern and its relative retention time [23] (Figure S-3A). In addition to the molecular ion, the fragment corresponding to the loss of one water molecule ( $m/z$  444), the loss of the sugar unit ( $m/z$  300), and the following losses of one ( $m/z$  282) and two ( $m/z$  264) water molecules. Moreover, markers with  $m/z$  506, 494, 492, 478, 476, 464, 462, 450, and 436 showed a fragmentation pattern similar to the one obtained for lyso-Gb<sub>1</sub> (Figure S-3B to J). Based on the exact mass and fragmentation patterns, these markers are believed to be lyso-Gb<sub>1</sub> analogs with modifications on the sphingosine moiety (Table 2).

**Table 2.** Lyso-Gb<sub>1</sub> analogs flagged as potential biomarkers in urine for Gaucher disease

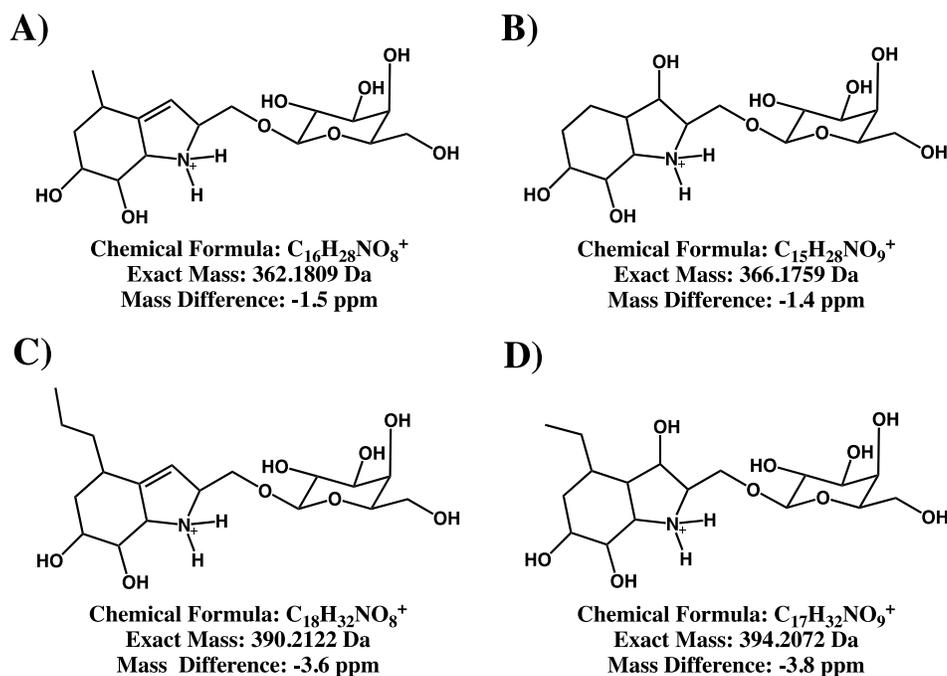
Metabolites	Retention Time (min)	Accurate Mass Measured (DA)	Structural Modification*	Theoretical Mass Difference (ppm)
Analog +44 Da	26.25	506.3300	+C +2O	-5.7
Analog +32 Da	30.21	494.3321	+2O	-1.6
Analog +30 Da	27.92	492.3159	-2H + 2O	-2.8
Analog +16 Da (A)	27.68	478.3388	+O	-1.7
Analog +16 Da (B)	27.04	478.3006	-C -4H +2O	-2.1
Analog +14 Da	26.81	476.3199	-2H +O	3.1
Analog +2 Da	29.30	464.2867	-2C -6H +2O	1.5
Analog -12 Da	29.80	450.3007	-2C -4H +O	-13.3
Analog -26 Da	30.04	436.2503	-4C -10H +2O	-10.1

\*Refers to changes on the sphingosine moiety from the lyso-Gb<sub>1</sub> structure. Only the overall elemental composition differences with lyso-Gb<sub>1</sub> are indicated.

It is noteworthy to mention that analogs +44, +32, +30, +2, and -26 Da have never been previously mentioned in the literature and they were not detected in plasma. Indeed, a metabolomic study recently done by our research group identified 4 analogs in plasma samples namely lyso-Gb<sub>1</sub> analogs +18, -2, and -28 Da [23]. These 4 analogs were not found

amongst the top markers in the S-plot. Based on these results and the data from the metabolomic study done in plasma by our group, we would like to emphasize that marked differences were observed in the biomarker profile between the urine and plasma matrices of GD patients.

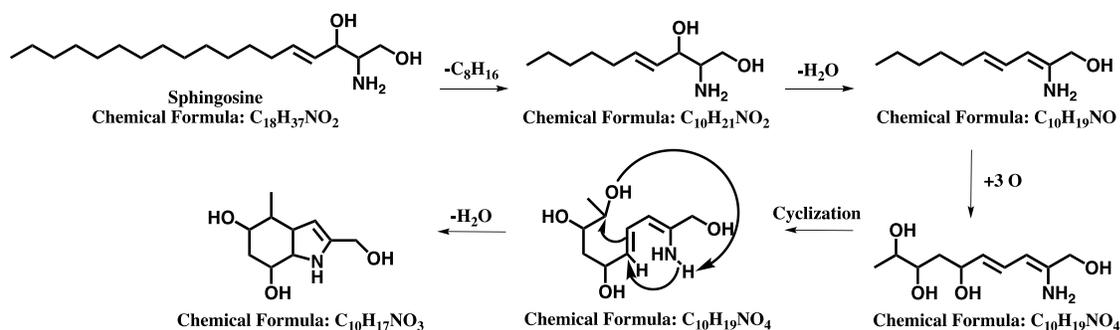
Moreover, potential biomarkers with  $m/z$  362, 366, 390, and 394 had a completely different fragmentation pattern than lyso-Gb<sub>1</sub> suggesting a discovery of a novel class of biomarkers for GD (Figure S-4A-D). Based on the results obtained during fragmentation tests, we have hypothesized that metabolites with  $m/z$  362.1800, 366.1752, and 390.2114 might be the molecules shown in Figure 3. For these potential biomarkers, according to the number of unsaturations and dehydrations observed in the fragmentation spectrum for the structure linked to the sugar unit, we believe that a cyclization is likely. To further support this statement, fragmentation mechanisms (Figures S-5 to S-9) are proposed for most of the peaks detected on the fragmentation spectrum of these molecules (Figure S-4A-D).



**Figure 3.** Proposed structures for polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> analogs 362 Da (A), 366 Da (B), 390 Da (C), and 394 Da (D). The structure propositions for these metabolites are based on their fragmentation profiles (Figure S5-8) obtained with accurate mass measurements.



We have hypothesized that these 4 novel biomarker candidates may be related to sphingosine and “traditional” lyso-Gb<sub>1</sub> analogs as shown in Figure 4.



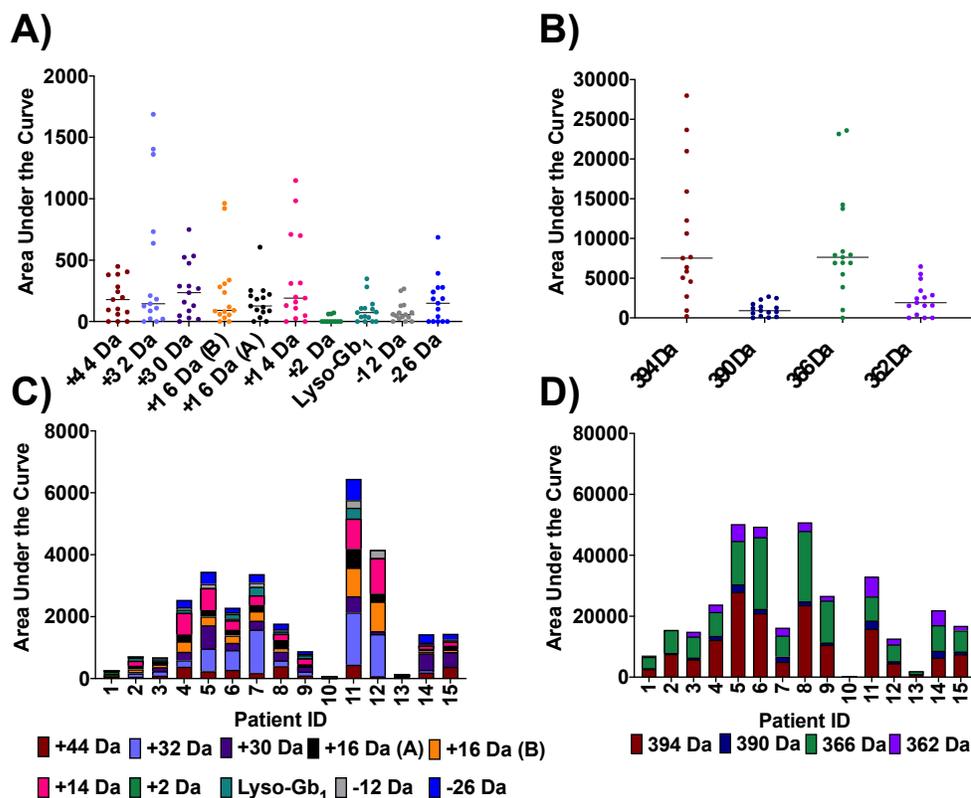
**Figure 4.** Potential link between sphingosine and newly identified metabolites based on addition and removal of chemical groups previously observed for lyso-Gb<sub>1</sub> analogs.

Upon considering traditional lyso-Gb<sub>1</sub> analogs, a loss of a pair number of carbon and twice the amount of hydrogen is not unusual. Moreover, the addition of OH groups on the sphingosine has been frequently observed in lyso-Gb<sub>1</sub> analogs, as well as lyso-Gb<sub>3</sub> in Fabry disease patients [25,27]. To our knowledge, this novel class of potential biomarkers has never been reported in the literature. We thus suggest the name “Polycyclic Lyso-Gb<sub>1</sub> Analog X” where X refers to the *mass* of the specific molecule in Da. The clinical significance of this novel group of potential biomarkers and the biological processes involved in their metabolism will be further investigated in future studies.

### Potential Biomarker Distribution in GD Type 1 Patients and Healthy Controls

All potential biomarkers highlighted in this study were not observed in healthy controls. Based on these preliminary results and as shown in Figure 5, it appears that polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> analogs 362, 366, 390, and 394 Da Da have a higher signal than lyso-Gb<sub>1</sub> or related analogs in samples analyzed during this metabolomic study. Indeed, the area under the curve for polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> analogs appear to be over 10 times higher than lyso-Gb<sub>1</sub> and related analogs as shown in Figure 5 C) and D). However, since no commercial standard is available for these molecules, we do not know if their higher signals are due to higher concentrations and/or higher response factors due to increased basicity. Indeed, the

presence of a secondary amine (Figure 4, structures A to D)) in their structure increases their basicity, but the resonance with a double bond (Figure 4, structures A and C) decreases it.



**Figure 5.** Distributions of: A) lyso-Gb<sub>1</sub> and related analogs in GD type 1 patients; B) polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> analogs in GD type 1 patients. Cumulative potential biomarker areas under the curve for the different GD patients are shown in: C) for lyso-Gb<sub>1</sub> and related analogs; D) for polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> analogs. The mean level for each biomarker is indicated by a horizontal bar in A) and B).

These results suggest that this novel class of potential biomarkers may be more sensitive biomarkers for GD than lyso-Gb<sub>1</sub> itself in urine specimens. Indeed, polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> analogs 366 and 394 were by far those having the highest signals of all potential biomarkers highlighted in this study. These were followed by polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> analogs 362 and 390. These 4 markers found to have higher signals than lyso-Gb<sub>1</sub> and related analogs in all targeted patients considered for this study. Moreover, our preliminary data in urine

suggests that patients affected by a more severe form of GD had higher levels of polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> analogs than patients who had a more attenuated form of the disease. Indeed, as shown in Table S-5, patient 10 had a more attenuated form of the disease than patient 9 while patient 11 had the most severe clinical manifestations based on the bone marrow burden score [28]. As expected, in these 3 patients, the highest concentrations of polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> analogs were observed in patient 11, followed by patient 9, and ultimately patient 10 where his biomarker levels were below the limit of quantitation. A larger cohort of GD patients is necessary to truly evaluate if polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> analogs correlate with disease severity, and if so, to what extent. Moreover, further comparisons between plasma lyso-Gb<sub>1</sub> and urinary polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> analogs are warranted to fully understand the relevance of these novel potential GD biomarkers in comparison to lyso-Gb<sub>1</sub>. Considering that this study was limited to untreated GD patients, the reliability of these potential biomarkers in correlation with treatment has yet to be investigated. A study involving pathological controls with closely affected metabolic pathways will be part of our future studies to assess the specificity of lyso-Gb<sub>1</sub> analogs in GD.

Regarding lyso-Gb<sub>1</sub> and related analogs in urine, it was observed that several lyso-Gb<sub>1</sub> analogs are more elevated than lyso-Gb<sub>1</sub> itself. Based on the mean concentration measured in all GD patients included in this study, lyso-Gb<sub>1</sub> analogs +44, +32, +30, +16 (A) and (B), +14, and -26 Da appear to be more abundant than lyso-Gb<sub>1</sub> in urine specimens (Figure 6). This emphasizes an important contrast with lyso-Gb<sub>1</sub> and related analogs in plasma samples where lyso-Gb<sub>1</sub> itself represents 90-95% of the total lyso-Gb<sub>1</sub> content (analog included) [23]. While the clinical importance of urinary lyso-Gb<sub>1</sub> remains to be investigated, the distribution profile of lyso-Gb<sub>1</sub> analogs in urine strongly supports the use of a panel of biomarkers rather than a single molecule for optimal sensitivity. Our preliminary results suggest that similar to plasma lyso-Gb<sub>1</sub>, urinary lyso-Gb<sub>1</sub> and related analogs appear somewhat correlated with the severity of the disease, with patients more severely affected presenting higher levels of lyso-Gb<sub>1</sub> and related analogs than those with a more attenuated form. While the GD cohort selected for this study is too small to investigate correlations between clinical manifestations and novel lyso-Gb<sub>1</sub> analogs and or polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> analogs, it would be important to evaluate correlations between these

novel potential GD biomarkers with specific clinical manifestations of the disease. Also, lyso-Gb<sub>1</sub> and related analogs, as well as polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> analogs were not detected in healthy controls. Since no pathological controls and/or treated GD patients were evaluated in this study, it is not possible at this time to discuss the specificity and/or suitability regarding the follow-up of these new potential biomarkers in GD patients.

## Conclusions

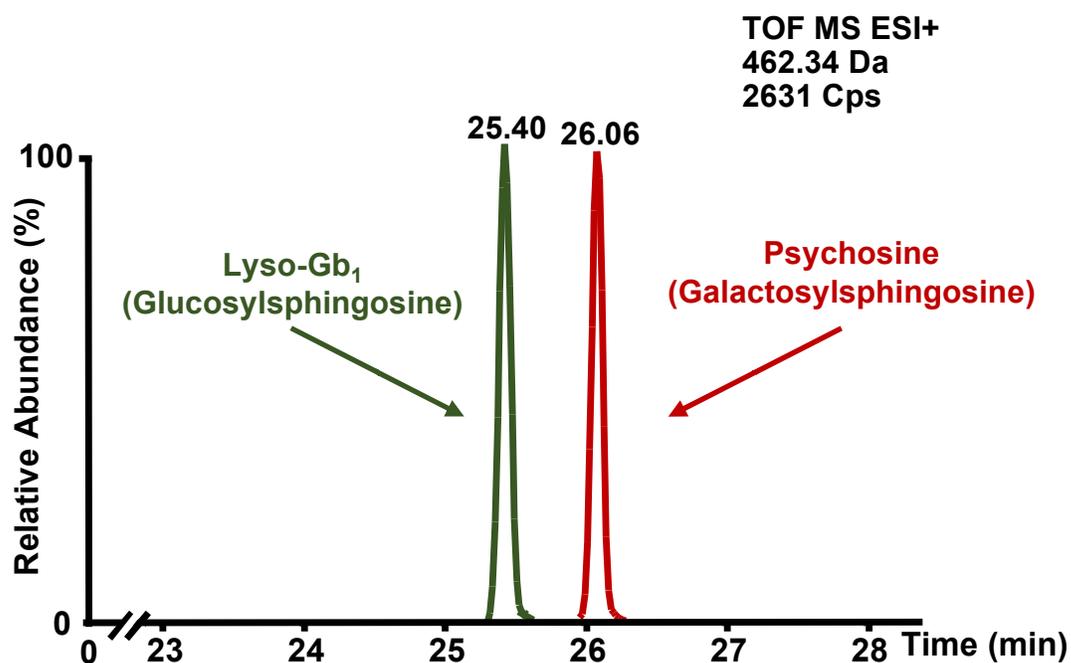
This metabolomic study highlighted 14 compounds increased in urine specimens of GD patients. While some of these molecules such as lyso-Gb<sub>1</sub> and lyso-Gb<sub>1</sub> analogs +16 Da, -12 Da, and -28 Da were already mentioned in the literature, this study revealed 4 new lyso-Gb<sub>1</sub> analogs, namely the analogs +40 Da, +32 Da, +30 Da, and +2 Da. Additionally, the current study and a previous one done by our research group revealed marked differences for lyso-Gb<sub>1</sub> and related analog profiles in plasma and urine. A promising novel class of potential urinary biomarkers has been identified. For all these molecules, a chemical structure has been proposed based on fragmentation patterns and accurate mass measurements. The S-plot revealed that these potential urine biomarkers, namely polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> analogs 362, 366, 390, and 394 Da had a stronger separation power than lyso-Gb<sub>1</sub> or previously known analogs to differentiate healthy controls from untreated GD patient samples.

Preliminary results suggest that all these potential urinary biomarkers appear to be correlated with the severity of the disease since patients more severely affected by GD have higher levels of biomarkers. Future perspective studies will involve the analysis of all compounds highlighted during this study in a larger cohort of GD patients to confirm their utility and reliability as GD biomarkers and to evaluate correlations with disease severity and progression. Pathological controls, as well as treated GD patients, will also be included to evaluate the specificity of these markers and the response to treatment.

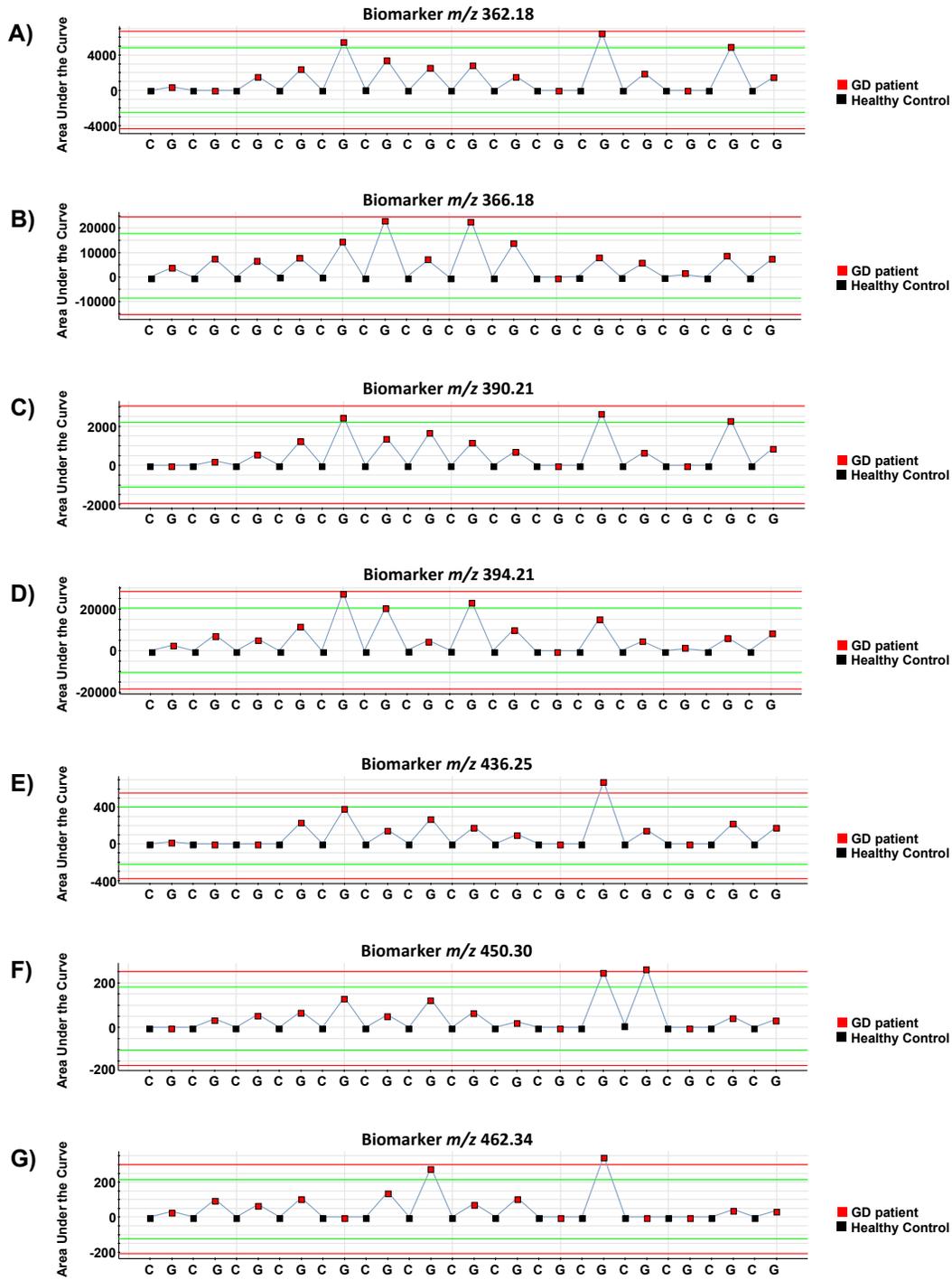
## Acknowledgment

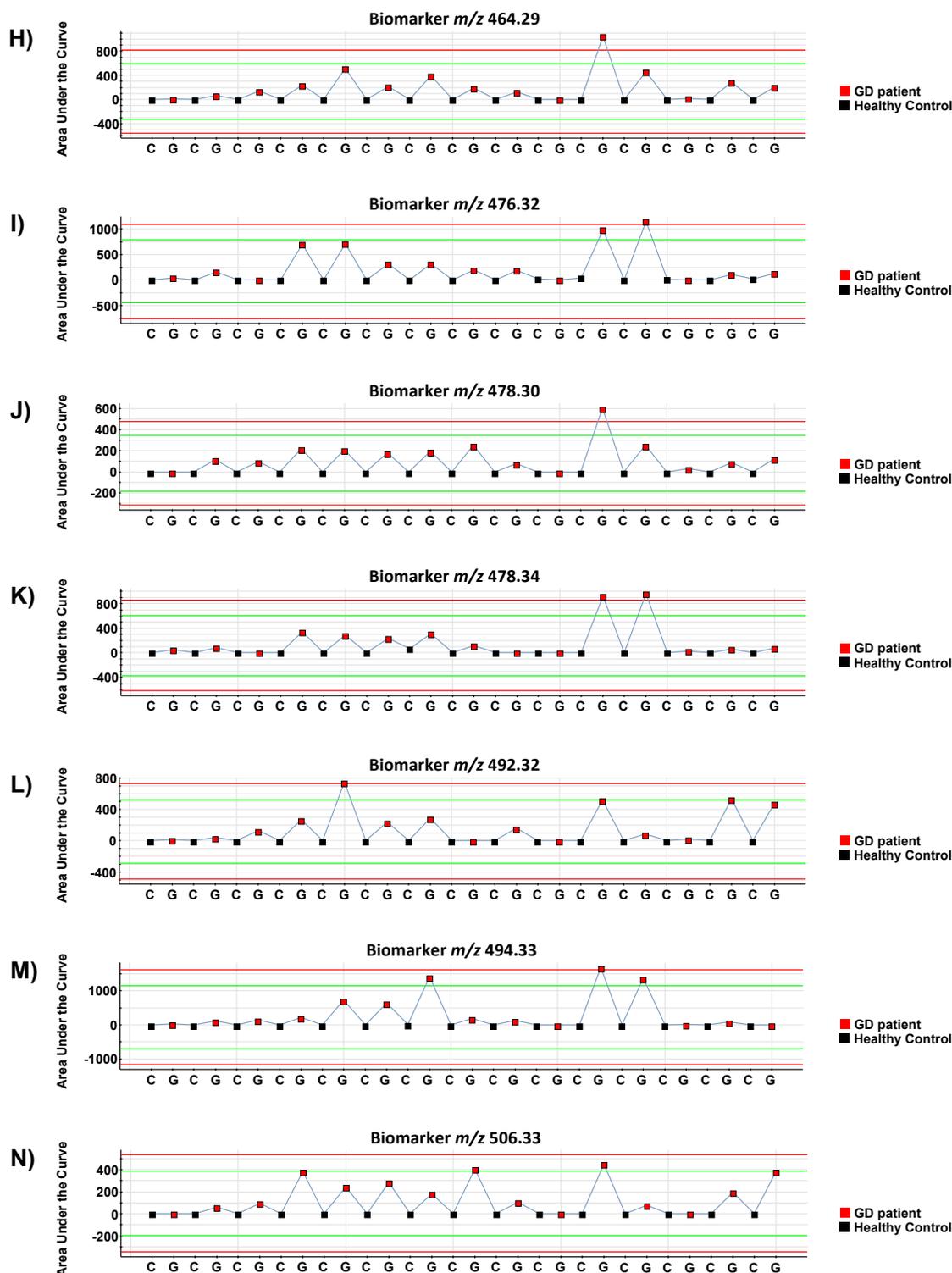
We are thankful to Shire/Takeda Pharmaceutical for funding this research project under a collaborative research agreement. We would also like to acknowledge the Faculty of Medicine and Health Sciences at the Université de Sherbrooke for a doctoral student grant provided to Iskren Menkovic. We would also like to thank Waters Corporation for their constant support and technical expertise throughout this project.

## Supporting Information

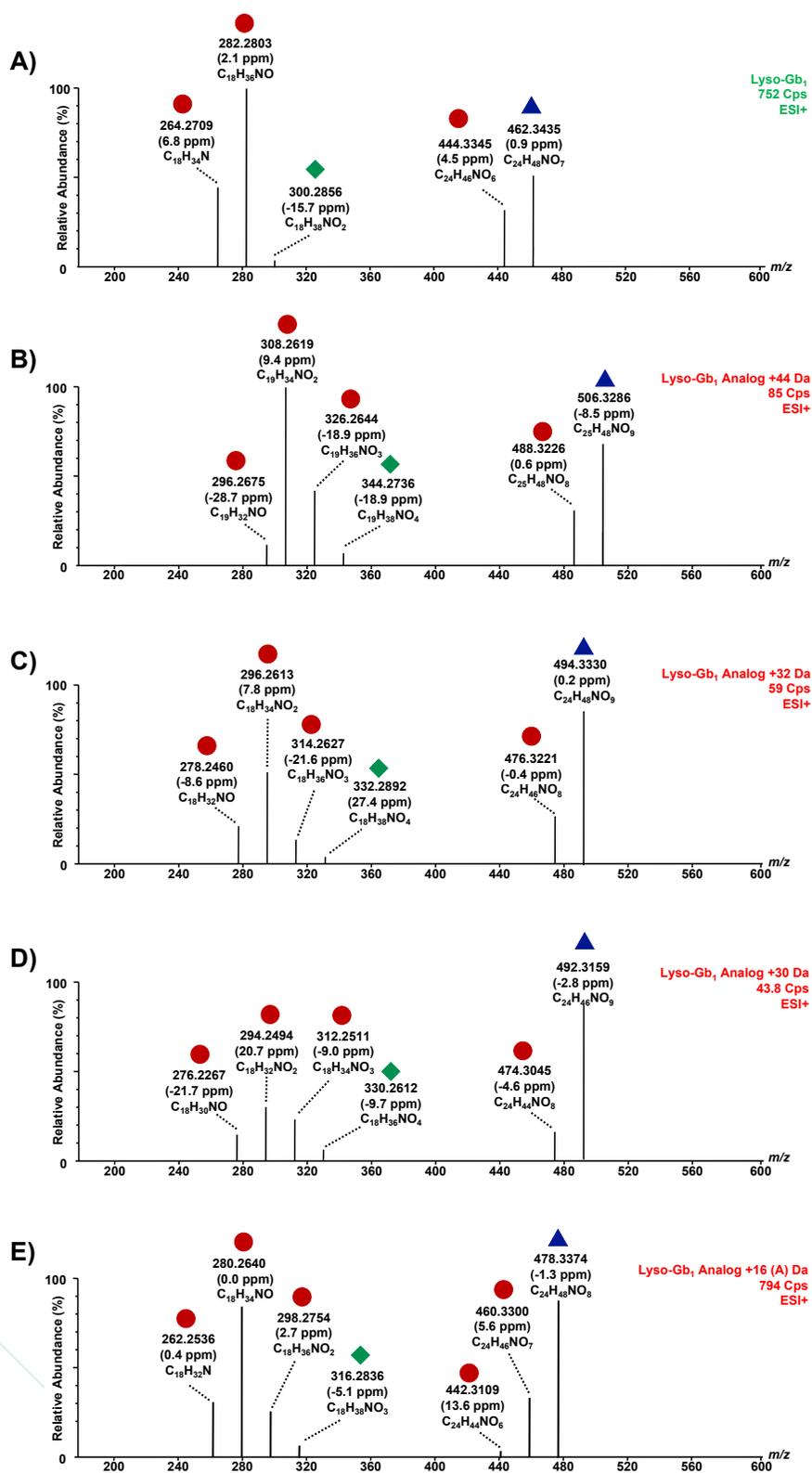


**Figure S-1.** Chromatographic separation of lyso-Gb<sub>1</sub> (5  $\mu$ g on column, retention time: 25.40 min) and psychosine (5  $\mu$ g on column, retention time: 26.06 min) commercial standards analyzed by time-of-flight mass spectrometry (MS-TOF) using positive electrospray ionization (ESI+).

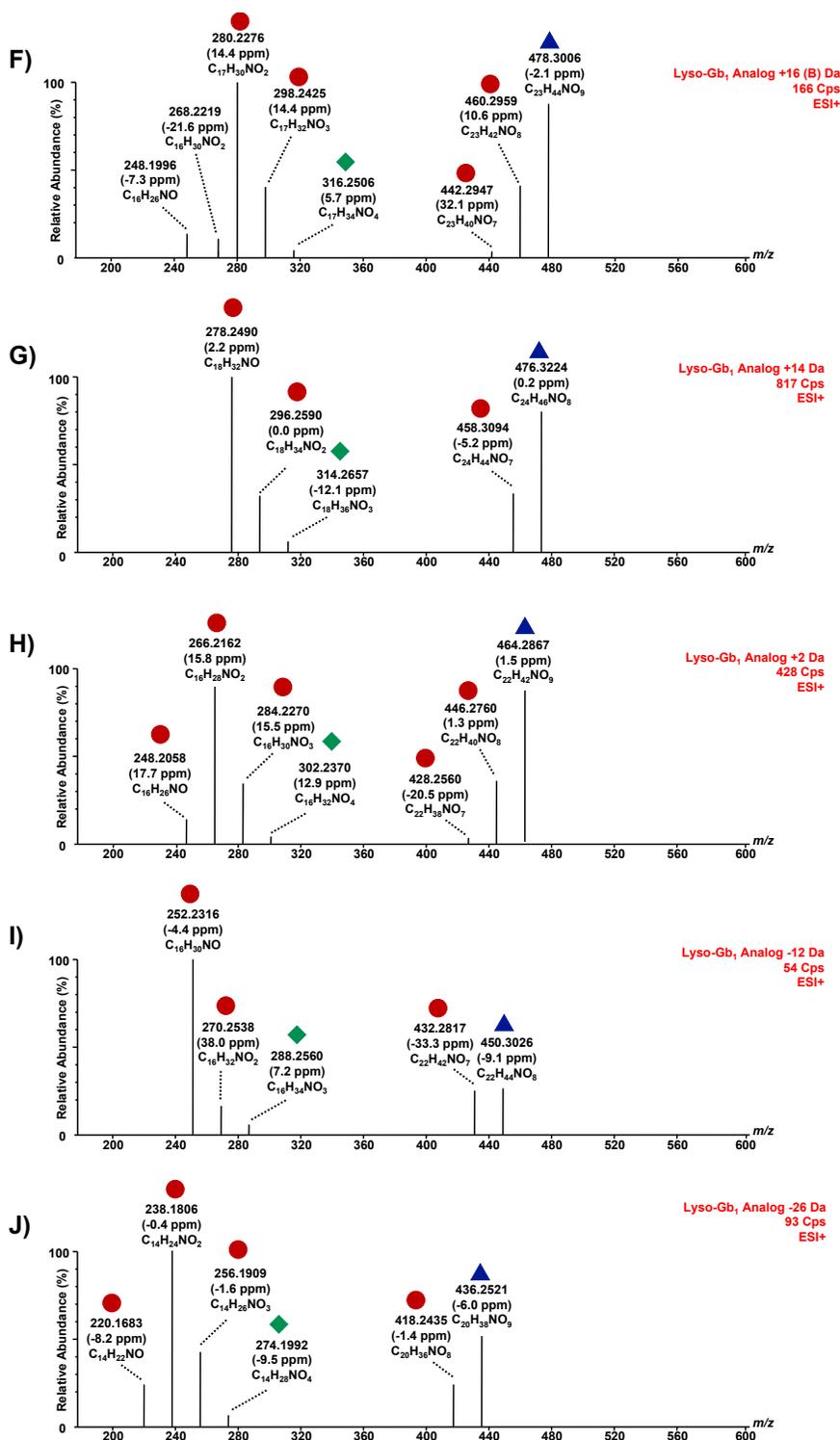




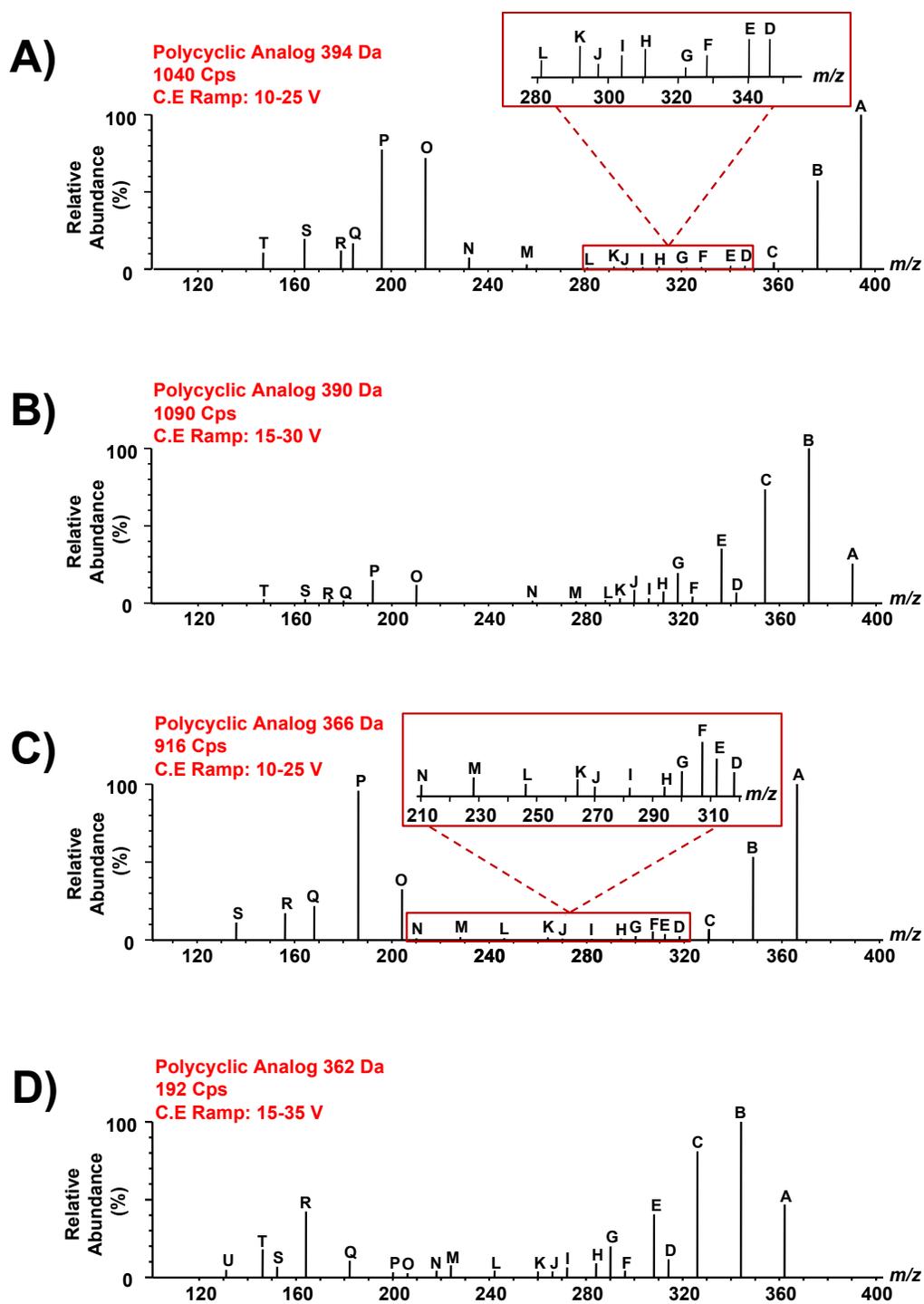
**Figure S-2.** Trendplots charts for potential biomarkers with  $m/z$  A) 362.18, B) 366.18, C) 390.21, D) 394.21, E) 436.25, F) 450.30, G) 462.34, H) 464.29, I) 476.32, J) 478.30, K) 478.34, L) 492.32, M) 494.33, and N) 506.33 Da highlighted during this metabolomic study. Decision to further investigate potential biomarkers was based on the trendplot chart distribution of the metabolites.



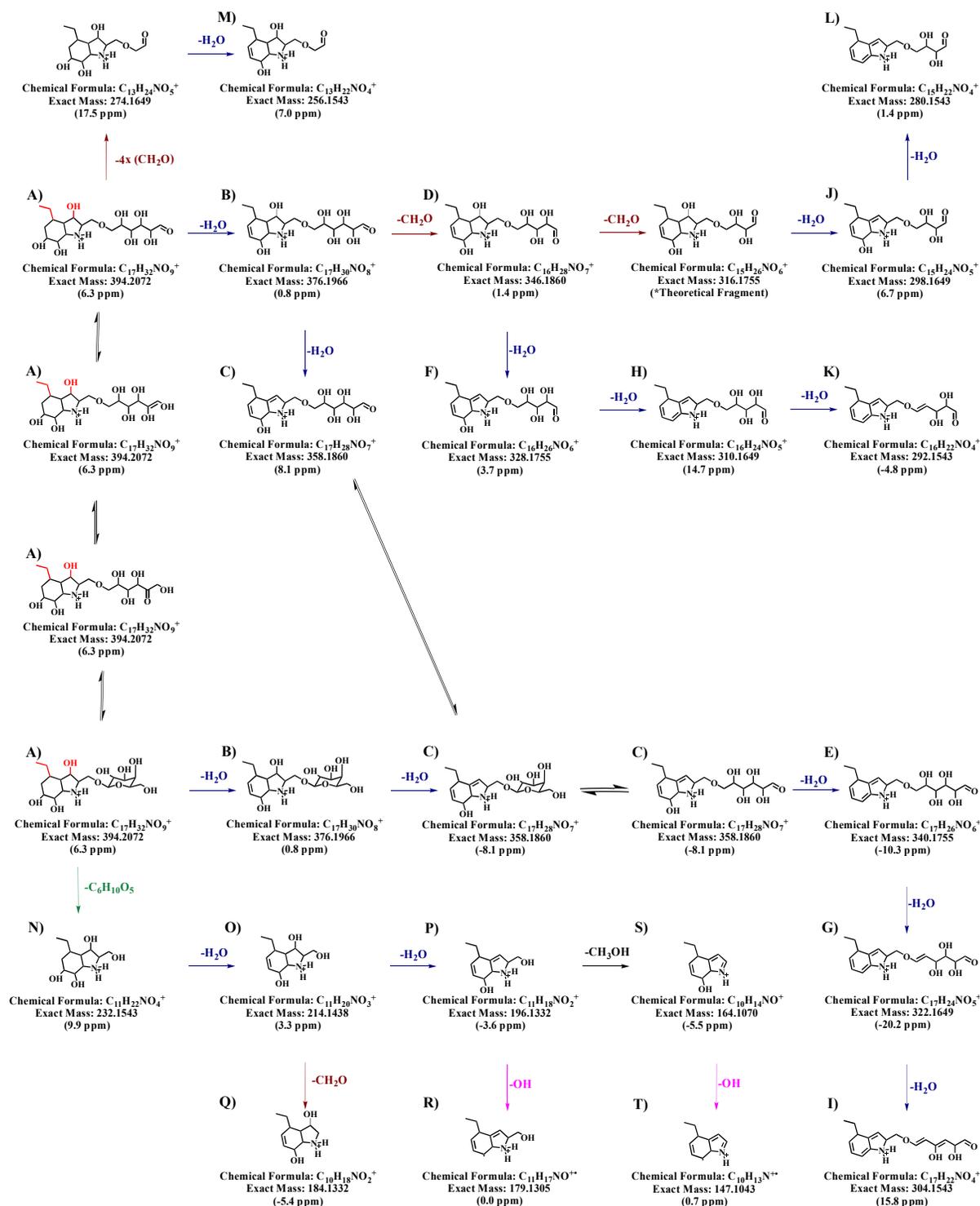




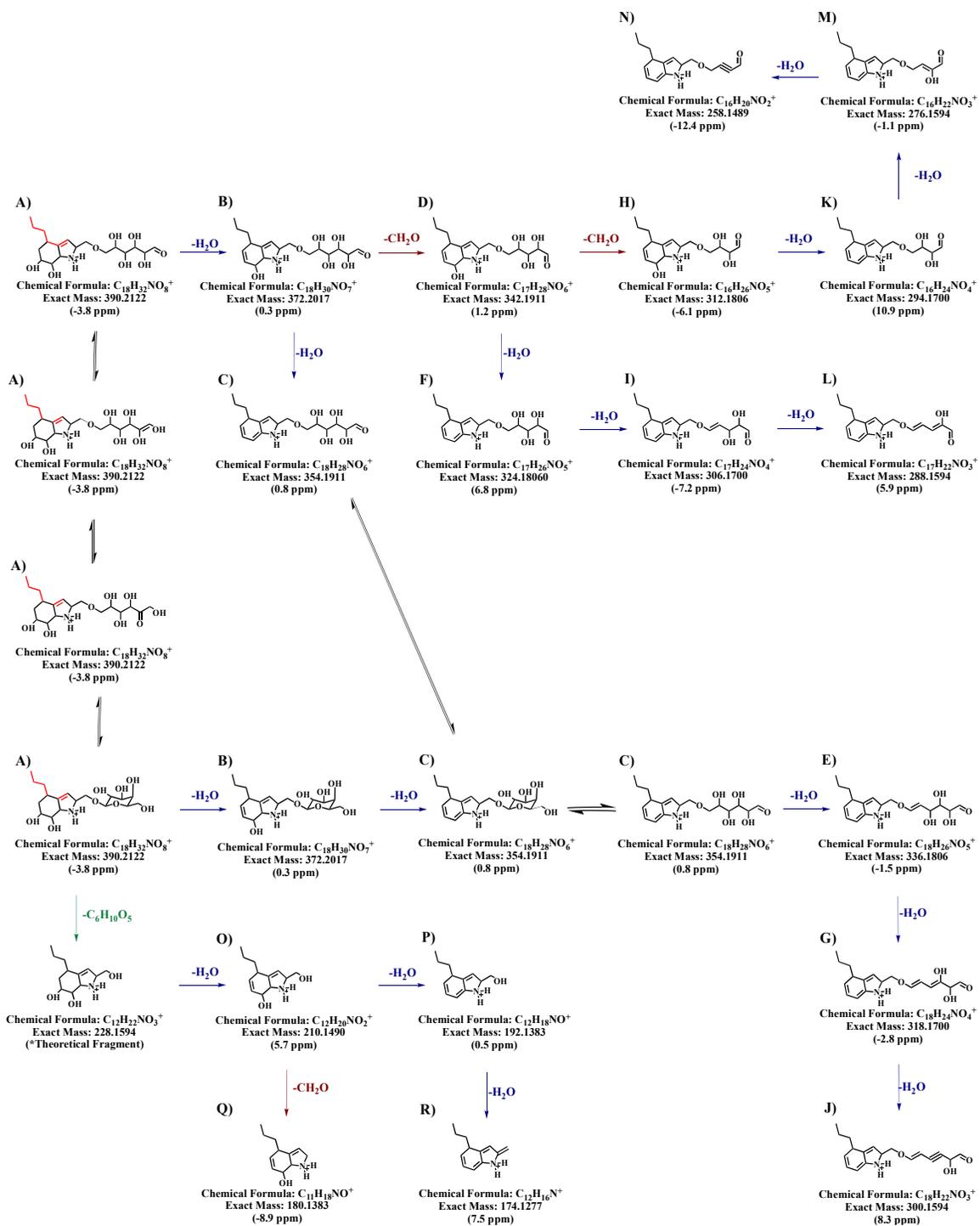
**Figure S-3.** Fragmentation profile results for A) lyso-Gb<sub>1</sub> as well as the analogs with *m/z* B) 506.3300, C) 494.3312, D) 492.3159, E) 478.3388, F) 478.3006, G) 476.3199, H) 464.2867, I) 450.3007, and J) 436.2503. A collision energy ramp of 10-25 V was used for all analogs. Blue triangle indicates the molecular ion, red circle indicated a loss of a water molecule (H<sub>2</sub>O; -18 Da) and a green diamond indicates a loss of a sugar unit (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>; -162 Da).



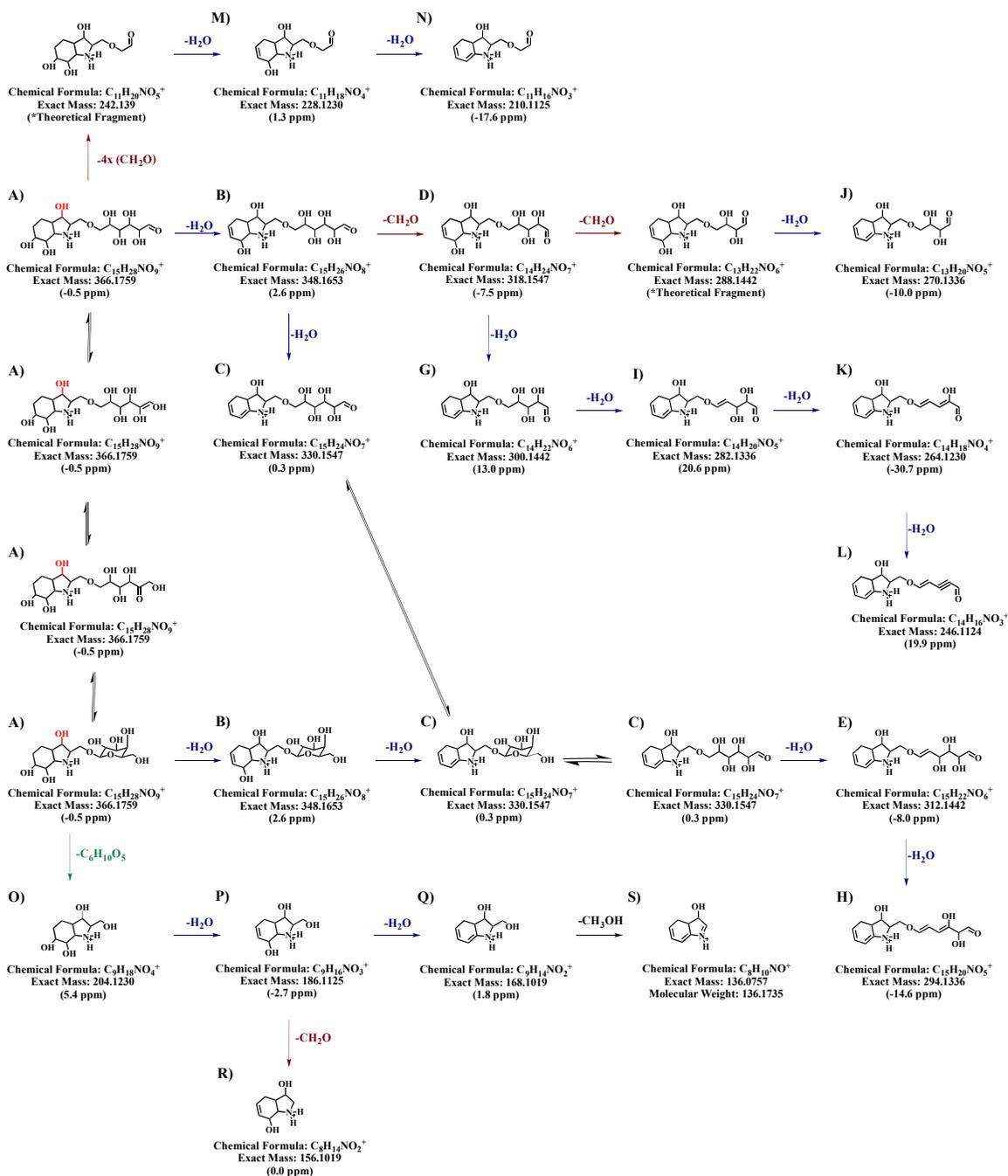
**Figure S-4.** Fragmentation test results for compounds with  $m/z$  A) 394.2062, B) 390.2114, C) 366.1750, and D) 362.1800. The collision energy ramp (C.E. Ramp) in volts (V) used for each metabolite is indicated in red with the number of counts per second (Cps). The experimental masses obtained for each fragment and their attributions are shown in Tables S-1-4.



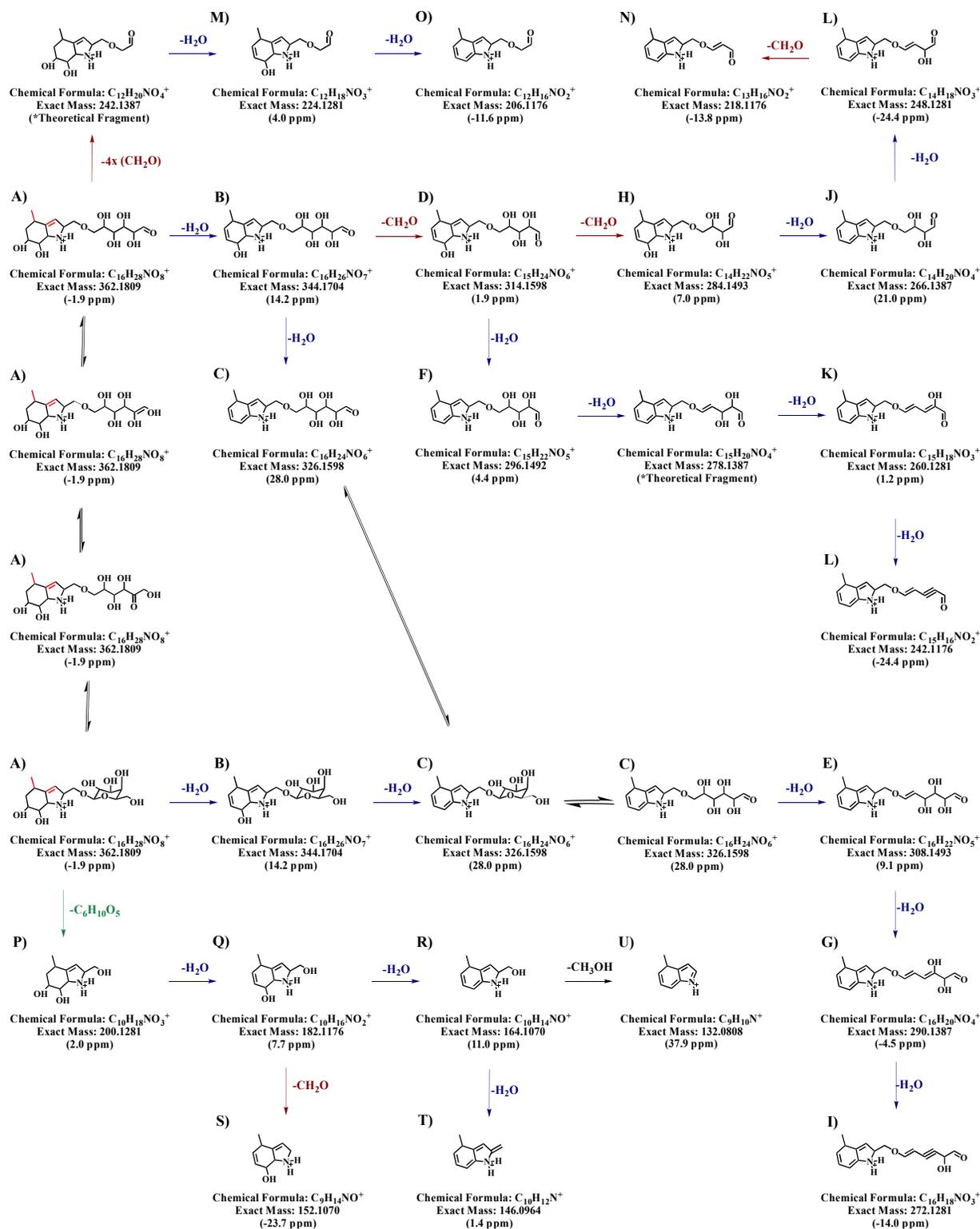
**Figure S-5.** Proposed fragmentation mechanism for polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> analog 394 with theoretical masses and measured mass errors in part per million (ppm). Accurate mass measured are shown in Table S-1 and fragmentation profile is shown in Figure S-4A. Structural differences between the molecular ions of the 4 polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> analogs are shown in red (see A).



**Figure S-6.** Proposed fragmentation mechanism for polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> analog 390 with theoretical masses and measured mass errors in part per million (ppm). Accurate mass measured are shown in Table S-2 and fragmentation profile is shown in Figure S-4B. Structural differences between the molecular ions of the 4 polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> analogs are shown in red (see A).



**Figure S-7.** Proposed fragmentation mechanism for polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> analog 366 with theoretical masses and measured mass errors in part per million (ppm). Accurate mass measured are shown in Table S-3 and fragmentation profile is shown in Figure S-4C. Structural differences between the molecular ions of the 4 polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> analogs are shown in red (see A).



**Figure S-8.** Proposed fragmentation mechanism for polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> analog 362 with theoretical masses and measured mass errors in part per million (ppm). Accurate masses are shown in Table S-4 and fragmentation profile is shown in Figure S-4D. Structural differences between the molecular ions of the 4 polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> analogs are shown in red (see A).

**Table S-1.** Accurate mass of fragments obtained following collisions tests of the potential biomarker  $m/z$  394.2102 using a collision ramp energy of 10-25 V.

<b>Potential Biomarker <math>m/z</math> 394 Fragmentation Results</b>			
<b>Fragment</b>	<b><math>m/z</math></b>	<b>Fragment</b>	<b><math>m/z</math></b>
A	394.2102	K	292.1535
B	376.1974	L	280.1553
C	358.1904	M	256.1567
D	346.1871	N	232.1572
E	340.1725	O	214.1450
F	328.1772	P	196.1331
G	322.1589	Q	184.1328
H	310.1698	R	179.1072
I	304.1597	S	164.1066
J	298.1674	T	147.0811

**Table S-2.** Accurate mass of fragments obtained following collision tests of the potential biomarker  $m/z$  390.2113 using a collision ramp energy of 15-30 V.

<b>Potential Biomarker <math>m/z</math> 390 Fragmentation Results</b>			
<b>Fragment</b>	<b><math>m/z</math></b>	<b>Fragment</b>	<b><math>m/z</math></b>
A	390.2113	K	294.1737
B	372.2023	L	288.1617
C	354.1920	M	276.1597
D	342.1921	N	258.1462
E	336.1806	O	210.1506
F	324.1833	P	192.1389
G	318.1714	Q	180.1372
H	312.1792	R	174.1296
I	306.1683	S	164.1381
J	300.1625	T	147.1165

**Table S-3.** Accurate mass of fragments obtained following collision tests of the potential biomarker  $m/z$  366.1762 using a collision ramp energy of 10-25 V.

<b>Potential Biomarker <math>m/z</math> 366 Fragmentation Results</b>			
<b>Fragment</b>	<b><math>m/z</math></b>	<b>Fragment</b>	<b><math>m/z</math></b>
A	366.1762	K	264.1155
B	348.1667	L	246.1179
C	330.1554	M	228.1239
D	318.1529	N	210.1093
E	312.1422	O	204.1247
F	307.1305	P	186.1125
G	300.1486	Q	168.1028
H	294.1298	R	156.1025
I	282.1399	S	136.0775
J	270.1314		

**Table S-4.** Accurate mass of fragments obtained following collision tests of the potential biomarker  $m/z$  362.1808 using a collision ramp energy of 15-35 V.

<b>Potential Biomarker <math>m/z</math> 362 Fragmentation Results</b>			
<b>Fragment</b>	<b><math>m/z</math></b>	<b>Fragment</b>	<b><math>m/z</math></b>
A	362.1808	L	242.1333
B	344.1758	M	224.1296
C	326.1616	N	218.1151
D	314.1610	O	206.1157
E	308.1526	P	200.1291
F	296.1511	Q	182.1195
G	290.1379	R	164.1093
H	284.1518	S	152.1039
I	272.1249	T	146.0972
J	266.1448	U	132.0863
K	260.1290		



**Table S-5.** Demographics, mutations, and signs and symptoms of GD patients.

Patient ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Age	45	43	40	69	62	54	3	71	43	53	44	11	71	49	70
Gender	M	M	F	M	M	F	F	M	F	F	F	M	F	F	F
Age at diagnosis	13	40	20	66	61	53	16	21	36	44	27	6	50	40	42
Mutations	N370S N370S	N370S N370S	N370S N370S	N370S N370S	N370S L444P	N370S D448H	N370S N370S	N370S W378G	N370S N370S	N370S R496H	L444P 84GG	G377S L444P	N370S N370S	N370S N370S	N370S L444P
<b>Bone disease</b>															
Bone pain	-	-	-	-	-	-	x	x	x	-	x	-	x	x	-
Bone crisis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Erlenmeyer flask deformity	-	-	-	x	-	-	-	-	x	-	x	-	-	-	-
Bone marrow infiltration	-	-	x	x	-	-	x	x	x	x	x	x	-	x	-
Osteopenia	-	-	-	-	x	-	-	x	-	x	-	-	-	-	-
Infarction	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-
Avascular necrosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
New fractures	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lytic lesions	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Decreased bone mineral density	-	-	-	-	-	-	-	x	-	x	-	-	-	-	-
Bone marrow burden	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	LL 4/8 S 3/8	N/A	LL 4/8 S 5-6/8	LL 2/8 S 3/8	LL 7/8 S 7/8	N/A	N/A	LL 5/8 S 6-7/8	LL 7/8 S 5/8
<b>Hematological and visceral manifestations</b>															
Anemia	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	-	-	-
Hemoglobin (g/L)	135	138	119	131	130	129	140	140	113	117	127	90	139	125	132
Thrombocytopenia	x	-	x	x	x	x	x	-	x	-	x	x	-	x	-
Platelet counts (/L)	89	124	106	67	94	94	95	182	82	254	71	40	150	87	144
Splenomegaly	-	+	++	+	++	-	-	N/A	-	-	N/A	++	+	+	N/A
Hepatomegaly	-	+	+	-	++	++	+	N/E	++	+	-	++	+	+	+
Splenectomized	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	x	-	-	-	x
Gammopathies and malignancy	-	-	-	x	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-
<b>Pulmonary disease</b>															
Elevated arterial pressure	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-
Sulmonary hypertension	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hepatopulmonary syndrome	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Respiratory failure	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Other	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

x: Clinical manifestation observed in patient  
 +: Mild hepatomegaly and/or splenomegaly  
 ++: Moderate hepatomegaly and/or splenomegaly  
 N/A: Clinical data not available  
 F: Female  
 M: Male  
 LL: Lower limb  
 S: Spine

## References

- [1] Durán, A.; Rebolledo-Jaramillo, B.; Olguin, V.; Rojas-Herrera, M.; Las Heras, M.; Calderón, J. F.; Zanlungo, S.; Priestman, D. A.; Platt, F. M.; Klein, A. D. Identification of genetic modifiers of murine hepatic  $\beta$ -glucocerebrosidase activity. *Biochem. Biophys. Rep.* **2021**, 28, 101105. doi: 10.1016/j.bbrep.2021.101105.
- [2] Narayanan, P.; Nair, S.; Balwani, M.; Malinis, M.; Mistry, P. The clinical spectrum of SARS-CoV-2 infection in Gaucher disease: Effect of both a pandemic and a rare disease that disrupts the immune system. *Mol. Genet. Metab.* **2021**, S1096-7192(21)00768-X. doi: 10.1016/j.ymgme.2021.08.004
- [3] Aerts, J.; Kuo, C. L.; Lelieveld, L. T.; Boer, D.; van der Lienden, M.; Overkleeft, H. S.; Artola, M. Glycosphingolipids and lysosomal storage disorders as illustrated by gaucher disease. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2019**, 53, 204–215. doi: 10.1016/j.cbpa.2019.10.006.
- [4] Fujii, T.; Tanaka, Y.; Oki, H.; Sato, S.; Shibata, S.; Maru, T.; Tanaka, Y.; Tanaka, M.; Onishi, T. A new brain-penetrant glucosylceramide synthase inhibitor as potential Therapeutics for Gaucher disease. *J. Neurochem.* **2021**, 159(3), 543–553. doi: 10.1111/jnc.15492.
- [5] Donald, A.; Tan, C. Y.; Chakrapani, A.; Hughes, D. A.; Sharma, R.; Cole, D.; Bardins, S.; Gorges, M.; Jones, S. A.; Schneider, E. Eye movement biomarkers allow for the definition of phenotypes in Gaucher Disease. *Orphanet J. Rare. Dis.* **2020**, 15(1), 349. doi: 10.1186/s13023-020-01637-9.
- [6] Sun A. Lysosomal storage disease overview. *Ann. Transl. Med.* **2018**, 6(24), 476. doi: 10.21037/atm.2018.11.39.
- [7] Roshan Lal, T.; Seehra, G. K.; Steward, A. M.; Poffenberger, C. N.; Ryan, E.; Tayebi, N.; Lopez, G.; Sidransky, E. The natural history of type 2 Gaucher disease in the 21st century:

A retrospective study. *Neurology* **2020**, 95(15), e2119–e2130. doi: 10.1212/WNL.0000000000010605.

[8] Gupta, N.; Oppenheim, I. M.; Kauvar, E. F.; Tayebi, N.; Sidransky, E. Type 2 Gaucher disease: phenotypic variation and genotypic heterogeneity. *Blood Cells Mol. Dis.* **2011**, 46(1), 75–84. doi: 10.1016/j.bcmd.2010.08.012.

[9] Kannauje, P. K.; Pandit, V.; Wasnik, P. N.; Gupta, A. K.; Venkatesan, N. Gaucher's disease in an Adult Female: A Rare Entity. *Cureus.* **2021**, 13(8), e17318. doi: 10.7759/cureus.17318.

[10] Gary, S. E.; Ryan, E.; Steward, A. M.; Sidransky, E. Recent advances in the diagnosis and management of Gaucher disease. *Expert Rev. Endocrinol. Metab.* **2018**, 13(2), 107–118. doi: 10.1080/17446651.2018.1445524.

[11] Gupta, P.; Pastores, G. Pharmacological treatment of pediatric Gaucher disease. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **2018**, 11(12), 1183–1194. doi: 10.1080/17512433.2018.1549486.

[12] Puri, R. D.; Kapoor, S.; Kishnani, P. S.; Dalal, A.; Gupta, N.; Muranjan, M.; Phadke, S. R.; Sachdeva, A.; Verma, I. C.; Mistry, P. K. Gaucher disease task force. Diagnosis and management of Gaucher disease in India - Consensus guidelines of the Gaucher disease task force of the Society for Indian Academy of Medical Genetics and the Indian Academy of Pediatrics. *Indian Pediatr.* **2018**, 55(2), 143–153.

[13] Giraldo, P.; López de Frutos, L.; Cebolla, J. J. Biomarker combination is necessary for the assessment of Gaucher disease? *Ann. Transl. Med.* **2018**, 6(Suppl 1), S81. doi: 10.21037/atm.2018.10.69.

[14] Vigan, M.; Stirnemann, J.; Caillaud, C.; Froissart, R.; Boutten, A.; Fantin, B.; Belmatoug, N.; Mentré, F. Modeling changes in biomarkers in Gaucher disease patients receiving enzyme replacement therapy using a pathophysiological model. *Orphanet J. Rare Dis.* **2014**, 9, 95. doi: 10.1186/1750-1172-9-95

- [15] Thomas, A. S.; Mehta, A. B.; Hughes, D. A. Diagnosing Gaucher disease: an on-going need for increased awareness amongst haematologists. *Blood Cells Mol. Dis.* **2013**, 50(3), 212–217. doi: 10.1016/j.bcmd.2012.11.004
- [16] Gary, S. E.; Ryan, E.; Steward, A. M.; Sidransky, E. Recent advances in the diagnosis and management of Gaucher disease. *Expert Rev. Endocrinol Metab.* **2018**, 13(2), 107–118. doi: 10.1080/17446651.2018.1445524.
- [17] Bernstein, K. E.; Khan, Z.; Giani, J. F.; Cao, D. Y.; Bernstein, E. A.; Shen, X. Z. Angiotensin-converting enzyme in innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Nephrol.* **2018**, 14(5), 325–336. doi: 10.1038/nrneph.2018.15.
- [18] van Dussen, L.; Lips, P.; Everts, V. E.; Bravenboer, N.; Jansen, I. D.; Groener, J. E.; Maas, M.; Blokland, J. A.; Aerts, J. M.; Hollak, C. E. Markers of bone turnover in Gaucher disease: modeling the evolution of bone disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, 96(7), 2194–2205. doi: 10.1210/jc.2011-0162.
- [19] Revel-Vilk, S.; Fuller, M.; Zimran, A. Value of Glucosylsphingosine (lyso-Gb<sub>1</sub>) as a Biomarker in Gaucher disease: A systematic literature review. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21(19), 7159.
- [20] Hurvitz, N.; Dinur, T.; Becker-Cohen, M.; Cozma, C.; Hovakimyan, M.; Oppermann, S.; Demuth, L.; Rolfs, A.; Abramov, A.; Zimran, A.; Revel-Vilk, S. Glucosylsphingosine (lyso-Gb<sub>1</sub>) as a biomarker for monitoring treated and untreated children with Gaucher disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20(12), 3033. doi: 10.3390/ijms20123033.
- [21] Saville, J. T.; McDermott, B. K.; Chin, S. J.; Fletcher, J. M.; Fuller, M. Expanding the clinical utility of glucosylsphingosine for Gaucher disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2020**, 43(3), 558–563. doi: 10.1002/jimd.12192.

[22] Murugesan, V.; Chuang, W. L.; Liu, J.; Lischuk, A.; Kacena, K.; Lin, H.; Pastores, G. M.; Yang, R.; Keutzer, J.; Zhang, K.; Mistry, P. K. Glucosylsphingosine is a key biomarker of Gaucher disease. *Am. J. Hematol.* **2016**, 91(11), 1082–1089. doi: 10.1002/ajh.24491.

[23] Menkovic, I.; Boutin, M.; Alayoubi, A.; Mercier, F. E.; Rivard, G. É.; Auray-Blais, C. Identification of a reliable biomarker profile for the diagnosis of Gaucher disease type 1 patients using a mass spectrometry-based metabolomic approach. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21(21), 7869. doi: 10.3390/ijms21217869.

[24] Chen, Y.; Shen, G.; Zhang, R.; He, J.; Zhang, Y.; Xu, J.; Yang, W.; Chen, X.; Song, Y.; Abliz, Z. Combination of injection volume calibration by creatinine and MS signals' normalization to overcome urine variability in LC-MS-based metabolomics studies. *Anal. Chem.* **2013**, 85(16), 7659–7665. doi: 10.1021/ac401400b.

[25] Auray-Blais, C.; Boutin, M.; Gagnon, R.; Dupont, F. O.; Lavoie, P.; Clarke, J. T. Urinary globotriaosylsphingosine-related biomarkers for Fabry disease targeted by metabolomics. *Anal. Chem.* **2012**, 84(6), 2745–2753. doi: 10.1021/ac203433e

[26] van den Berg, R. A.; Hoefsloot, H. C.; Westerhuis, J. A.; Smilde, A. K.; van der Werf, M. J. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC genomics.* **2006**, 7, 142. doi: 10.1186/1471-2164-7-142.

[27] Lavoie, P.; Boutin, M.; Auray-Blais, C.; Multiplex analysis of novel urinary lyso-Gb3-related biomarkers for Fabry disease by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2013**, 85(3):1743-52. doi: 10.1021/ac303033v.

[28] DeMayo, R. F.; Haims, A. H.; McRae, M. C.; Yang, R.; Mistry, P. K. (2008). Correlation of MRI-Based bone marrow burden score with genotype and spleen status in Gaucher's disease. *AJR Am J Roentgenol.* **2008**, 191(1), 115–123. doi:10.2214/AJR.07.3550.

## 24 ARTICLE 4

### **Quantitation of a Urinary Profile of Biomarkers in Gaucher Disease Type 1 Patients Using Tandem Mass Spectrometry**

**Auteurs de l'article:** Iskren Menkovic, Michel Boutin, Abdulfatah Alayoubi, Filipa Curado, Peter Bauer, François E. Mercier, Christiane Auray-Blais

**Statut de l'article:** Publié dans *Diagnostics* 2022 (12), 1414.

**Avant-propos:** Iskren Menkovic a travaillé au niveau de la purification des échantillons, du développement de la méthode d'analyse, de l'analyse des échantillons, du traitement des données et des résultats. De plus, Iskren a rédigé le manuscrit présenté ci-dessous. Tout le travail réalisé par Iskren a été sous les conseils, les recommandations et la supervision des professeurs Michel Boutin et Christiane Auray-Blais.

**Mise en contexte :** L'Article 4 est une suite logique des travaux présentés dans l'Article 3. Une méthode quantitative par spectrométrie de masse en tandem (triple quadripôle) a été développée puis validée dans le but d'analyser les biomarqueurs découverts lors de l'étude métabolomique dans l'urine présentée dans l'Article 3. Comme pour la méthode présentée dans le cadre de l'Article 2, l'usage d'un appareil différent pour l'étude métabolomique et pour la méthode quantitative (spectromètre de masse en temps de vol et le triple quadripôle, respectivement) permet d'obtenir des méthodes plus courtes avec de plus basses limites de quantification et de détection. Des résultats issus des méthodes quantitatives sont plus fiables et représentatifs de la réalité, puisque différents éléments comme l'effet de matrice ou les paramètres d'élution sont également considérés. Ainsi, l'Article 4 avait pour but de développer et valider la méthode quantitative avec comme objectif d'étudier la distribution et la variabilité de ces biomarqueurs dans les échantillons provenant de différents groupes, soit les patients Gaucher traités, non traités ainsi que les contrôles sains. Éventuellement, la méthode développée pourra être utilisée afin d'étudier les corrélations entre les biomarqueurs urinaires et les manifestations cliniques observées chez les patients.

**Résumé:**

La maladie de Gaucher est une maladie lysosomale causée par des mutations bialléliques du gène *GBA1* localisé sur le chromosome 1. Ces mutations affectent l'enzyme  $\beta$ -glucocérébrosidase et, par le fait même, engendrent des anomalies au niveau du métabolisme des sphingolipides. Alors que les laboratoires cliniques utilisent principalement des biomarqueurs présents au niveau du plasma pour le pronostic et le suivi des patients, des études métabolomiques récentes par notre groupe ont également révélé la présence de biomarqueurs au niveau de l'urine de patients Gaucher. Évidemment, l'avantage de pouvoir doser les biomarqueurs dans une matrice qui peut être accessible de manière non invasive est très intéressant, particulièrement pour les enfants en bas âge. Le but principal de cette étude était de développer et de valider une méthode analytique pour être en mesure de quantifier les biomarqueurs précédemment identifiés dans l'urine. Plus précisément, la méthode analytique avait pour but de quantifier l'ensemble des biomarqueurs trouvés par l'étude métabolomique, y compris le lyso-Gb<sub>1</sub> et ses analogues.

## Quantitation of a Urinary Profile of Biomarkers in Gaucher Disease Type 1 Patients Using Tandem Mass Spectrometry

Iskren Menkovic<sup>1</sup>, Michel Boutin<sup>1</sup>, Abdulfatah Alayoubi<sup>2,3</sup>, Filipa Curado<sup>4</sup>, Peter Bauer<sup>4</sup>, François E. Mercier<sup>2</sup>, and Christiane Auray-Blais<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Medical Genetics, Department of Pediatrics, Centre de Recherche-CHUS, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, CIUSSS de l'Estrie-CHUS, 3001, 12th Avenue North, Sherbrooke, QC J1H 5N4, Canada.

<sup>2</sup>Divisions of Experimental Medicine and Hematology, Department of Medicine, Faculty of Medicine, McGill University, Lady Davis Institute for Medical Research, Jewish General Hospital, 3755, Côte Sainte-Catherine, Montreal, QC H3T 1E2, Canada.

<sup>3</sup>Department of Biochemistry and Molecular Medicine, College of Medicine, Taibah University, University Road, Madinah 42353, Saudi Arabia.

<sup>4</sup>CENTOGENE GmbH, 18055 Rostock, Germany.

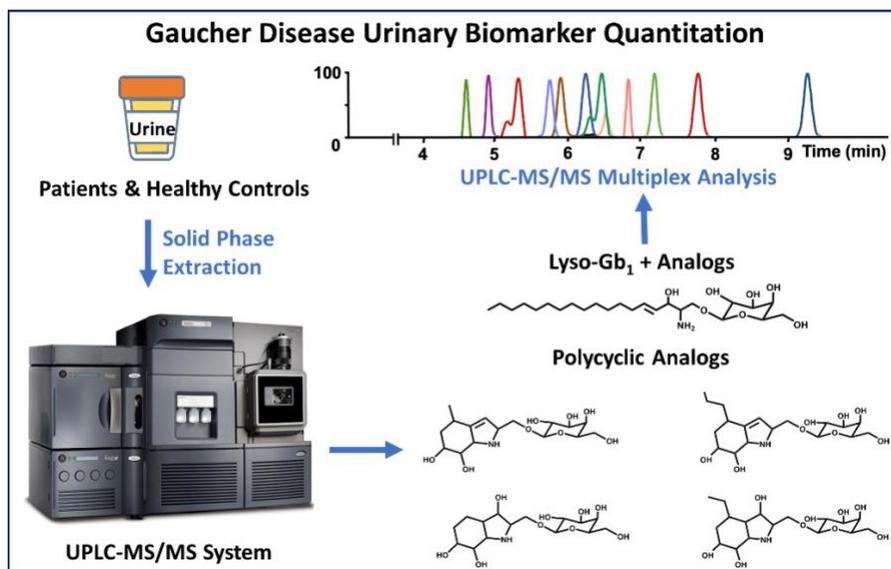
### Abstract

**Aim:** Gaucher disease is a lysosomal storage disorder caused by deficiencies in the enzyme acid beta-glucocerebrosidase. Metabolomic studies have targeted several new potential urinary biomarkers. The main objective of this study was to develop and validate a robust UPLC-MS/MS method to study the distributions and variations of these biomarkers in patients. **Results/methodology:** Urine samples were purified using a mixed-mode cation exchange solid-phase extraction. Validation assays showed robust results for: lyso-Gb<sub>1</sub>, lyso-Gb<sub>1</sub> analogs -28, -26, -12 (A/B), +2, +14, +16 (A/B), +30, and +32 Da, and polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> analogs 362, 366, 390, and 394 Da in treated and untreated Gaucher patients. **Conclusions:** All quantified biomarkers were increased in Gaucher patients. Biomarker levels were significantly reduced 6 months after enzyme replacement therapy.

Keywords: Gaucher Disease Type 1, Urine, Biomarkers, Glucosylsphingosine, Lyso-Gb<sub>1</sub>, Lyso-Gb<sub>1</sub> Analogs, Polycyclic Lyso-Gb<sub>1</sub> Analogs, Tandem Mass Spectrometry, Ultra-Performance Liquid Chromatography



## Graphical Abstract

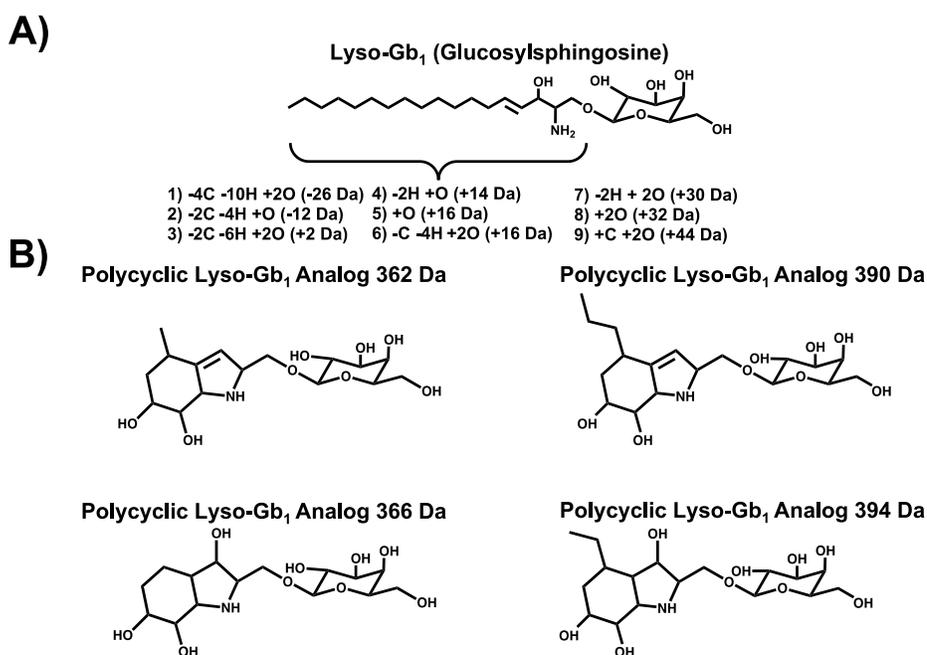


## 1. Introduction

Gaucher disease (GD; OMIM 230800, 230900, and 231000) is an autosomal recessive disorder caused by a deficiency in the lysosomal enzyme acid beta-glucocerebrosidase (GCase; OMIM 606463) [1] encoded by the *GBA* gene. This leads to the accumulation of several glycosphingolipid species in numerous organs and tissues, namely the spleen, the liver, and the bone marrow [2]. This ultimately impairs the natural homeostasis of the tissue and results in multisystemic clinical manifestations varying in frequency and severity [3]. While GD shows a wide continuum of phenotypes ranging from asymptomatic to early death, patients are classified into three subtypes based on the severity of the clinical manifestations and degree of neurological involvement [4,5]. GD type 1 (OMIM 230800) is the most common form of the disease and represents approximately 90–95% of all GD cases [6]. Patients typically exhibit visceral manifestations (hepatomegaly and/or splenomegaly) hematological complications (cytopenia) and bone disease. Neurological involvement in this subtype is either mild or absent [6]. GD type 2 represents the most severe form of the disease and is commonly referred to as the acute neuronopathic GD. Normally, in GD type 2, the neurological involvement appears in the first six months of life and leads to death by the age of two [7]. In comparison, GD type 3 or the chronic neuronopathic form of the disease may appear months to years after birth. Moreover, in

GD type 3 the progression and the severity of the neurological involvement are slower and less severe than in GD type 2 [7]. Both GD type 2 and type 3 experience visceral, hematological, and bone disease in addition to neurological complications.

Enzyme replacement therapy (ERT) and substrate reduction therapy (SRT) are some of the treatments available for GD patients. These therapies are efficient for clinical manifestations related to visceral manifestations, hematological complications, and bone disease [8,9]. However, ERT has a limited impact on CNS-related complications since it does not cross the blood-brain barrier [10]. Moreover, it is well documented that early initiation of treatment reduces the progression of clinical manifestations and improves the outcome [11-13]. Unfortunately, due to the important phenotypic variability and wide spectrum of severity associated with the disease, a confirmed diagnosis may, in some cases, be quite challenging [13]. Biomarkers found in the blood such as angiotensin-converting enzyme (ACE), tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), chitotriosidase, and CCL18 can be used for routine follow-up of patients [14-18]. However, they are not specific to GD [19]. In recent years, lyso-Gb<sub>1</sub> has emerged as a key biomarker for the monitoring and progression of the disease [20]. Moreover, this biomarker could potentially be used for the diagnosis of the disease [21]. Considering the nature of the disease and associated clinical manifestations, the blood matrix was mostly investigated as a source of biomarkers related to the disease, potentially overlooking biomarkers found in other matrices such as urine. Recently, metabolomic studies done by our research group in plasma and urine highlighted several different metabolites increased in each matrix [22,23]. More specifically, N-palmitoyl-O-phosphocholine serine, sphingosylphosphorylcholine, lyso-Gb<sub>1</sub> as well as lyso-Gb<sub>1</sub> analogs -28, -2, +14, and +18 Da were targeted as potential biomarkers in plasma specimens. Meanwhile, lyso-Gb<sub>1</sub>, polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> analogs 362, 366, 390, and 394 Da in addition to lyso-Gb<sub>1</sub> analogs -26, -12, +2, +14, +16 (A) and (B), +30, +32, and +44 Da were highlighted as potential biomarkers in urine as shown in Figure 1.



**Figure 1.** Potential GD biomarkers highlighted in urine specimens: A) lyso-Gb<sub>1</sub> chemical structure with structural modifications observed on the sphingosine moiety in lyso-Gb<sub>1</sub> analogs; B) Polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> analog chemical structures [22].

These two metabolomic studies also suggested that the distribution of biomarkers varies significantly from one matrix to the other. Indeed, some lyso-Gb<sub>1</sub> analogs revealed more abundant than lyso-Gb<sub>1</sub> itself in urine [22]. Moreover, analogs +44, +32, +30, +2, and -26 Da were not detected in plasma [23]. Also, the metabolomic study performed in urine specimens highlighted a novel class of GD biomarkers called polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> analogs. These latter biomarkers were over 10 times more elevated than lyso-Gb<sub>1</sub> itself, as well as the related analogs in some urine specimens [22,24].

In the past, our research group has done several metabolomic studies in urine on Fabry disease where a glycosphingolipid accumulation is also involved. These studies led to the discovery of novel lyso-Gb<sub>3</sub> analogs with different modifications on the sphingosine moiety [25,26]. Another study highlighted that several lyso-Gb<sub>3</sub> analogs had a significant correlation with specific clinical manifestations of the disease [27]. Considering that Gaucher disease and Fabry disease have closely related metabolic pathways with structurally similar resulting biomarkers, we have hypothesized that some urinary

biomarkers observed in GD may also show significant correlations with specific clinical manifestations. Therefore, urinary biomarkers highlighted by the GD metabolomic study need to be further investigated to evaluate correlations with specific clinical manifestations of the disease. Therefore, the main objective of this research project was to develop and validate a robust tandem mass spectrometry urine quantitation method for lyso-Gb<sub>1</sub> and related analogs (-26, -12, +2, +14, +16, +30, and +32 Da), as well as polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> analogs 362, 366, 390, and 390 Da. Upon the validation process, correlations will be investigated between biomarker levels and patient-specific clinical manifestations.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Reagents

Carbon 13 labelled-glucosylsphingosine (lyso-Gb<sub>1</sub>-(<sup>13</sup>C<sub>6</sub>)) powder (98% purity) was acquired from Matreya (Pleasant Gap, PA, USA). Creatinine powder (98% purity) was purchased from Sigma Aldrich (Saint-Louis, MO, USA) while deuterated creatinine (Creatinine-D<sub>3</sub>) standard (98% purity) was obtained from CDN Isotopes Inc. (Pointe-Claire, QC, CAN). Synthetic urine was supplied by BioIVT (Westbury, NY, USA). UPLC grade methanol (MeOH) and acetonitrile (ACN) were purchased from EMD Chemicals Inc. (Darmstadt, Germany). Optima LC/MS grade water and MeOH, as well as American Chemical Society (ACS) grade ammonium formate (Amm. Form.), ammonium hydroxide (NH<sub>4</sub>OH; 28%–30% purity), and O-phosphoric acid (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 85%) were obtained from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA). Finally, formic acid (FA; >99%) was obtained from Acros Organics (Morris Plain, NJ, USA).

### 2.2. Ethics Approval

The research project presented in this paper was approved by the Research Ethics Board (REB) of the Faculty of Medicine and Health Sciences of the Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke (CHUS) under the project ID MP-31-2017-1414. Jewish General REB also approved the study (REB Project ID MEO-31-2020-1937). Patients recruited from Centogene were part of the Lyso-Prove project, which was approved by Universität Rostock REB under project ID A 2015-0025. Informed consent from all patients and healthy controls were obtained.

### 2.3. Study Population

Liquid urine samples from treated and untreated GD type 1 patients were collected from different countries, namely Canada, Germany, Israel, and Greece. Males and females, minors and adults were enrolled in the study. Upon arrival at our facility, samples were kept at -30°C until analysis. For all patients involved in the study, a marked GCase enzyme deficiency in peripheral blood leukocytes was demonstrated. Moreover, all patients had biallelic mutations of the *GBA* gene which was revealed by sequencing. Healthy controls considered for this study did not have any lysosomal storage diseases (LSDs) or other comorbidities.

### 2.4. Calibration Curves and Quality Control Samples Preparation

The lyso-Gb<sub>1</sub> powder was dissolved in MeOH to obtain two stock solutions with concentrations of 2000 and 20 000 nM. Using these stock solutions, a 9-point calibration curve solution with respective concentrations of 0, 2, 20, 45, 75, 125, 250, 500, and 800 nM in the urine matrix was prepared. Regarding the preparation of quality control (QC) samples, spiked samples with concentrations of 10, 187, and 650 nM of lyso-Gb<sub>1</sub> were used for low, medium, and high QC samples.

For the quantitation of creatinine, calibration curve points with concentrations of 0, 1, 2, 5, 7.5, 10, 15, 20, and 30 mM were prepared in water and used for sample quantitation. Urine samples from healthy controls with a creatinine concentration of 1.9, 9.5, and 18 mM were used as QC samples for creatinine quantitation.

### 2.5. Sample Preparation

Urine samples were thawed at room temperature. Samples were then vortexed for 10 seconds and a volume of 200 µl was transferred into a 2 ml Eppendorf polypropylene tube. A volume of 500 µl of a 2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> solution was added to the sample, followed by a volume of 500 µl of a MeOH solution containing 10 mM lyso-Gb<sub>1</sub>-(<sup>13</sup>C<sub>6</sub>). Finally, a volume of 10 µl of a solution of 20 mM of creatinine-D<sub>3</sub> was added to each sample. Samples were afterwards purified using Oasis mixed-mode cation-exchange (MCX) solid-phase extraction (SPE) cartridges (Waters Corp. Milford, MA, USA). Briefly, SPE cartridges were conditioned with 1 ml of MeOH and 1 ml of a 2% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> solution. Sample solutions

were then vortexed for 5 seconds and transferred into the cartridges. Loaded cartridges were washed with 1 ml of a 2% formic acid solution, followed by a wash using 1 ml of a 0.2% FA solution prepared in MeOH. The analyte elution step was done using 600  $\mu$ l of 2% ammonium hydroxide solution prepared in MeOH. Samples were evaporated to dryness under a stream of nitrogen, followed by a resuspension in 200  $\mu$ l of the mobile phase A (94.5:2.5:2.5:0.5 ACN: MeOH: H<sub>2</sub>O: FA + 5 mM Amm. Form.). Samples were ultimately transferred into a 300  $\mu$ l glass insert added to a 2 ml vial. A volume of 4  $\mu$ l was injected into the UPLC-MS/MS system for analysis.

### *2.6. Instrumentation and Parameters*

The quantitation of potential GD biomarkers in urine, as well as creatinine, was done using an Acquity I-class UPLC system coupled to a Xevo TQ-S tandem mass spectrometer (Waters Corp. Milford, MA, USA). Detailed parameters used are shown in Table 1.

**Table 1.** Ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method parameters.

Parameters	Description			
<b>Chromatographic parameters</b>				
HPLC Column	Halo HILIC 2.7 Advanced Materials Technology (Wilmington, DE, USA)			
Column Dimension	4.6 x 1500 mm			
Particle Size	2.7 $\mu\text{m}$			
Column Temperature	24°C			
Weak Wash Solvent	ACN			
Strong Wash Solvent	ACN			
Injection Mode	Partial Loop			
Injection Volume	4 $\mu\text{l}$			
Mobile Phase A	94.5:2.5:2.5:0.5 ACN: MeOH: H <sub>2</sub> O: FA + 5 mM Amm. Form.			
Mobile Phase B	10:89.5:0.5 ACN: H <sub>2</sub> O: FA + 5 mM Amm. Form.			
Flow rate	0.85 ml/min			
Gradient	0.0 @ 9.5 min: 12.5%			
(% Mobile Phase B)	9.5 @ 11.0 min: 70.0%			
	11.0 @ 12.0 min: 12.5%			
<b>Mass spectrometry parameters</b>				
Ionization Mode	Electrospray Ionization (ESI)			
Polarity	Positive			
Acquisition Mode	Multiple Reaction Monitoring (MRM)			
Capillary Voltage	3.2 kV			
Desolvation Temperature	550°C			
Desolvation Gas Flow	750 l/h			
Cone Gas Flow	150 l/h			
Source Temperature	150°C			
<b>Analytes</b>				
Compound	Transitions ( $m/z$ )	Cone Voltage (V)	Collision Energy (V)	Dwell Time (s)
Creatinine	144.07 > 44.05	10	5	0.200
Creatinine-(D <sub>3</sub> )	117.09 > 47.07	10	5	0.200
Lyso-Gb <sub>1</sub> -28 Da	434.31 > 254.25	38	18	0.021
Lyso-Gb <sub>1</sub> -26 Da	436.25 > 238.18	38	18	0.021
Lyso-Gb <sub>1</sub> -12 Da	450.31 > 252.23	38	18	0.021
Lyso-Gb <sub>1</sub>	462.34 > 282.28	38	18	0.021
Lyso-Gb <sub>1</sub> +2 Da	464.29 > 284.22	38	18	0.021
Lyso-Gb <sub>1</sub> -( <sup>13</sup> C <sub>6</sub> )	468.36 > 282.28	38	18	0.021
Lyso-Gb <sub>1</sub> +14 Da	476.36 > 296.26	38	18	0.021
Lyso-Gb <sub>1</sub> +16 Da	478.34 > 280.26	38	18	0.021
Lyso-Gb <sub>1</sub> +30 Da	492.32 > 294.24	38	18	0.021
Lyso-Gb <sub>1</sub> +32 Da	494.33 > 296.26	38	18	0.021
Polycyclic Analog 362 Da	362.18 > 164.11	38	18	0.021
Polycyclic Analog 366 Da	366.18 > 168.10	38	18	0.021
Polycyclic Analog 390 Da	390.21 > 192.14	38	18	0.021
Polycyclic Analog 394 Da	394.21 > 196.13	38	18	0.021

### 2.7. Biomarker Quantitation

Creatinine was quantified using commercially available standard and internal standard. Considering that creatinine is a molecule found in all urine samples (even in synthetic urine), the calibration curve needed to be prepared in water to avoid underestimating creatinine levels in samples. Moreover, to obtain the most accurate and precise quantitation possible, a 9-point calibration curve with concentrations ranging from 0 to 30 mM of creatinine was used. A quadratic curve with a weighing  $1/x$  and the origin value included were selected. Data processing was achieved with MassLynx/QuanLynx software version 4.2 SCN982 (Waters Corporation, Milford, Massachusetts). Regarding lyso-Gb<sub>1</sub> and analogs, including polycyclic analogs, quantitation was achieved using a 9-point calibration prepared in synthetic urine with a commercially available lyso-Gb<sub>1</sub> standard. Considering that no standards or internal standards are available for lyso-Gb<sub>1</sub> analogs, we performed a relative quantitation of these latter metabolites using the lyso-Gb<sub>1</sub> calibration curve and internal standard. Similar to the creatinine, lyso-Gb<sub>1</sub> quantitation was achieved using a quadratic calibration curve with a weighing  $1/x$ . Data were also processed with the MassLynx/QuanLynx software version 4.2 SCN982 (Waters, Milford, Massachusetts).

### 2.7. Method Validation

Various concentrations of urine samples were selected for the creatinine assays. The levels were measured using a method previously described [28]. Briefly, the method consists of successive dilution steps of a urine sample in a 65:35 ACN: H<sub>2</sub>O +50 mM Amm. Form. and 0.5% F.A to achieve a total final dilution factor of 1:4 000. A deuterated internal standard (Creatinine-D<sub>3</sub>) is also added to increase the method's reliability. Samples were then injected into a UPLC-TOF/MS for quantitation. A 9-point calibration curve with concentrations ranging from 1 to 30 mM of creatinine plus including a blank with the internal standard only was used. UPLC-MS/MS parameters are shown in Supplementary Table 1. The selected urine samples had creatinine concentration levels of 1.9 mM (low QC), 9.5 mM (medium QC), and 19.0 mM (high QC). These urine matrices were then spiked with lyso-Gb<sub>1</sub> standard to obtain QCs with concentrations of 10 nM (low QC), 187 nM (medium QC), and 650 nM (high QC). Using these prepared QC samples, both intraday



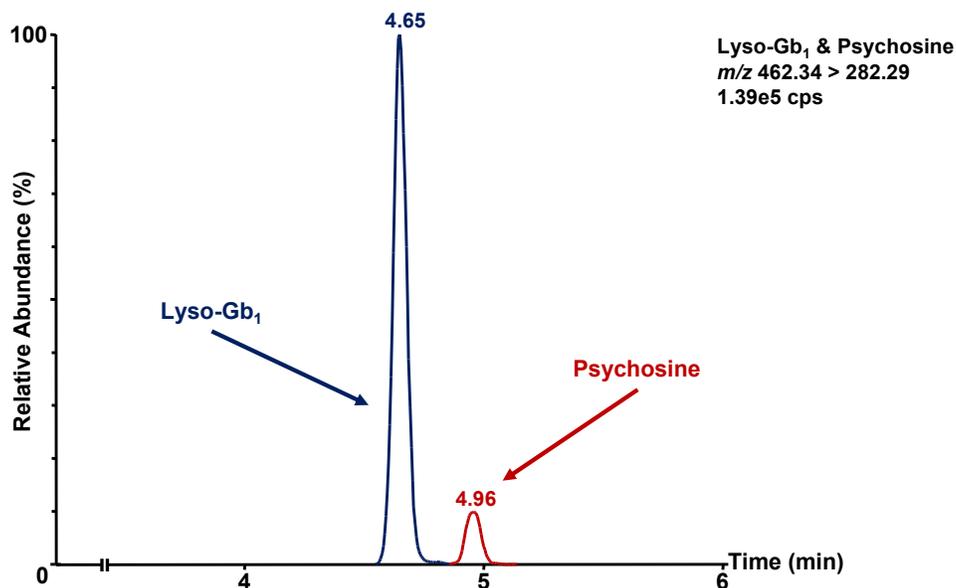
(5 replicates per QC per day) and interday (over 5 different days) precision and accuracy parameters were evaluated. Considering the limited volume of GD patient urine samples, intraday precision assays (5 samples/day) and interday precision assays (3 samples/day for 5 days) for lyso-Gb<sub>1</sub> analogs and polycyclic analogs were evaluated using a HQC (patient with the highest concentration of biomarkers in the cohort) and a LQC (patient with average biomarker concentrations). The lyso-Gb<sub>1</sub> calibration curve correlation factor was evaluated for each validation day using a freshly prepared curve. Sample stability for 24 hours, 48 hours, one week, and one month at -30°C, 4°C, and room temperature (22°C) was assessed by comparing stability QCs with their respective baseline values. Glass- and plasticware adhesion were evaluated by transferring a resuspended samples three times into a vial using either a Pasteur pipette (glassware adhesion) or a regular plastic tip (plastic adhesion). Freeze/thaw cycles biases were evaluated by comparing measured levels of lyso-Gb<sub>1</sub> from aliquots of a patient sample. Half of these aliquots went through three freeze/thaw cycles (n=3) while the other half was prepared following a regular protocol. The matrix effect was measured by post-column infusion using lyso-Gb<sub>1</sub>-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> at a concentration of 1 µg/ml and a constant flow rate set at 0.15 µl/min. Limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) were calculated using the standard deviation obtained by analyzing 10 times the same patient sample. The standard deviation was then multiplied by three to estimate the LOD and by ten to estimate the LOQ.

### **3. Results and Discussion**

#### *3.1. Chromatographic Separation*

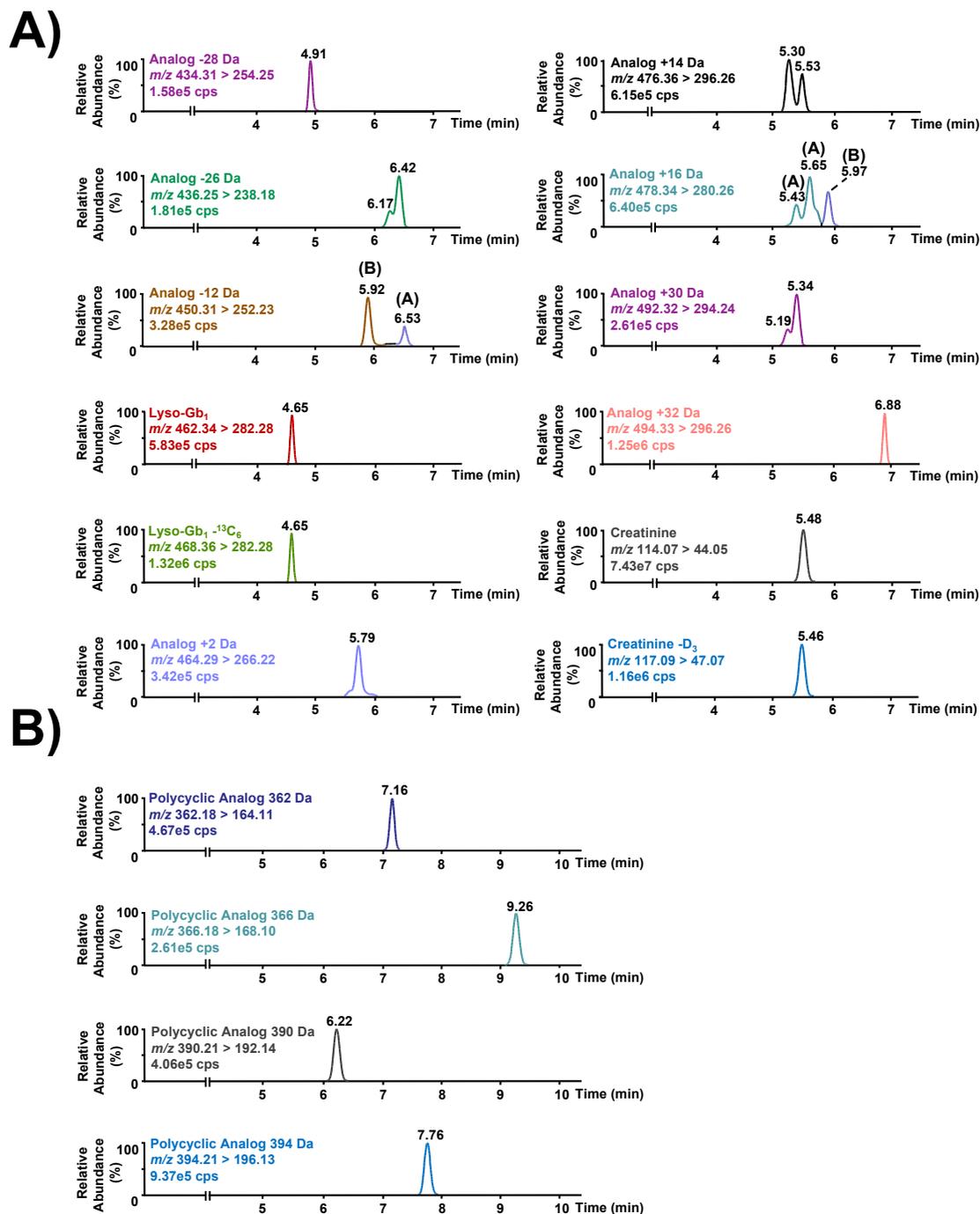
The chromatographic method was developed with 2 main objectives: 1) the separation of lyso-Gb<sub>1</sub> from its structural isomer galactosylsphingosine (psychosine), and 2) a reduction of the matrix effect in the analyte and internal standard elution regions. When considering the separation of lyso-Gb<sub>1</sub> from psychosine, some may argue that psychosine concentration is negligible compared to the concentration of lyso-Gb<sub>1</sub> in GD patients. We believe that a chromatographic separation of these two structural isomers will allow greater applicability of the method described herein. Indeed, the chromatographic separation of lyso-Gb<sub>1</sub> and psychosine favors the adaptability of the method for biomarker quantitation, particularly for Krabbe disease. Moreover, efficient separation of both metabolites

eliminates the risk of potential contamination from one metabolite to the other, which could affect the accuracy of the results. As shown in Figure 2, the separation of lyso-Gb<sub>1</sub> and psychosine was achieved using the proposed chromatographic parameters.



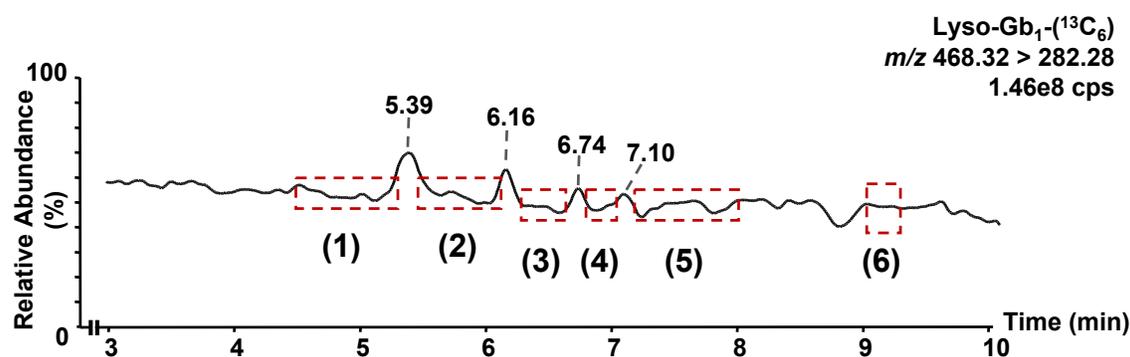
**Figure 2.** Ion chromatogram obtained by multiple reaction monitoring (MRM) of 60 ng on-column of lyso-Gb<sub>1</sub> standard (blue, retention time: 4.65 min) and 10 ng on-column of psychosine standard (red, retention time: 4.96 min).

As previously mentioned, the chromatographic separation of lyso-Gb<sub>1</sub> and all related analogs was achieved using an isocratic separation during the elution of all compounds of interest followed by a short linear gradient to wash off the column prior to re-equilibration. The resulting chromatography is shown in Figure 3.



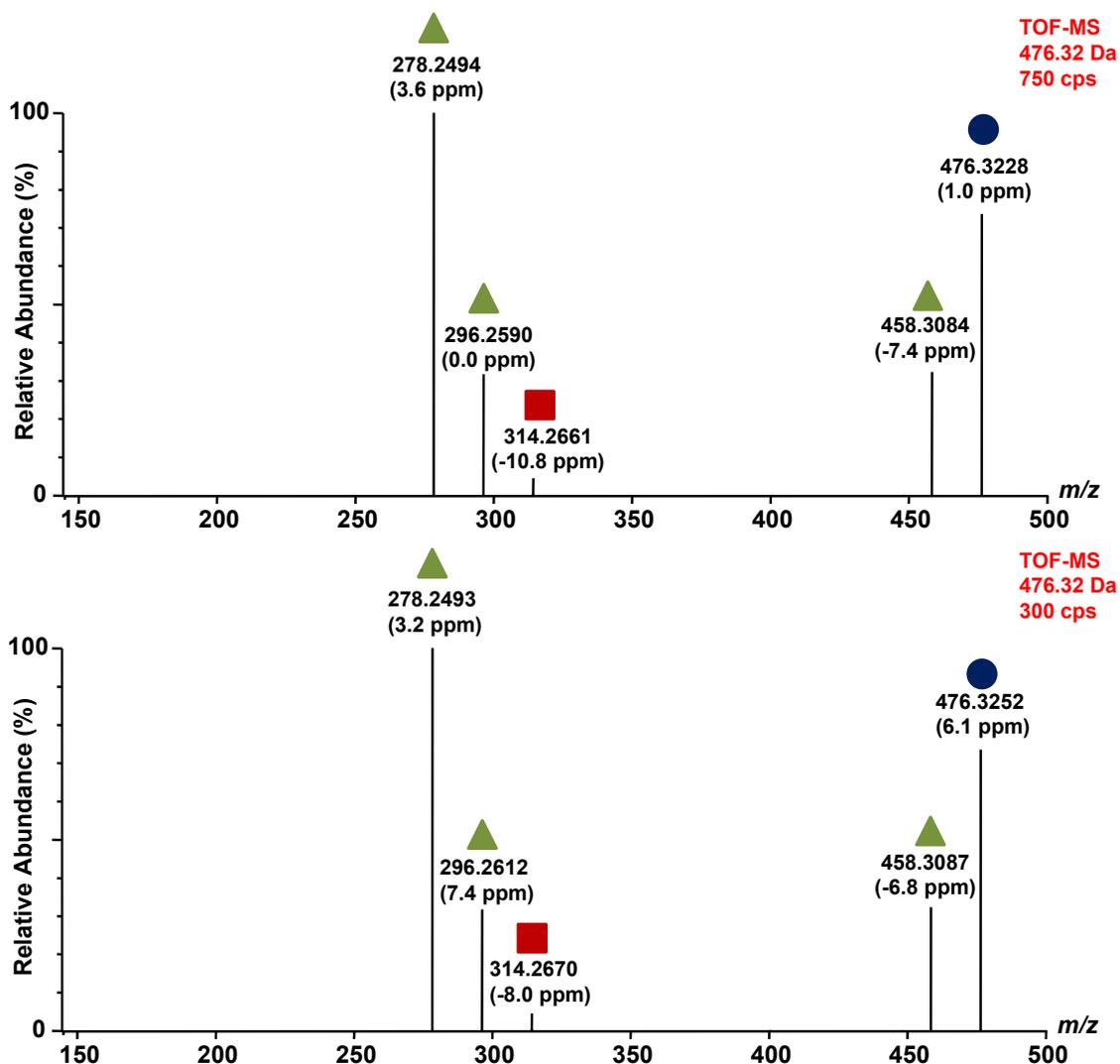
**Figure 3.** Chromatographic separation of potential lyso-Gb<sub>1</sub> biomarkers and creatinine with their respective internal standards. A) Ion chromatograms using a MRM mode for lyso-Gb<sub>1</sub>, lyso-Gb<sub>1</sub>-(<sup>13</sup>C<sub>6</sub>), lyso-Gb<sub>1</sub> analogs, as well as creatinine in a GD patient urine sample. B) Ion chromatograms obtained by MRM mode of polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> analogs in a GD patient sample. CPS: counts per second.

Regarding the matrix effect, there are no commercially available standards or internal standards for lyso-Gb<sub>1</sub> analogs or polycyclic analogs. Therefore, lyso-Gb<sub>1</sub>-(<sup>13</sup>C<sub>6</sub>) was used as an internal standard for all these molecules. To correct the matrix effect, all these metabolites need to be compared under the same conditions, targeting a similar matrix effect. A relatively stable matrix effect was achieved for the entire duration of the chromatographic separation for all analytes using an isocratic gradient. As shown in Figure 4, there were no regions with a significant ion enhancement or suppression between 3 and 10 minutes corresponding to the retention time of lyso-Gb<sub>1</sub> and related metabolites. More specifically, a continuous infusion of lyso-Gb<sub>1</sub>-(<sup>13</sup>C<sub>6</sub>) reveals three regions with high ion enhancement effects at 5.39 min, 6.16 min, and 6.74 min. Most analytes do not elute within those three regions; hence they are not affected by the ion enhancement effect observed. However, lyso-Gb<sub>1</sub> analogs +14, +16, and +30 Da do have retention times relatively close to 5.39. However, even for those analytes, considering there is some difference in the retention time, we are confident that biases in quantitation caused by the matrix effect will be less than 15% for all analytes.



**Figure 4.** Post-column infusion of lyso-Gb<sub>1</sub>-(<sup>13</sup>C<sub>6</sub>) (1 µg/ml; 0.15 µl/min) during the injection of a healthy control plasma sample. The matrix effect in the elution regions of the biomarkers analyzed was estimated to be < 15% for all analytes. In (1) elution region for lyso-Gb<sub>1</sub> and lyso-Gb<sub>1</sub>-(<sup>13</sup>C<sub>6</sub>), as well as analogs -28, +14, +16 (A), and +30 Da. In (2) elution region for -12 (A), +2, +14, +16 (A), and +16 Da (B). In (3) elution region for polycyclic analog 390 Da, analogs -26, and -12 Da (B). In (4) elution region for analog +32 Da. In (5) polycyclic analogs 362 and 394 Da while polycyclic analog 366 Da elutes in the region (6).

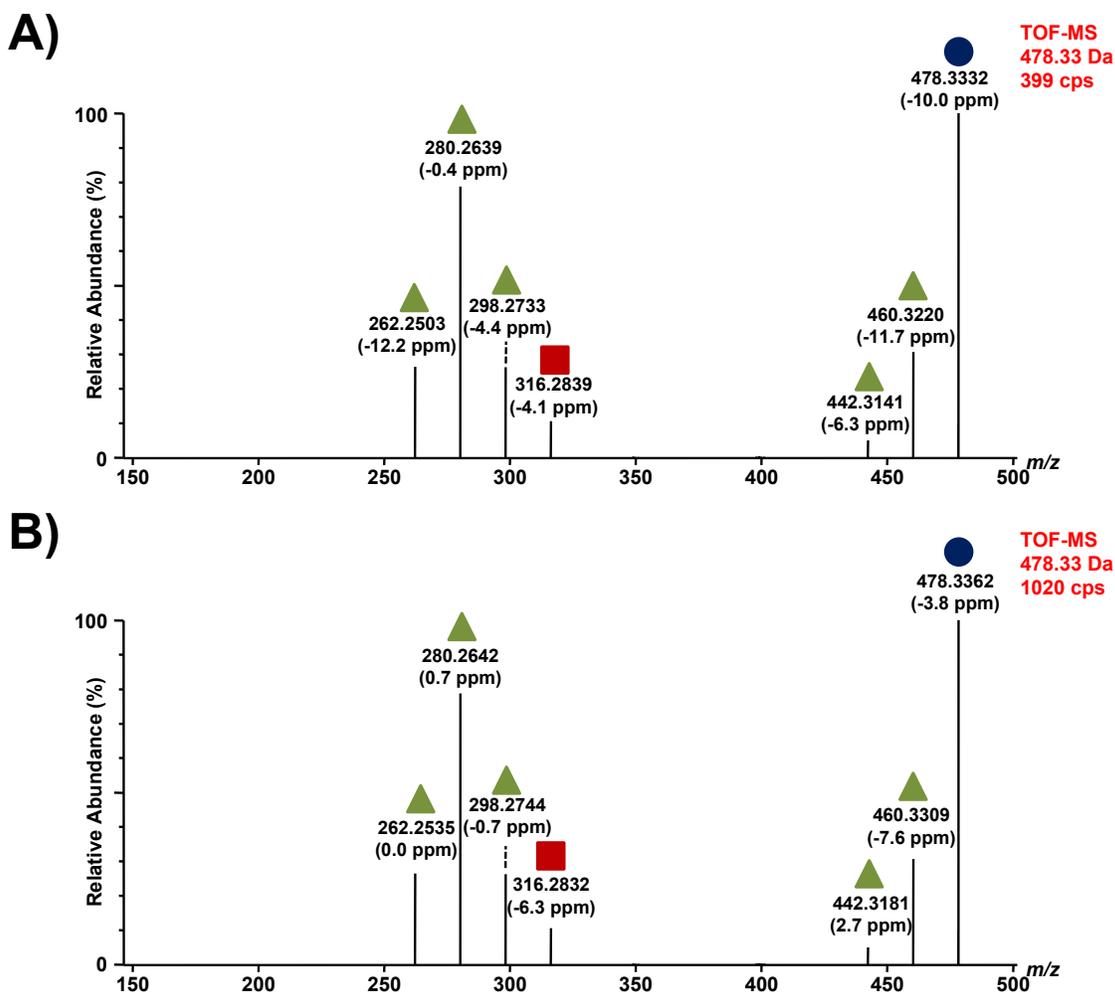
Regarding the lyso-Gb1 analog +14 Da, two peaks were visible in the chromatogram (Figure 3A). To assess if both compounds were indeed lyso-Gb1 analogs, fragmentation tests were performed using an Acquity UPLC (Waters Corp., Milford, Massachusetts) coupled to a time-of-flight mass spectrometer (Synapt G1, Waters Corp., Milford Massachusetts). The UPLC-MS-TOF parameters used are described in Supplementary Table 2, as well as in a previously published paper by our research group [22]. The collision energy ramp used specifically for metabolites discussed herein ranges from 15 to 25 V. These tests reveal that both compounds were indeed isoforms of the same molecule since both metabolites produced similar fragments in almost identical relative abundances (Figure 5). Therefore, both peaks were considered as lyso-Gb<sub>1</sub> analog +14 Da.



**Figure 5.** Fragmentation of lyso-Gb<sub>1</sub> analogs +14 Da: A) fragments obtained from the metabolite with a retention time of 5.30 min; B) fragments obtained from the metabolite with a retention time of 5.53 min; in both A) and B), the precursor ion is indicated by a purple circle, a green triangle shows a loss of a water molecule, and a red square indicates a loss of a sugar unit. Parts per million (ppm) refers to the difference between experimentally measured masses (accurate mass) and theoretical masses (exact mass). CPS refers to the number of counts per second.

The metabolomic study performed in GD patient urine specimens revealed the existence of a metabolite with two similar transitions for lyso-Gb<sub>1</sub> analog +16 Da [22]. More specifically, for these analogs, accurate masses of 478.3357 Da and 478.3008 Da

were obtained. As suspected, fragmentation tests performed on these two molecules revealed that they are indeed structurally different [22]. To avoid any confusion when referring to these two metabolites, they were distinguished as lyso-Gb<sub>1</sub> analog +16 Da (A; 478.3357 Da; C<sub>24</sub>H<sub>48</sub>NO<sub>8</sub>) and (B; 478.3008 Da; C<sub>23</sub>H<sub>44</sub>NO<sub>9</sub>). Therefore, this nomenclature was used thereafter. As shown in Figure 3A, several peaks with retention times from 5.43 to 5.56 min were detected. Fragmentation tests were made to assess if these peaks are structural isomers of analog +16 Da (A) or if they are entirely different molecules as previously noticed with analog +16 Da (B). UPLC-TOF/MS results are shown in Supplementary Table 2. The collision energy ramp used for the fragmentation tests ranged from 15 to 25 V. These fragmentation tests showed the same profile for both peaks and therefore peaks with retention time [5.43-5.56] min were quantitated as the analog +16 Da (A) (Figure 6).



**Figure 6.** Fragmentation of lyso-Gb<sub>1</sub> analogs +16 Da. In A) fragments from the metabolite with a retention time of 5.43 min; B) fragments obtained from the metabolite with a retention time of 5.65 min; in both A) and B), the molecular ion is indicated by a purple circle, a green triangle shows a loss of a water molecule, and a red square indicates a loss of a sugar unit. CPS: counts per second. Parts per million (ppm) refers to the difference between experimentally measured masses (accurate mass) and theoretical masses (exact mass).

Two chromatographic peaks were observed for analog -12 Da as shown in Figure 3A. Both peaks were flagged as potential biomarkers for GD during the metabolomic study performed in urine. These two metabolites had respective accurate masses of 450.2702 Da and 450.3007 Da.



Unfortunately, due to its limited concentration in samples and the presence of contaminants with similar retention times, it was only possible to find the peak associated with this metabolite with an accurate mass of 450.3007 Da when analyzed by MS/TOF. Since the precursor ion could not be found for the metabolite of 450.2702 Da, it was not possible to perform fragmentation tests for that specific molecule.

However, the metabolomic study performed previously revealed an increase amongst GD patients while the metabolite was not detectable in most healthy controls (see Supplemental Figure 1) [22]. To be more specific, there was one healthy control out of 15 who appeared to have an elevation of this metabolite. However, a more in-depth analysis revealed that this increase was caused by a contaminant with a similar mass and retention time. Indeed, the accurate mass measured for the contaminant was 450.3189 Da, which differs from the accurate mass observed for lyso-Gb<sub>1</sub> analog -12 Da (A; 450.2702 Da) and (B; 450.3007 Da). These masses for lyso-Gb<sub>1</sub> analog -12 Da suggest an elemental composition of C<sub>21</sub>H<sub>40</sub>NO<sub>9</sub> and C<sub>22</sub>H<sub>44</sub>NO<sub>8</sub>, for (A) and (B) respectively, both of which are compatible with the lyso-Gb<sub>1</sub> analog potential structures. Additionally, accurate masses and exact masses differ by -0.2 ppm and -13.3 ppm respectively for metabolites (A) and (B). Additionally, both molecules appear to be more increased in patients severely affected in our cohort, and it decreases upon treatment by ERT. Hence, we have decided to quantify these metabolites individually and refer to them as lyso-Gb<sub>1</sub> analogs -12 (A; 450.2702 Da) and (B; 450.3007 Da). A shoulder peak was also visible for lyso-Gb<sub>1</sub> analogs -26 and +30 Da (Figure 3A). Regarding the analog +30 Da, similar to the analog -12 Da, a second metabolite with an accurate mass of 492.3148 Da was flagged during the metabolomic study in urine [22]. This is relatively close to the accurate mass measured for the other, more abundant metabolite (492.3159 Da) and thus does not suggest different empirical formulas for these two molecules. Again, due to its limited concentration level, it was not possible to find a peak associated with this metabolite during fragmentation tests. However, the quantitation of both metabolites using a more sensitive mass spectrometer instrument (Xevo TQ-S, Waters Corp., Milford, Massachusetts) showed that the ratio between the two isomers seems relatively constant in samples. We, therefore, decided to include this shoulder peak as part of the analog +30 Da. Finally, the potential isomer for the analog -26 Da, was not observed during the metabolomic study. However, this marker is present in

GD samples only, potentially excluding the hypothesis that it may be a contaminant. Moreover, its concentration appears related to the abundance of the dominant chromatographic peak observed for analog -26 Da. Indeed, in the vast majority of samples analyzed, the ratio between the shoulder peak and the peak itself appears relatively constant. We have therefore decided to include this potential isomer as part of lyso-Gb<sub>1</sub> analog -26 Da.

### 3.2. Method Validation

The method was validated using urine samples spiked with various concentrations of lyso-Gb<sub>1</sub>. As mentioned previously, there are no commercially available standards or isotopically labelled standards for lyso-Gb<sub>1</sub> analogs. Therefore, to quantify these molecules, we had to select a commercially available standard with similar chemical properties such as the pKa of the ionization sites, and overall similar structures. Considering the closely related chemical and physical properties of lyso-Gb<sub>1</sub> and all related analogs, these latter compounds were quantified using the lyso-Gb<sub>1</sub> standard. Therefore, the method validation was done for all lyso-Gb<sub>1</sub> related compounds using lyso-Gb<sub>1</sub> standards, as we expect similar results for both types of molecules. Results obtained for each validation parameter are shown in Table 2. Limits of detection and limits of quantitation for lyso-Gb<sub>1</sub>, lyso-Gb<sub>1</sub> analogs and polycyclic analogs are shown in Table 3. Detailed results regarding intraday and interday precision and accuracy results for QCs and the stabilities of all metabolites are shown in Supplementary Tables 3 to 5. Considering that creatinine may be quite abundant in some urine samples and that an isotopically labelled internal standard (creatinine-D<sub>3</sub>) was used, parameters such as the limit of quantification (LOQ), the limit of detection (LOD), and the recovery were not evaluated. The adhesion of lyso-Gb<sub>1</sub> analogs and polycyclic analogs to glass- and plasticware was not significant considering that the variations from baseline values ranged from -3.7% to 1.2%.

**Table 2.** Method validation parameters using lyso-Gb<sub>1</sub> and creatinine standards.

Validation parameter	Results	
	Lyso-Gb <sub>1</sub>	Creatinine
Average intraday precision (RSD*) (n=15)	2.9%	2.0%
Average intraday accuracy (Bias) (n=15)	3.8%	3.0%
Average interday precision (RSD*) (n=15)	5.3%	3.9%
Average interday accuracy (Bias) (n=15)	4.2%	4.3%
Calibration curve** (n=5)	r <sup>2</sup> > 0.998	r <sup>2</sup> > 0.998
Stability*** at -30°C	At least a month	At least a month
Stability*** at 4°C	7 Days	7 Days
Stability*** at room temperature	48 h	72 h
Stability in the sample organizer (10°C)	48 h	48 h
Freeze/Thaw (3 cycles) (Bias)	7.6%	5.3%
Glassware adhesion (Bias)	4.2%	2.2%
Plasticware adhesion (Bias)	5.8%	3.1%

\*RSD: Relative Standard Deviation.

\*\*r<sup>2</sup> refers to Pearson's correlation coefficient.

\*\*\* Stability is defined by less than 15% variability from baseline values.

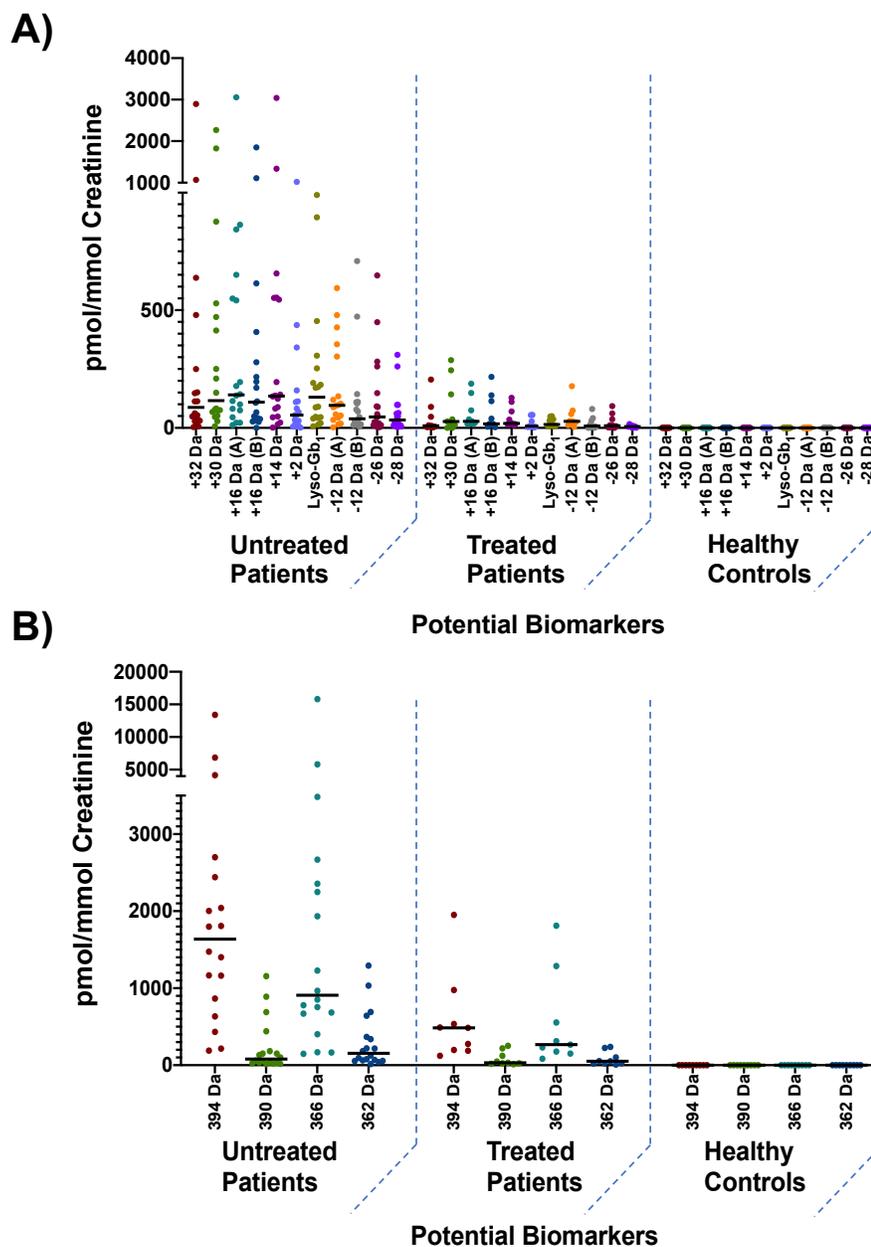
**Table 3.** Method validation results for lyso-Gb<sub>1</sub> analogs and polycyclic analogs.

Biomarker	Parameters						
	LOD (pM)	LOQ (pM)	Intraday precision (%RSD)		Interday precision (%RSD)		Recovery (%)
			LQC	HQC	LQC	HQC	
Lyso-Gb <sub>1</sub> -28 Da	56	186	ND*	9.5	ND*	14.3	82.5
Lyso-Gb <sub>1</sub> -26 Da	108	360	5.3	10.9	11.9	11.3	87.6
Lyso-Gb <sub>1</sub> -12 Da	106	354	1.8	6.5	10.6	8.2	78.9
Lyso-Gb <sub>1</sub> -12 Da (B)	98	328	11.2	5.3	14.8	11.3	81.3
Lyso-Gb <sub>1</sub> +2 Da	101	337	7.8	6.9	12.2	8.5	82.3
Lyso-Gb <sub>1</sub> +14 Da	84	283	6.2	7.6	8.5	7.2	72.1
Lyso-Gb <sub>1</sub> +16 Da	105	351	6.9	2.1	15.9	11.1	78.9
Lyso-Gb <sub>1</sub> +16 Da (B)	89	296	7.7	10.9	6.7	10.5	85.0
Lyso-Gb <sub>1</sub> +30 Da	95	317	9.7	6.1	11.1	6.5	91.2
Lyso-Gb <sub>1</sub> +32 Da	90	301	5.1	8.6	8.2	13.0	80.0
Polycyclic Analog 362 Da	105	305	3.3	5.6	6.9	4.7	98.3
Polycyclic Analog 366 Da	94	314	21.1	12.7	37.9	33.7	51.8
Polycyclic Analog 390 Da	109	364	5.2	4.2	21.6	15.3	82.8
Polycyclic Analog 394 Da	91	303	18.3	9.2	23.3	21.4	65.5

\*ND: Not Detected.

### 3.3. Biomarker Quantitation

Patients and controls were separated into three different groups namely untreated GD patients (n=18), treated GD patients (n=9), and healthy controls (n=9) as shown in Figure 7. Patients in the treated group were under ERT for at least six months.



**Figure 7.** Distribution of: A) lyso-Gb<sub>1</sub> and analogs +32, +30, +16 (A) and (B), +14, +2, -12 (A) and (B), -26, as well -28 Da; and B) Distribution of polycyclic analogs 394, 390, 366, and 362 Da in untreated (n=18), treated (n=9) and healthy controls (n=9). The median concentration for each potential biomarker is indicated by a horizontal black bar.

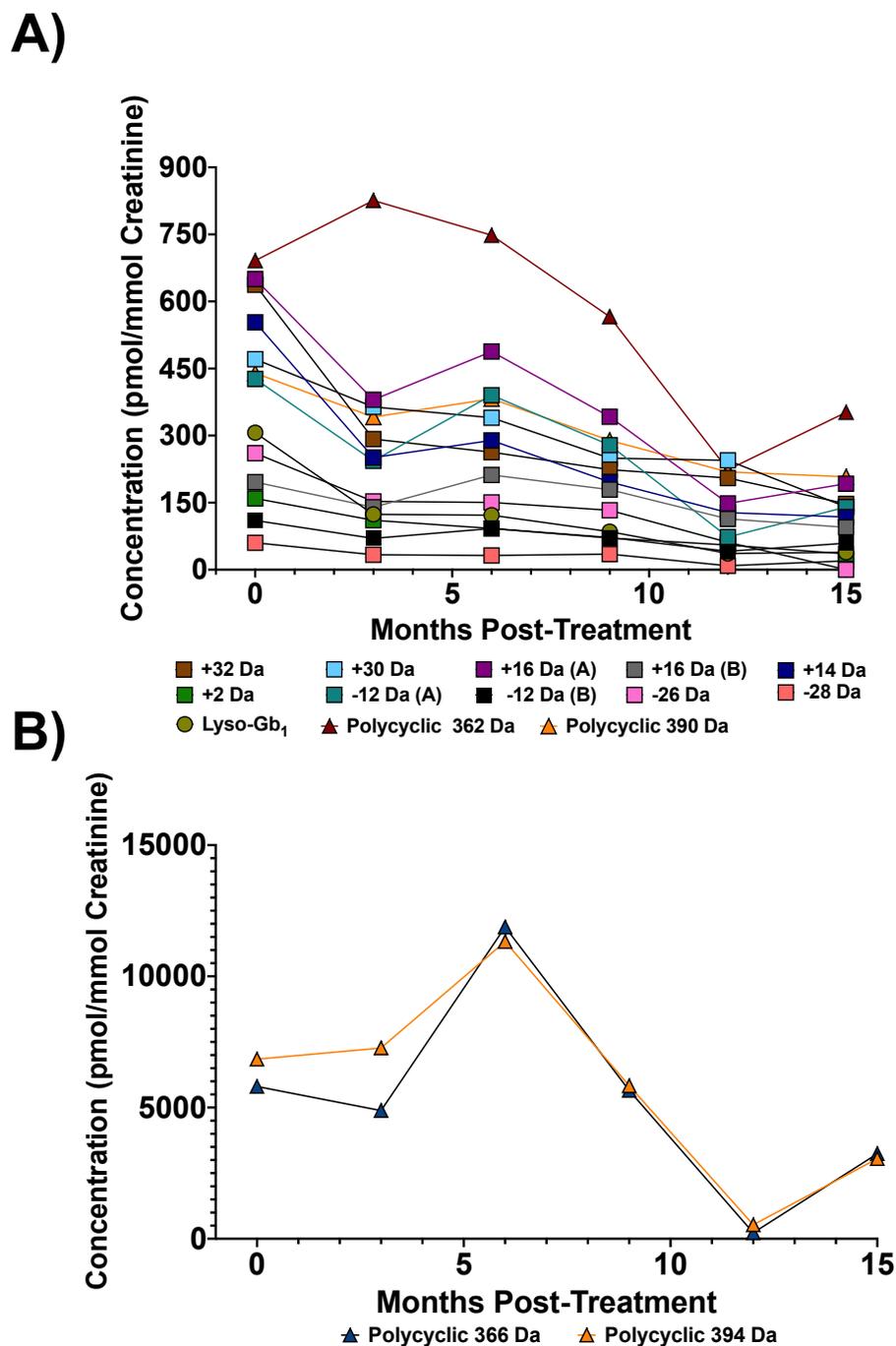
All untreated GD patients but two had disease severity that could be qualified as "borderline to mild" based on the GD type 1 severity scoring system proposed by Weinreb *et al.* in 2010. The patients ( $n = 3$ ) who were classified as "moderate or marked" with a score ranging from 3-9, did show a higher level of biomarkers, especially for analogs +32, +30, +16 (B), +2 Da, as well as polycyclic analogs 394, and 366 Da. Unfortunately, considering the limited number of patients affected by a more severe form of the disease in our cohort, it is not possible to confirm if these markers have indeed a significant correlation with the overall disease severity.

Biomarker quantitation showed that all proposed biomarkers were either not detected or below the limit of quantification in healthy controls. As expected, and confirmed by the Mann-Whitney U test, all biomarkers under study had a statistically significant difference in both GD groups (treated and untreated) from the control group at  $p < 0.01$ . Regarding treated and untreated patients, lyso-Gb<sub>1</sub>, as well as lyso-Gb<sub>1</sub> analogs +32, +14, -28 Da, and polycyclic analog 394 Da, were the only biomarkers that showed a statistically significant difference between treated and untreated patients at  $p < 0.01$ . The  $p$ -values associated with each group are summarized in Supplementary Tables 6 and 7. While these data suggest that the aforementioned metabolites may be more sensitive for patient follow-up and monitoring, we would like to emphasize that most untreated patients in our cohort had an attenuated form of the disease. Based on studies done on other LSDs, it was demonstrated that even after treatment with ERT, residual levels of biomarkers are still present in tissues and biological fluids [26]. Patients classified as "borderline to mild" typically do not have an important concentration of biomarkers, whereas, for patients who are treated, biomarkers levels never truly return to baseline values such as those observed in healthy controls. This might be the reason why only a few biomarkers had a statistically significant difference between treated and untreated patients. A larger cohort with a wider range of disease severity would be required to fully investigate this hypothesis and to confirm if some metabolites are more reliable for follow-up and monitoring of patients than others. Out of the 18 untreated patients in our cohort, two were characterized as having moderate disease severity while the rest were characterized as having a very attenuated disease severity. More specifically, these patients displayed numerous clinical manifestations such

as bone pain, Erlenmeyer flask deformity, infarction, and avascular necrosis. Cytopenia and organomegaly were also observed. Both patients did have a bone marrow burden score between six and eight for both lower limb and spine. These patients also had significantly higher concentration levels of most biomarkers than other patients classified as "borderline to mild". In fact, out of the 14 potential biomarkers under study, only two, namely polycyclic analogs 366 and 394 Da were not significantly more elevated in these two patients compared to other GD patients affected by a less severe form of the disease. Unfortunately, while these data suggest that lyso-Gb<sub>1</sub> and most analogs could correlate with disease severity, it is not possible, at this point, to confirm which metabolite has a significant correlation with the severity of GD. A larger cohort of untreated patients with a wider range of severity will be needed to fully investigate this.

#### *3.4. Biomarker Concentrations upon Treatment*

Three patients in our cohort had extended follow-up (15 months, 6 timepoints) post-ERT. As expected, a decreasing trend in biomarker levels was seen following treatment (Figure 8). Clinical data regarding organomegaly and cytopenia associated with each time point is shown in Table 4.



**Figure 8.** Biomarker concentration levels post-ERT treatment in a 55-year-old female GD type 1 patient with p.N370S/D409H mutations: A) Concentration variation levels post-ERT for lyso-Gb<sub>1</sub>, lyso-Gb<sub>1</sub> analogs +32, +30, +16 (A), +16 (B), +14, +2, -12 (A) and (B), -26, and -28 Da, as well as polycyclic analogs 390 and 362 Da; B) Concentration variation levels post-ERT for polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> 394 and 366 Da.

**Table 4.** Clinical data for 55-year-old female GD type 1 patient post-ERT.

<b>Months post-ERT</b>	<b>Platelet Count (x10<sup>3</sup> mm<sup>3</sup>)</b>	<b>Hemoglobin (g/dl)</b>	<b>Liver Volume (by MRI*)</b>	<b>Spleen Volume (by MRI*)</b>
0	94	12.9	1666	976
3	105	13.3	-	-
6	136	13.0	1200	750
9	185	13.8	-	-
12	184	13.9	1302	570
15	124	14.5	-	-

\*MRI: Magnetic Resonance Imaging.

While not always linear, a decreasing trend was observed for most biomarkers 15 months after treatment. The biomarker variation for two other patients with a longitudinal follow-up also showed a similar phenomenon, with an overall decreasing trend but not necessarily in a constant linear fashion (Supplementary Figures 2 and 3). Studies done on other diseases tend to demonstrate a certain variability in urinary biomarker concentration levels. For Fabry disease, the authors hypothesized that biomarker level variability can be related to physical activity, food intake, and water consumption [29]. Regarding other treated patients in our cohort without a longitudinal follow-up (n = 20), a decrease in biomarker levels 3 months post-ERT was noticed. However, more data from treated patients affected by a wider range of severity will be needed to assess the reliability of the biomarkers studied for follow-up purposes. Indeed, considering that our cohort was mostly from patients affected by a less severe form of the disease, a decrease in biomarkers may have not been as noticeable as in a patient with a more severe form of the disease with higher concentration levels of biomarkers.

Moreover, although plasma quantitation of biomarkers was found to be a reliable method for the follow-up of patients, we believe that urine specimens might also be helpful for a biomarker evaluation as part of a biochemical profile for GD patients. Indeed, urine collection is much less invasive than blood collection. Moreover, collection techniques could potentially be developed where patients would use a filter paper to collect a urine sample at home and send it by regular mail to the appropriate facility. This would facilitate the follow-up of patients without requiring the patient to go to the hospital or collection centers. In fact, filter paper methods have already been developed for other LSDs such as Fabry disease and mucopolysaccharidoses [30-33].



#### **4. Conclusions**

A metabolomic study allowed us to identify and elucidate the chemical structure of these new potential metabolites for GD patients [22]. In this latter study, we used a UPLC-QTOF, which has a better mass accuracy but is significantly less sensitive for targeted analyses than the triple quadrupole mass spectrometer used in the current manuscript. The gain in precision during the metabolomic study was a valuable tool for the structural elucidation process of the highlighted metabolites. In comparison, the focus of this current manuscript was to develop a sensitive and rapid method to quantify the metabolites highlighted in the metabolomic study. Following the detection of potential GD biomarkers in urine, we have developed and validated a novel UPLC-MS/MS method to perform the quantitation of these metabolites of interest. Once validated using available commercial standards, this method aimed to investigate potential correlations between biomarker levels and clinical manifestations related to GD. Our data revealed that all biomarkers under study were significantly elevated in GD patients compared to healthy controls. A significant decrease in most biomarkers was noticed at the three or six months visit post-treatment. Although these preliminary results are noteworthy, a larger cohort with patients having severe clinical manifestations is warranted to fully investigate the correlations between biomarker concentration levels and the severity of the disease displayed by patients. Regarding the three patients having longitudinal monitored treatment by ERT, a decreasing trend (although with variability), in most biomarker concentrations in a relatively short time (15 months) was observed, corresponding to an improvement in organomegaly and hematologic manifestations. In conclusion, it is strongly suggested to evaluate a profile of various types of GD biomarkers (e.g., biochemical and imaging) for efficient monitoring and follow-up of patients.

#### **5. Future perspectives**

The analysis of a larger cohort will be required to study the correlation between biomarker concentration levels and clinical manifestations of GD. Furthermore, a comparison between plasma biomarkers previously studied and the biomarkers discussed herein is needed to assess the strengths and weaknesses of both methods. Finally, different sampling collection procedures, such as urine collected on filter paper, will be investigated

in the near future considering the advantages for shipment and sample storage compared to “liquid” urine specimens.

## **6. Study limitations**

The lack of a standard and internal standard is a limitation for the polycyclic analog quantification. The use of more appropriate standards would surely improve the accuracy of the method regarding these polycyclic analogs as these new standards would better reflect the ionization potential and possibly correct the variability related to the sample preparation procedure. Another limitation in this study is the narrow range of severity of GD patients recruited. This has limited our ability to investigate potential correlations between biomarker concentration levels and clinical manifestations of the disease which would have increased the statistical power of the study.

**Supplementary Materials:** The following are available online at [www.mdpi.com/xxx/s1](http://www.mdpi.com/xxx/s1)

**Author Contributions:** I.M. was involved in the development and validation of the quantitative method, the sample preparation, analysis, data processing steps, and in the original draft preparation, reviewing, and editing processes of the manuscript. M.B. supervised the study and was involved in the manuscript drafting, editing, and revision process. A.A., F.E.M., P.B. and F.C. provided the samples and pertinent patient clinical information used for this study. He also reviewed the manuscript. C.A.-B. secured the resources and funding required for this study. She was also involved in the design and supervision of the study. Moreover, she participated in the interpretation of data, the drafting, editing, and revision of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Acknowledgments:** We are grateful to Waters Corporation for their technical expertise and support. Moreover, we would like to thank all the patients, nurses, coordinators, and physicians who participated in this project.

**Conflicts of Interest:** This research project was funded by Shire/Takeda Pharmaceutical under a collaborative research agreement. C. Auray-Blais received research grants and honoraria from Shire/Takeda Pharmaceutical. M. Boutin received a salary from Shire/Takeda Pharmaceutical. F.E. Mercier was paid for an advisory board by Sanofi-

Genzyme. P. Bauer is the Chief Genomic Officer at Centogene GmbH and F. Curado is a clinical project manager at Centogene GmbH. I. Menkovic received a student stipend from Shire/Takeda Pharmaceutical. A. Alayoubi does not have any conflicts of interest.

## References

1. Dandana, A.; Ben Khelifa, S.; Chahed, H.; Miled, A.; Ferchichi, S. (2016). Gaucher Disease: Clinical, Biological and Therapeutic Aspects. *Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology*, 83(1), 13–23.
2. Baris, H. N.; Cohen, I. J.; Mistry, P. K. (2014). Gaucher disease: the metabolic defect, pathophysiology, phenotypes and natural history. *Pediatric Endocrinology Reviews*, 12 Suppl 1(0 1), 72–81.
3. Rowland, R. J.; Chen, Y.; Breen, I.; Wu, L.; Offen, W. A.; Beenakker, T. J.; Su, Q.; van den Nieuwendijk, A.; Aerts, J.; Artola, M.; Overkleeft, H. S.; Davies, G. J. (2021). Design, Synthesis and Structural Analysis of Glucocerebrosidase Imaging Agents. *Chemistry*, 27(66), 16377–16388.
4. Zhang, P.; Zheng, M. F.; Cui, S. Y.; Zhang, W.; Gao, R. P. (2021). Ambroxol chaperone therapy for Gaucher disease type I-associated liver cirrhosis and portal hypertension: a case report. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*, 10.2174/1871530321666211119145230.
5. Mistry, P. K.; Lopez, G.; Schiffmann, R.; Barton, N. W.; Weinreb, N. J.; Sidransky, E. (2017). Gaucher disease: Progress and ongoing challenges. *Molecular Genetics and Metabolism*, 120(1-2), 8–21.
6. Stirnemann, J.; Belmatoug, N.; Camou, F.; Serratrice, C.; Froissart, R.; Caillaud, C.; Levade, T.; Astudillo, L.; Serratrice, J.; Brassier, A.; Rose, C.; Billette de Villemeur, T.; Berger, M. G. (2017). A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 441.
7. Schiffmann, R.; Sevigny, J.; Rolfs, A.; Davies, E. H.; Goker-Alpan, O.; Abdelwahab, M.; Vellodi, A.; Mengel, E.; Lukina, E.; Yoo, H. W.; Collin-Histed, T.; Narita, A.; Dinur, T.; Revel-Vilk, S.; Arkadir, D.; Szer, J.; Wajnrajch, M.; Ramaswami, U.; Sidransky, E.; Donald, A.; Zimran, A. (2020). The definition of neuronopathic Gaucher disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 43(5), 1056–1059.

8. Deegan, P.; Fernandez-Sasso, D.; Giraldo, P.; Lau, H.; Panahloo, Z.; Zimran, A. (2018). Treatment patterns from 647 patients with Gaucher disease: An analysis from the Gaucher Outcome Survey. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 68, 218–225.
9. Gumus, E.; Karhan, A. N.; Hizarcioglu-Gulsen, H.; Demir, H.; Ozen, H.; Saltik Temizel, I. N.; Dokmeci Emre, S.; Yuce, A. (2021). Clinical-genetic characteristics and treatment outcomes of Turkish children with Gaucher disease type 1 and type 3: A sixteen year single-center experience. *European Journal of Medical Genetics*, 64(11), 104339.
10. Riboldi, G. M.; Di Fonzo, A. B. (2019). GBA, Gaucher Disease, and Parkinson's Disease: From Genetic to Clinic to New Therapeutic Approaches. *Cells*, 8(4), 364.
11. Ramadža, D. P.; Zekušić, M.; Žigman, T.; Škaričić, A.; Bogdanić, A.; Mustać, G.; Bošnjak-Nadž, K.; Ozretić, D.; Ohno, K.; Fumić, K.; Barić, I. (2021). Early initiation of ambroxol treatment diminishes neurological manifestations of type 3 Gaucher disease: A long-term outcome of two siblings. *European Journal of Paediatric Neurology*, 32, 66–72.
12. Zimran, A.; Gonzalez-Rodriguez, D. E.; Abrahamov, A.; Elstein, D.; Paz, A.; Brill-Almon, E.; Chertkoff, R. (2015). Safety and efficacy of two dose levels of taliglucerase alfa in pediatric patients with Gaucher disease. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 54(1), 9–16.
13. Sam, R.; Ryan, E.; Daykin, E.; Sidransky, E. (2021). Current and emerging pharmacotherapy for Gaucher disease in pediatric populations. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 22(11), 1489–1503.
14. Thomas, A. S.; Mehta, A. B.; Hughes, D. A. (2013). Diagnosing Gaucher disease: an on-going need for increased awareness amongst haematologists. *Blood Cells Mol Dis*. 50(3), 212–217.
15. Gary, S. E.; Ryan, E.; Steward, A. M.; Sidransky E. (2018). Recent advances in the diagnosis and management of Gaucher disease. *Expert Rev Endocrinol Metab*. 13(2), 107–118.
16. Giraldo, P.; López de Frutos, L.; Cebolla, J. J. (2018) Biomarker combination is necessary for the assessment of Gaucher disease? *Ann Transl Med*. 6(Suppl 1), S81.

17. Danilov, S. M.; Tikhomirova, V. E.; Metzger, R.; Naperova, I. A.; Bukina, T. M.; Goker-Alpan, O.; Tayebi, N.; Gayfullin, N. M.; Schwartz, D. E.; Samokhodskaya, L. M.; Kost, O. A.; Sidransky, E. (2018). ACE phenotyping in Gaucher disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 123(4), 501–510.
18. van Dussen, L.; Lips, P.; Everts, V. E.; Bravenboer, N.; Jansen, I. D.; Groener, J. E.; Maas, M.; Blokland, J. A.; Aerts, J. M.; Hollak, C. E. (2011). Markers of bone turnover in Gaucher disease: modeling the evolution of bone disease. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(7), 2194–2205.
19. Mistry, P. K.; Cappellini, M. D.; Lukina, E.; Ozsan, H.; Mach Pascual, S.; Rosenbaum, H.; Helena Solano, M.; Spigelman, Z.; Villarrubia, J.; Watman, N. P.; Massenkeil, G. (2011). A reappraisal of Gaucher disease-diagnosis and disease management algorithms. *American Journal of Hematology*, 86(1), 110–115.
20. Arkadir, D.; Dinur, T.; Revel-Vilk, S.; Becker Cohen, M.; Cozma, C.; Hovakimyan, M.; Eichler, S.; Rolfs, A.; Zimran, A. (2018). Glucosylsphingosine is a reliable response biomarker in Gaucher disease. *American Journal of Hematology*, 93(6), E140–E142.
21. Revel-Vilk, S.; Fuller, M.; Zimran, A. (2020). Value of Glucosylsphingosine (Lyso-Gb<sub>1</sub>) as a Biomarker in Gaucher Disease: A Systematic Literature Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7159.
22. Menkovic, I.; Boutin, M.; Alayoubi, A.; Curado, F.; Bauer, P.; Mercier, F. E.; Auray-Blais, C. (2022). Metabolomic Study Using Time-of-Flight Mass Spectrometry Reveals Novel Urinary Biomarkers for Gaucher Disease Type 1. *Journal of Proteome Research*, 10.1021.
23. Menkovic, I.; Boutin, M.; Alayoubi, A.; Mercier, F. E.; Rivard, G. É.; Auray-Blais, C. (2020). Identification of a Reliable Biomarker Profile for the Diagnosis of Gaucher Disease Type 1 Patients Using a Mass Spectrometry-Based Metabolomic Approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 7869.
24. Mirzaian, M., Wisse, P., Ferraz, M. J., Gold, H., Donker-Koopman, W. E., Verhoek, M., Overkleeft, H. S., Boot, R. G., Kramer, G., Dekker, N., Aerts, J. M. (2015). Mass spectrometric quantification of glucosylsphingosine in plasma and urine of type 1

- Gaucher patients using an isotope standard. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 54(4), 307–314.
25. Auray-Blais, C.; Boutin, M.; Gagnon, R.; Dupont, F. O.; Lavoie, P.; Clarke, J. T. (2012). Urinary globotriaosylsphingosine-related biomarkers for Fabry disease targeted by metabolomics. *Analytical Chemistry*, 84(6), 2745–2753.
  26. Yazd, H. S.; Bazargani, S. F.; Vanbeek, C. A.; King-Morris, K.; Heldermon, C.; Segal, M. S.; Clapp, W. L.; Garrett, T. J. (2021). LC-MS lipidomics of renal biopsies for the diagnosis of Fabry disease. *Journal of Mass Spectrometry and Advances in the Clinical Lab*, 22, 71–78.
  27. Auray-Blais, C.; Lavoie, P.; Boutin, M.; Ntwari, A.; Hsu, T. R.; Huang, C. K.; Niu, D. M. (2017). *Clinica Chimica Acta*, 466, 185–193.
  28. Menkovic, I.; Lavoie, P.; Boutin, M.; Auray-Blais, C. (2019). Distribution of heparan sulfate and dermatan sulfate in mucopolysaccharidosis type II mouse tissues pre- and post-enzyme-replacement therapy determined by UPLC-MS/MS. *Bioanalysis*, 11(8), 727–740.
  29. Boutin, M.; Lavoie, P.; Menkovic, I.; Toupin, A.; Abaoui, M.; Elidrissi-Elawad, M.; Arthus, M. F.; Fortier, C.; Ménard, C.; Maranda, B.; Bichet, D. G.; Auray-Blais, C. (2020). Diurnal Variation of Urinary Fabry Disease Biomarkers during Enzyme Replacement Therapy Cycles. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6114.
  30. Auray-Blais, C.; Cyr, D.; Mills, K.; Giguère, R.; Drouin, R. (2007). Development of a filter paper method potentially applicable to mass and high-risk urinary screenings for Fabry disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 30(1), 106.
  31. Auray-Blais, C.; Lavoie, P.; Boutin, M.; Abaoui, M. (2017). High-Risk Screening for Fabry Disease: Analysis by Tandem Mass Spectrometry of Globotriaosylceramide (Gb<sub>3</sub>) in Urine Collected on Filter Paper. *Current Protocols in Human Genetics*, 93, 17.26.1–17.26.12.
  32. Auray-Blais, C.; Collerette-Tremblay, J.; Lavoie, P. (2018). UPLC–MS/MS analysis of keratan sulfate from urine samples collected on filter paper for monitoring & follow-up of Morquio A patients. *Bioanalysis*, 10(15), 1181–1192.

33. Auray-Blais, C.; Lavoie, P.; Zhang, H.; Gagnon, R.; Clarke, J. T.; Maranda, B.; Young, S. P.; Millington, D. S. (2012). An improved method for glycosaminoglycan analysis by LC-MS/MS of urine samples collected on filter paper. *Clinica Chimica Acta*, 413(7-8), 771–778.

**Supplementary Table 1.** Creatinine quantification parameters using an Acquity UPLC coupled to a Synapt G1 TOF-MS.

Parameters	Description
<b>Chromatographic parameters</b>	
HPLC Column	BEH HILIC
Column Dimension	2.1x 500 mm
Particle Size	1.7 $\mu$ m
Weak Wash Solvent	ACN
Strong Wash Solvent	H <sub>2</sub> O
Injection Mode	Partial Loop Injection
Injection Volume	2 $\mu$ l
Mobile Phase A	ACN
Mobile Phase B	99.5:0.5H <sub>2</sub> O:FA + 50 mM Amm. Form.
Flow rate	0.5 ml/min
Gradient (% Mobile Phase B)	0 $\rightarrow$ 1 min: 5%
	1 $\rightarrow$ 3 min: 85% (linear gradient)
	3 $\rightarrow$ 5 min: 50% (linear gradient)
	5 $\rightarrow$ 6 min: 50%
	6 $\rightarrow$ 7 min: 5% (linear gradient)
7 $\rightarrow$ 10 min: 5%	
<b>Mass spectrometry parameters</b>	
Scan Mode	MS-TOF
Ionization Mode	Positive Electrospray Ionization (ESI+)
Analyzer Mode	V
Dynamic Range	Extended
Capillary Voltage	2.0 kV
Sampling Cone Voltage	25 V
Extraction Cone Voltage	5.0 V
Source Temperature	150°C
Desolvation Temperature	450°C
Cone Gas Flow	30 l/h
Desolvation Gas Flow	700 l/h
Trap Collision Energy	6.0 V
Transfer Collision Energy	4.0 V
Data	Format
Mass Range	50 to 1000 Da
Scan Time	0.2 s



**Supplementary Table 2.** MS-TOF Parameters used for fragmentation tests of lyso-Gb<sub>1</sub> analogs -12 and +16 Da

<b>Mass Spectrometry Parameters</b>		<b>Lock Mass Parameters</b>	
Scan Mode	MS-TOF	Compound	Terfenadine
Ionization Mode	ESI	Concentration	12.5 nM
Polarity	Positive	Exact Mass	472.3215 Da
Analyzer Mode	V	Solvent	94.5:5:0.5 H <sub>2</sub> O:ACN:FA
Dynamic Range	Extended	Scan Time	0.5 s
Capillary Voltage	1.4 kV	Interval	5.0 s
Sampling Cone Voltage	10 V	Sampling Cone Voltage	5 V
Extraction Cone Voltage	5.0 V	Trap Collision Energy	10 V
Source Temperature	150°C	Mass Window	+/- 0.2 Da
Desolvation Temperature	450°C	Scan Average	3
Cone Gas Flow	30 l/h		
Desolvation Gas Flow	700 l/h		
Transfer Collision Energy	2.0 V		
Data Format	Centroid		
Mass Range	50 to 1000 Da		
Scan Time	0.1 s		

**Supplementary Table 3.** Low (LQC), medium (MQC), and high (HQC) quality control samples precision and accuracy results for intra- and interday analyses

Analyte	Precision (RSD%)						Accuracy (Bias%)					
	Intraday (n=5)			Interday (n=5)			Intraday (n=5)			Interday (n=5)		
	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC
Lyso-Gb <sub>1</sub>	0.8	4.2	3.7	7.0	4.4	4.2	4.0	3.7	3.8	5.4	3.7	3.3
Creatinine	3.1	1.4	1.6	8.2	1.7	1.8	2.6	4.9	1.6	6.6	4.8	1.5

**Supplementary Table 4.** Stability lyso-Gb<sub>1</sub> of in urine samples expressed in bias (%) after 24 hours, 48 hours, 1 week, and 1 month at -30°C, 4°C, and 22°C

Temperature	Stability Duration											
	24 hours			48 hours			1 week			1 month		
	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC
-30°C	3.9	6.2	4.1	6.8	1.9	4.8	-4.9	6.7	7.1	5.2	3.4	1.9
4°C	3.3	-2.7	-3.9	-1.2	3.5	8.8	-11.3	5.7	3.0	-	-	-
22°C	6.0	3.9	6.2	8.9	-6.1	4.0	16.1	-12.9	-15.6	-	-	-

**Supplementary Table 5.** Stability creatinine of in urine samples expressed in bias (%) after 24 hours, 48 hours, 1 week, and 1 month at -30°C, 4°C, and 22°C

Temperature	Stability Duration											
	24 hours			48 hours			1 week			1 month		
	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC
-30°C	5.7	3.9	1.2	2.9	4.3	6.1	-4.8	6.9	-2.6	-5.4	-3.2	8.1
4°C	8.4	-2.7	-0.7	5.5	2.2	7.3	3.9	-4.4	5.2	-	-	-
22°C	2.2	4.6	2.1	-7.1	-6.1	3.8	7.8	7.2	-6.3	-	-	-

**Supplementary Table 6.** Calculated biomarker *p*-values in treated, untreated severe, and attenuated GD patients as well as healthy controls using the non-parametric Mann-Whitney U test.

Group comparison	Biomarker <i>p</i> -values									
	Analog -28 Da	Analog -26 Da	Analog -12 Da (A)	Analog -12 Da (B)	Analog +2 Da	Analog +14 Da	Analog +16 Da (A)	Analog +16 Da (B)	Analog +30 Da	Analog +32 Da
Control/Untreated	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*
Control/Treated	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*
Treated/Untreated	< 0.001*	0.027	0.035	< 0.001*	0.015	0.009*	0.027	0.053	0.023	0.006*

Statistical significance was established at  $p < 0.01$

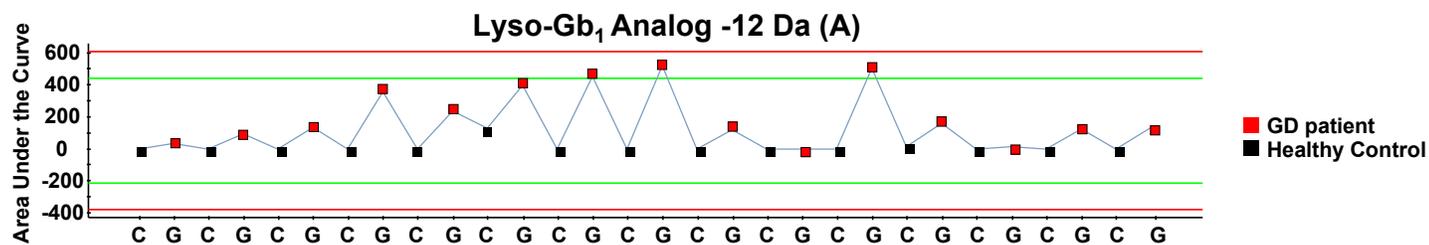
(\*) Shows a statistically significant difference between compared datasets

**Supplementary Table 7.** Calculated biomarker *p*-values in treated, untreated severe, and attenuated GD patients as well as healthy controls using the non-parametric Mann-Whitney U test.

Group comparison	Biomarker <i>p</i> -values				
	Lyso-Gb <sub>1</sub>	Polycyclic Analog 362 Da	Polycyclic Analog 366 Da	Polycyclic Analog 390 Da	Polycyclic Analog 394 Da
Control/Untreated	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*
Control/Treated	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*	< 0.001*
Treated/Untreated	0.004*	0.031	0.047	0.232	0.005*

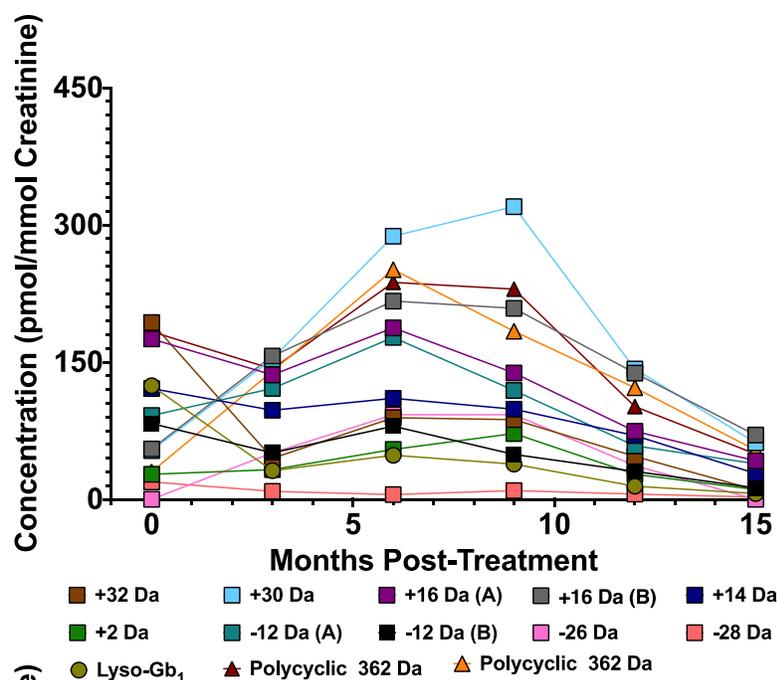
Statistical significance was established at  $p < 0.01$

(\*) Shows a statistically significant difference between compared datasets

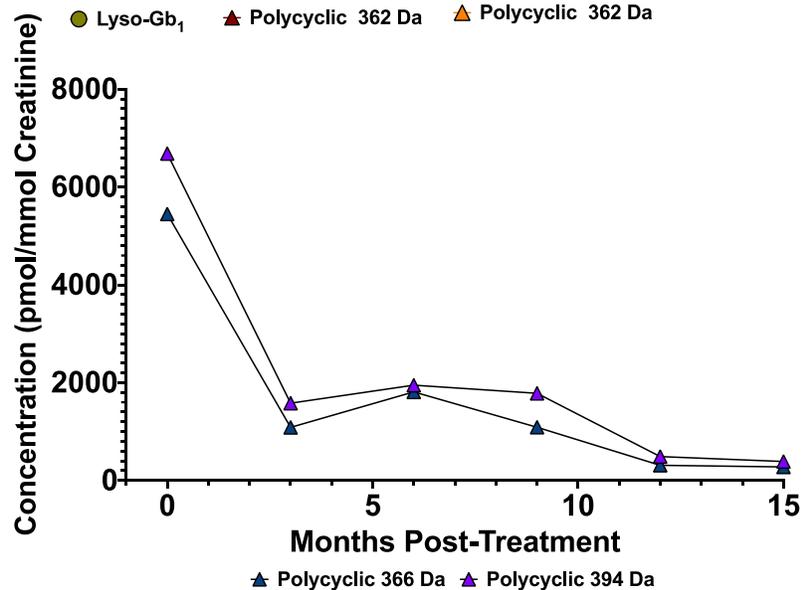


**Supplemental Figure 1.** Trendplot analysis of lyso-Gb<sub>1</sub> analog -12 Da (A) with a retention time of 5.92 min. The red square indicates a GD patient (n=15) and a black square indicates a healthy control (n=15). The red line indicates two standard deviations while the green line indicates one standard deviation.

A)

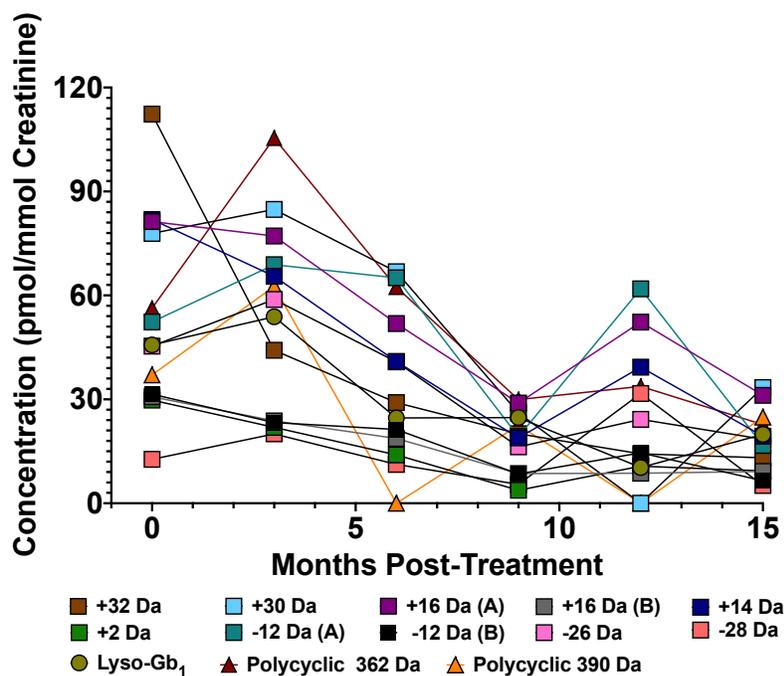


B)

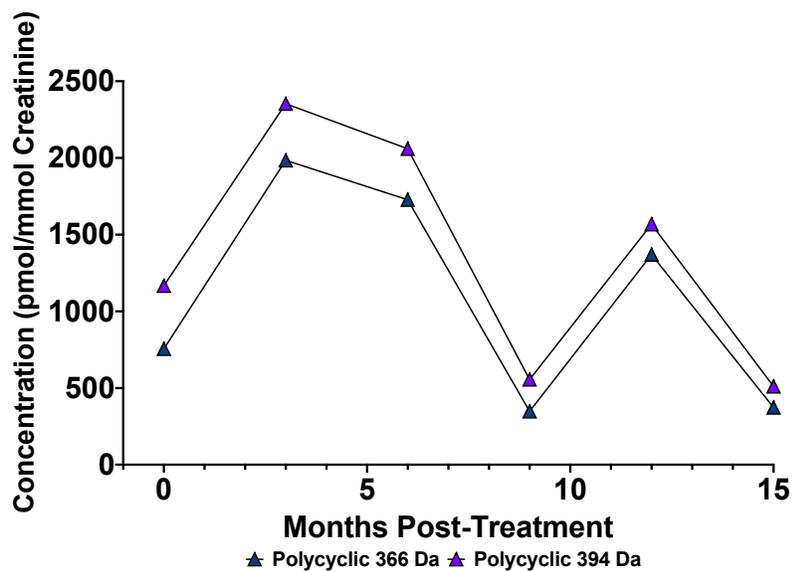


**Supplementary Figure 2.** Biomarker level variation following ERT treatment in a 55-year-old male GD type 1 patient p.N370S/D409H mutation. A) Concentration variation levels post-ERT for lyso-Gb<sub>1</sub>, lyso-Gb<sub>1</sub> analogs +32, +30, +16 (A), +16 (B), +14, +2, -12 (A) and (B), -26, and -28 Da, as well as polycyclic analogs 390, and 362 Da; B) Concentration variation levels post-ERT for polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> 394 and 366 Da.

A)



B)



**Supplementary Figure 3.** Biomarker level variations following ERT treatment in a 18-year-old male GD type 1 patient with p.N370S/D409H mutation. A) Concentration variation post-ERT for lyso-Gb<sub>1</sub>, lyso-Gb<sub>1</sub> analogs +32, +30, +16 (A), +16 (B), +14, +2, -12 (A) and (B), -26, and -28 Da, as well as polycyclic analogs 390, and 362 Da post-ERT; B) Concentration variation levels post-ERT for polycyclic lyso-Gb<sub>1</sub> 394 and 366 Da.

## 25 ARTICLE 5

### **Neonatal Mass Urine Screening Approach for Early Detection of Mucopolysaccharidoses by UPLC-MS/MS**

**Auteurs de l'article:** Iskren Menkovic, Anne-Sophie Marchand, Michel Boutin, Christiane Auray-Blais

**Statut de l'article:** publié dans *Diagnostics* 2019, 9, 195.

**Avant-propos:** Iskren Menkovic a travaillé au niveau de la préparation pré-analytique des échantillons, du développement et de la validation de la méthode, de l'analyse des échantillons et du traitement de données. Iskren a également rédigé le manuscrit présenté ci-dessous. Tout le travail réalisé par Iskren a été sous les conseils, les recommandations et la supervision des professeurs Michel Boutin et Christiane Auray-Blais.

#### **Mise en contexte :**

L'Article 5 est en lien avec la 2e partie de la thèse, soit la section portant sur les mucopolysaccharidoses (MPSs). Considérant la disponibilité des traitements pour la plupart des MPSs et les nombreux bienfaits documentés des traitements précoces, de plus en plus de spécialistes recommandent de dépister les maladies liées aux désordres du catabolisme des glycosaminoglycans. Alors que certains pays/états dépistent ou recommandent de dépister certains types de MPSs, il n'existe pas au Québec de programmes de dépistage populationnel en place pour cette classe de maladies. Ainsi, avec le support financier du Canadian MPS Society, une méthode de quantification des glycosaminoglycans urinaires a été développée et validée dans le cadre d'une recherche évaluative. Cette méthode quantitative est d'ailleurs adaptée pour un dépistage populationnel des MPSs et elle est compatible avec l'infrastructure déjà en place au Programme québécois de dépistage néonatal urinaire.

**Résumé :**

Les mucopolysaccharidoses (MPSs) sont un groupe de maladies lysosomales caractérisées par des perturbations au niveau du métabolisme des glycosamiglycans, tels l'héparan sulfate, le dermatan sulfate, le chondroïtine sulfate, le kératan sulfate, de même que l'hyaluronan. Des accumulations au niveau de différents tissus et de liquides biologiques surviennent et pourront occasionner d'importantes manifestations cliniques multisystémiques. La thérapie enzymatique de remplacement est un traitement disponible pour la plupart des MPSs. Bien que celle-ci ne parvienne pas à guérir complètement les personnes atteintes, elle altère considérablement la progression naturelle de la maladie et offre une meilleure qualité de vie pour les personnes atteintes. De plus, plusieurs études ont démontré les bienfaits d'une intervention thérapeutique précoce. Il existe donc un besoin pour une méthode de dépistage populationnel des MPSs chez les nouveau-nés afin de pouvoir rapidement cibler les cas potentiels et leur apporter un traitement approprié. L'objectif principal de ce projet de recherche était d'évaluer la faisabilité de développer et de valider une méthode de quantification par spectrométrie de masse en tandem de l'héparan sulfate et du dermatan sulfate dans le cadre d'un éventuel dépistage populationnel au Québec. Certains critères devaient être respectés, soit l'utilisation de la matrice propre au dépistage, donc l'urine prélevée sur papier filtre et la durée d'analyse qui devait être courte (environ 1 min par échantillon). Techniquement, ladite méthode permet l'analyse de l'héparan sulfate et du dermatan sulfate ce qui oriente vers le dépistage de la MPS I, II, III, VI et VII. L'objectif secondaire de cette étude consistait donc à analyser 500 échantillons d'urine contrôles provenant du Programme québécois de dépistage néonatal urinaire afin d'établir les valeurs de référence. Ultimement, la méthode a été développée, puis une étape de validation a révélé une bonne sensibilité. La méthode a permis de cibler des cas de MPSs dans des urines de patients plus âgés ce qui représente une preuve de concept importante.



## **Neonatal Mass Urine Screening Approach for Early Detection of Mucopolysaccharidoses by UPLC-MS/MS**

**Iskren Menkovic, Anne-Sophie Marchand, Michel Boutin and Christiane Auray-Blais\***

Division of Medical Genetics, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine & Health Sciences, Université de Sherbrooke, CIUSSS de l'Estrie-CHUS, 3001, 12th Avenue North, Sherbrooke, QC J1H 5N4, Canada; Iskren.Menkovic@USherbrooke.ca (I.M.); Anne-Sophie.Marchand@USherbrooke.ca (A.-S.M.); Michel.Boutin2@USherbrooke.ca (M.B.)

\* Correspondence: Christiane.Auray@USherbrooke.ca

**Abstract:** Mucopolysaccharidoses (MPSs) are lysosomal storage disorders caused by deficiencies of enzymes involved in the catabolism of glycosaminoglycans (GAGs). Various treatments such as enzyme replacement therapy and/or hematopoietic stem cell transplant are available for MPSs. Early initiation of treatment improves the outcome and delays the onset of symptoms, highlighting the need for newborn screening for MPSs. The main objective of this project was to devise and validate a multiplex urine filter paper method for GAG analysis using a tandem mass spectrometry (MS/MS) approach to screen newborns for MPSs. Eluted urine samples from 21-day-old newborns were evaporated and a methanolysis reaction was performed. Samples were resuspended and analyzed using a UPLC-MS/MS system. A one-minute chromatographic method allowed the absolute quantification of heparan sulfate (HS), dermatan sulfate (DS), and creatinine. Method validation revealed high precision (< 9% relative standard deviation) and accuracy (< 7% bias) for all analytes. The reference values normalized to creatinine obtained by the analysis of five hundred 21-day-old newborn urine samples were 34.6 +/-6.2 mg/mmol of creatinine and 17.3 +/-3.9 mg/mmol of creatinine for HS and DS, respectively. We present a rapid and efficient method for populational newborn urine screening using MS/MS, which could also be applied to high-risk screening.

**Keywords:** mucopolysaccharidosis (MPS), newborn screening; heparan sulfate; dermatan sulfate; UPLC-MS/MS; dried urine spots (DUS)

## 1. Introduction

Mucopolysaccharidoses (MPSs) are lysosomal storage disorders (LSDs) caused by a deficit in the glycosaminoglycan (GAG) catabolism [1]. More specifically, MPS I (Hurler syndrome OMIM 607014, Hurler/Scheie syndrome OMIM 607015 and Scheie syndrome OMIM 607016), MPS II (Hunter syndrome OMIM 309900), MPS III (Sanfilippo A–D syndromes, OMIM 252900, 252920, 252930, 252940), MPS VI (Maroteaux-Lamy syndrome, OMIM 253200), and MPS VII (Sly syndrome, OMIM 253220) are characterized by defects in the degradation of heparan sulfate (HS) and/or dermatan sulfate (DS) leading to the accumulation of these biomarkers in several tissues and biological fluids. GAG storage results in progressive cellular damage [2,3]. The MPSs are characterized by a broad clinical spectrum, ranging from severe neonatal forms to attenuated forms diagnosed later on in adults [4]. Symptoms generally involve organomegaly, umbilical and inguinal hernias, hearing loss, macroglossia, coarse facial features as well as cardiac, respiratory, skeletal and cognitive impairments [5,6]. Enzyme replacement therapy (ERT) and/or hematopoietic stem cell transplant (HSCT) are available for patients with MPS I, II, VI, and VII [6–8].

Previous studies revealed that although affected newborns usually do not clearly exhibit signs of the disease, an elevation of GAGs can be measured in human fetuses and placentas [9], suggesting that the disease can be detected before the first clinical manifestations occur. Considering the irreversible nature of organ damages in MPS patients, experts have agreed that an early initiation of treatment may lead to significant delay and/or prevent the onset of clinical signs and improved outcomes [6,10–15]. Therefore, it has been recommended that newborns be screened for MPSs in the hopes of identifying them early. Moreover, MPS I was added in 2015 to the Recommended Uniform Screening Panel for the United States [10–15].

Newborn screening (NBS) methods for LSDs usually involve dried blood spots (DBS) in which the enzyme activity is measured [16,17]. While DBSs can be a reliable matrix for NBS, urine samples offer major advantages, primarily non-invasive specimen collection, particularly in children, which can be performed at home by parents and has easy shipping of samples by regular mail in an envelope. The Provincial Neonatal Urine Screening Program in Sherbrooke, Quebec, Canada is a unique program (voluntary compliance of parents

averages nearly 90%) where 21-day-old babies are screened for inherited metabolic disorders using urine samples collected on filter paper (dried urine spots, DUS) and analyzed by thin-layer chromatography. The following disorders are targeted: urea cycle disorders, and organic acidurias [18,19]. More recently, a method allowing the absolute quantification of HS and DS in DUS was developed by our group for high-risk screening using a high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry technology (HPLC-MS/MS) [20]. This analytical method is useful for early detection, as well as monitoring and follow-up of treated patients affected with MPS I, MPS II, MPS VI, and MPS VII. Unfortunately, it was not devised for a large-scale newborn urine screening program such as the one in Quebec (~70,000 newborns/year). However, the method as published, did not include creatinine analysis as part of a multiplex analysis to normalize the GAG levels. The importance of creatinine normalization has been shown to improve urine biomarker evaluation [21].

To our knowledge, there is no rapid and non-invasive multiplex method allowing the absolute quantification of GAGs and creatinine using urine samples collected on filter paper, which can be used in a population-based newborn screening setting. The project presented herein had two main objectives: 1) to develop and validate a rapid high-throughput UPLC-MS/MS method suitable for NBS allowing the absolute quantification of HS, DS and creatinine in DUS; and 2) to establish normal reference values using five hundred DUS.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Ethics Approval*

Following the validation of the method, anonymized DUS were used to establish reference values before being discarded. After the discussion with the Institutional Review Board from our Institution, it was agreed that this development/validation activity was not considered as “research” according to the article 2.5 of the Canadian TCPS2 (Tri-Council Policy Statement 2), no IRB approval was required.

### *2.2. Urine Specimen Collection on Filter Paper*

Five hundred random and anonymized urine samples collected on filter paper (Whatman-GE 903) from 21-day-old newborns with normal amino acid and organic acid profiles were

selected as healthy controls and were used to establish normal reference values. All samples were collected and sent by parents by regular postal service. Upon reception, urine filter papers were stored at room temperature until analysis. Similarly, DUS from MPS patients with ages ranging from 1.7 to 10 years old were collected and analyzed for comparison purposes.

### 2.3. Reagents

DS, chondroitin sulfate A (CS), HS, and creatinine standards, as well as methanol-D<sub>4</sub> (99.8 atom % D) and ammonium acetate ( $\geq 98\%$  purity) were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). Creatinine-D<sub>3</sub> (methyl D<sub>3</sub>, 99 atom % D) was obtained from CDN Isotopes Inc. (Pointe-Claire, QC, CAN). Optima<sup>®</sup> LC-MS grade water (H<sub>2</sub>O) was obtained from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA). HPLC grade methanol (MeOH) and LC-MS grade acetonitrile (ACN) were purchased from EMD Chemicals Inc. (Darmstadt, Germany). Methanolic hydrochloric acid (HCl) 3 N was purchased from Oakwood Chemicals (Estill, SC, USA). Acetyl chloride was purchased from Fluka (Milwaukee, WI, USA), ammonium hydroxide (NH<sub>4</sub>OH) was obtained from Fisher Chemicals (Hampton, NH, USA), and formic acid (FA) was from Acros Organics (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

#### 2.3.1. Analyte Stock Solutions

DS and HS standards were diluted in H<sub>2</sub>O to make individual stock solutions at 10.0 mg/mL. The deuterated creatinine standard was also diluted in H<sub>2</sub>O to obtain an individual stock solution at 56.6 mg/mL. All standards were kept at 4 °C and were stable for at least one year.

#### 2.3.2. Internal Standard Stock Solutions

Deuterated internal standards (IS) for HS and DS were prepared in-house by deuteriomethanolysis of HS and DS commercial standards, as reported in previous publications [5,20,22]. In summary, a 2.0 M MeOH-D<sub>4</sub>-DCl solution was prepared by adding 80  $\mu$ L of acetyl chloride dropwise on ice with continuous stirring to 500  $\mu$ L of MeOH-D<sub>4</sub>. A volume of 580  $\mu$ L of this 2.0 M MeOH-D<sub>4</sub>-DCl solution was then added to 600  $\mu$ g of HS or DS. The samples were then vortexed for 30 seconds and incubated for 75 minutes at 65 °C. Following the incubation, the samples were dried under a stream of nitrogen and resuspended

in 1 mL of H<sub>2</sub>O. These stock solutions at a concentration of 600 µg/mL were kept at 4 °C and showed no signs of degradation after 6 months. A stock solution of 20.0 mM of creatinine-D<sub>3</sub> was prepared for deuterated creatinine. This stock solution was diluted 1:10 in water to obtain a 2.0 mM creatinine-D<sub>3</sub> solution, which was used for the preparation of the resuspension solution.

### 2.3.3. Standard Curves and Quality Control Working Solutions

Eight standard solutions with concentrations of 0, 16, 50, 100, 250, 600, 1500, and 2000 µg/mL for HS and DS, and 0, 2.7, 5.4, 6.8, 9.0, 13.6 and 18.1 mg/mL for creatinine were prepared. Also, low, medium and high-quality control (QC) solutions at 75, 200, and 1000 µg/mL of HS and DS with 2.8, 5.7 and 11.3 mg/mL of creatinine, respectively, were prepared from stock solutions by dilution with H<sub>2</sub>O. Both QC and standard solutions were kept at 4 °C and found to be stable for at least 6 months.

### 2.3.4. Resuspension Solution

The resuspension solution was prepared by mixing 9 mL of ACN, 700 µL of H<sub>2</sub>O, 150 µL of deuterated DS IS stock solution, 50 µL of deuterated HS IS stock solution, and 100 µL of the 2.0 mM creatinine-D<sub>3</sub> stock solution.

## 2.4. Sample Processing

Filter papers were examined under ultraviolet light to confirm that the amount of urine required for the analysis was sufficient and a 5-cm disk was punched out. For calibration points, 50 µL of each calibration point was added and left to dry at room temperature. The 5-cm disk was then folded in half and deposited in glass bottles. Extraction of the urine sample was done by adding 3.0 mL of 0.01 M NH<sub>4</sub>OH followed by rotary shaking for 10 minutes (New Brunswick Scientific Shaker, Edison, NJ, USA). One hundred microliters of the extracted urine were transferred into a screw-topped glass tube and evaporated to dryness under a nitrogen stream, followed by a methanolysis reaction as previously described [20]. Briefly, 500 µL of MeOH/HCl 3 N was added to each tube. Samples were vortexed and

incubated at 65 °C for 55 min. Following the incubation, samples were once again evaporated to dryness under a nitrogen stream and 200  $\mu$ L of the resuspension solution was added.

## 2.5. Instrumentation and Parameters

### 2.5.1. UPLC Parameters

The chromatographic separation of HS, DS, creatinine and their respective deuterated internal standards was performed using a BEH Amide Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) column (2.1  $\times$  50 mm, 1.7  $\mu$ m particle size) (Waters Corp. Milford, MA, USA) on an Acquity H-Class UPLC system (Waters Corp., Milford, MA, USA). The method runtime was 1 minute with a gradient ranging between 10% and 60% of mobile phase B. Chromatographic parameters are shown in Table 1.

**Table 1.** Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) parameters for the analysis of heparan sulfate (HS), dermatan sulfate (DS), and creatinine.

<b>UPLC Parameters</b>	
Column	BEH Amide
ID $\times$ Length	2.1 $\times$ 50 mm
Particle size	1.7 $\mu$ m
Column temperature	40 °C
Weak Wash solvent	95:5 ACN:H <sub>2</sub> O + 0.2% FA
Strong Wash solvent	50:50 MeOH:H <sub>2</sub> O
Injection volume	4.0 $\mu$ L
Injector	Flow-through needle
Autosampler temperature	10 °C
Mobile phase A	95:5 ACN:H <sub>2</sub> O + 0.2% FA + 10 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>
Mobile phase B	10:90 ACN:H <sub>2</sub> O + 0.2% FA + 10 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>
Flow rate	0.8 mL/min
Gradient (% mobile phase B)	0.0 $\rightarrow$ 0.1 min: 10%
	0.1 $\rightarrow$ 0.5 min: 60% (linear gradient)
	0.5 $\rightarrow$ 1.0 min: 10%

### 2.5.2. MS/MS Parameters

The quantification of HS and DS-derived disaccharides from the methanolysis reaction, as well as creatinine and their related internal standards, was performed as a multiplex method using a Xevo TQ-S Micro tandem mass spectrometer (Waters). Ionization was performed in positive electrospray ionization (ESI<sup>+</sup>) and the mass spectrometer was operated in multiple reaction monitoring (MRM) mode to ensure that a maximum specificity was achieved. General MS/MS parameters, as well as the transitions used for each of the analytes and their respective deuterated internal standards are shown in Table 2.

**Table 2.** Tandem mass spectrometry (MS/MS) parameters and transitions used for the quantification of DS, HS, creatinine and their respective deuterated internal standards.

<b>MS/MS Parameters</b>			
Ionization mode	ESI		
Polarity	Positive		
Acquisition mode	MRM		
Capillary voltage	3.44 kV		
Desolvation temperature	500 °C		
Desolvation gas flow	700 L/h		
Cone gas flow	150 L/h		
Source temperature	120 °C		
Dwell time	0.05 s		
Span	0 Da		
<b>Transitions</b>			
<b>Compound</b>	<b>Transitions (<i>m/z</i>)</b>	<b>Cone Voltage (V)</b>	<b>Collision Energy (V)</b>
DS	426.2 > 236.1	36	12
DS-D <sub>6</sub> IS	432.2 > 239.1	36	12
HS	384.2 > 161.9	18	18
HS-D <sub>6</sub> IS	390.2 > 161.9	18	18
Creatinine	113.9 > 86.0	34	10
Creatinine-D <sub>3</sub>	116.9 > 89.0	34	10

### 2.5.3. Quantification Parameters

The quantification of HS, DS and creatinine was performed using an 8-point calibration curve with the following concentrations: 0, 0.8, 2.5, 5.0, 12.5, 30.0, 75.0 and 100.0  $\mu\text{g/mL}$  for HS and DS and 0, 0.4, 0.8, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0 mM for the creatinine. Calibration curves were prepared in  $\text{H}_2\text{O}$  and the resulting linear curves were forced to the origin for all analytes. Data were acquired over a 1-minute timeframe. Quantification was done using the response factor and data processing was achieved using TargetLynx® Application Manager, an option with MassLynx™ (version 4.1 SCN810) Software (Waters).

### 2.6. Method Validation

The linearity of the 8-point calibration curve for HS, DS and creatinine was evaluated. Intraday (5 replicates in a day) and interday (5 different days) precision and accuracy assays were evaluated using different concentrations of QC solutions: low (3.8  $\mu\text{g/mL}$  for HS and DS, and 1.3 mM for creatinine), medium (10.0  $\mu\text{g/mL}$  for HS and DS, and 2.5 mM for creatinine), and high (50.0  $\mu\text{g/mL}$  for HS and DS, and 5.0 mM for creatinine). The method accuracy was measured by spiking DUS with 20.0  $\mu\text{L}$  of the previously mentioned QC concentrations. Experimental concentrations were then compared with theoretical values calculated by subtracting endogenous levels of analytes previously measured to the concentration of the spiked QC in order to assess the % bias. All interday analyses for HS, DS and creatinine included an 8-point calibration curve, low, medium and high concentrations (QCs), as well as a control urine sample. Both QC samples and control urine samples were prepared in triplicate for each interday. Adhesion to plastic and glassware was evaluated using QC samples which were transferred 3 times in a glass or plastic insert after the resuspension step. Control samples were used to establish the limit of quantification (LOQ) and the limit of detection (LOD) for all 3 analytes (corresponding to  $10\times$  and  $3\times$  the standard deviation of a control sample injected 10 times, for LOQ and LOD, respectively). The recovery following the DUS extraction was evaluated by comparing the area under the curve when a 1 mL urine sample was added to a filter paper and then extracted using the elution process described previously versus when a 1.0 mL sample was simply diluted in 3.0 mL of the extraction solution. The freeze/thaw stability of HS, DS and creatinine following

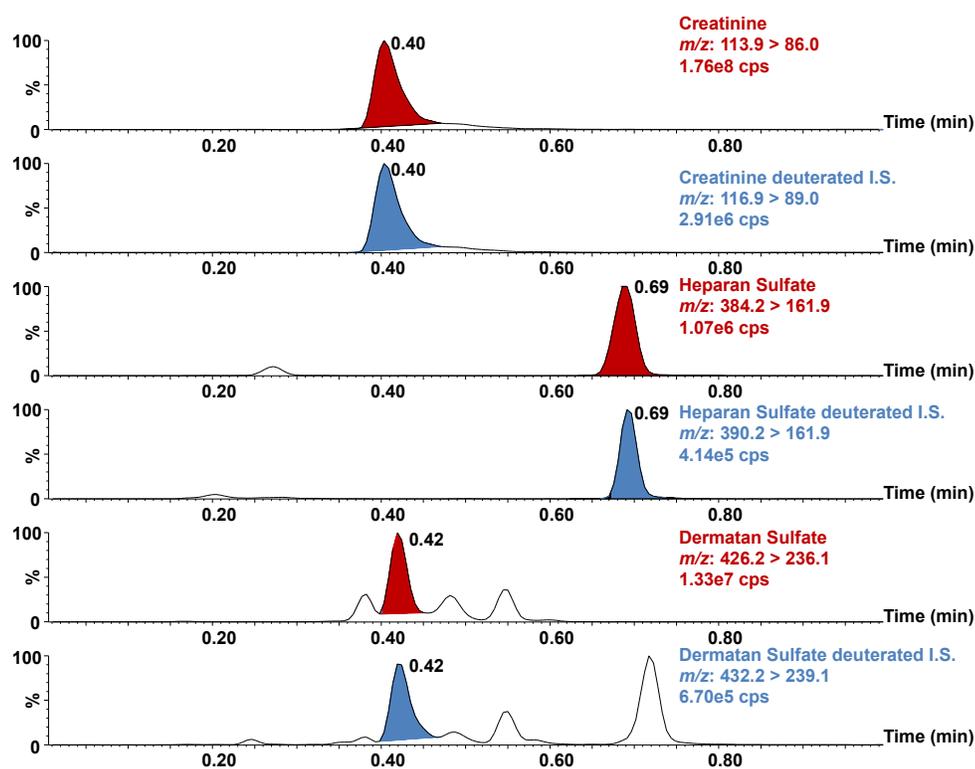


the elution step was evaluated by comparing the measured concentration in QC samples before and after 3 freeze/thaw cycles. Finally, the stability of HS, DS, and creatinine in the elution solution was studied for 48 hours, one week and one month at temperatures ranging from  $-30$  to  $25$  °C.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Method Development and Validation

The BEH Amide UPLC column allowed a good separation of all analytes based on hydrophilic interactions in a 1-minute chromatography run (Figure 1). The peak at 0.56 min was attributed to CS after confirmation with the corresponding standard ( $60$   $\mu\text{g/mL}$ ).



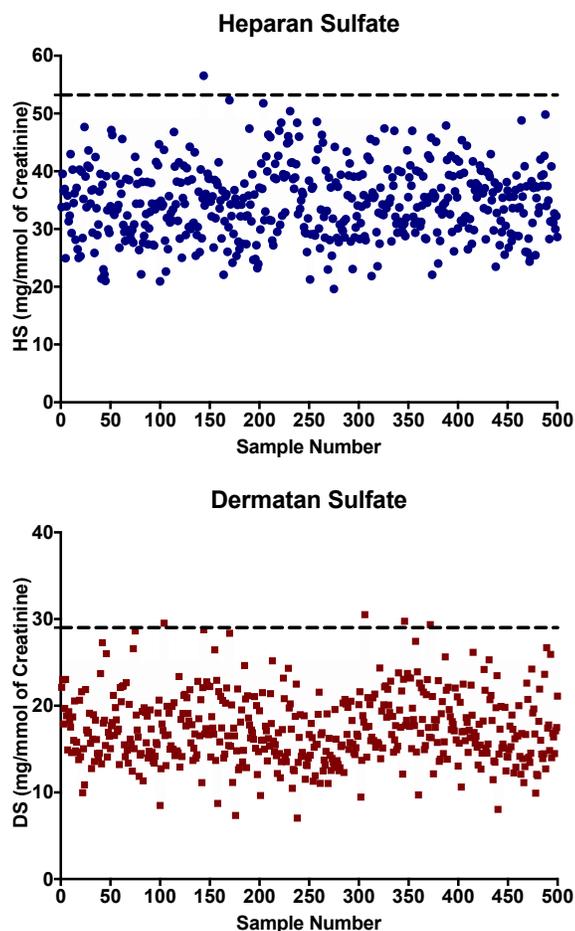
**Figure 1.** Ion chromatograms of heparan sulfate (HS), dermatan sulfate (DS), and creatinine standards (HS and DS at  $34$   $\mu\text{g/mL}$  and creatinine at  $301$   $\mu\text{g/mL}$ ) and their deuterated counterparts (deuterated HS at  $3.0$   $\mu\text{g/mL}$ ; deuterated DS at  $9.0$   $\mu\text{g/mL}$  and deuterated creatinine at  $2.3$   $\mu\text{g/mL}$ ). I.S.: Internal standard; Cps: Counts per second.

Intraday ( $n = 5$ ) and interday ( $n = 5$ ) assays revealed that the biases (%) were less than 7% and the relative standard deviations (RSD %) were less than 9% for HS, DS, and creatinine, respectively. An average coefficient of determination ( $r^2$ ) of 0.999 ( $n = 5$ ) was achieved for the calibration curves of all the 3 analytes. There was no evidence of plastic or glassware adsorption (bias <3%). LOQs were 13.3  $\mu\text{g/mL}$ , 8.2  $\mu\text{g/mL}$  and 0.1 mM for HS, DS, and creatinine, respectively, while LODs were 4.0  $\mu\text{g/mL}$ , 2.5  $\mu\text{g/mL}$  and 0.03 mM for HS, DS, and creatinine, respectively.

Previous stability experiments performed by our group revealed that DS and HS were stable on DUS for 6 weeks at temperatures ranging from 25 to  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  [20]. Our results revealed that the creatinine is stable at temperatures ranging from 25 to  $-30\text{ }^\circ\text{C}$  for a 4-week period. Results showed good recoveries at 92% 89% and 94% for HS, DS and creatinine, respectively. Three freeze/thaw cycles had no impact on HS, DS and creatinine levels. Previous results obtained by our group showed that processed samples were stable for at least 48 hours at  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $4\text{ }^\circ\text{C}$  and at room temperature ( $22\text{ }^\circ\text{C}$ ) [20].

### 3.2. Reference Values

Following the method validation, five hundred DUS from 21-day-old control newborns were analyzed to establish reference values. Concentrations measured in DUS varied from 17.9 to 56.5 mg/mmol of creatinine, and 7.3 to 30.5 mg/mmol of creatinine for HS and DS, respectively (Figure 2). We calculated the average + 1 standard deviation (SD) for HS and DS concentrations in 21-day-old control newborns as  $34.6 \pm 6.2$  mg/mmol of creatinine and  $17.3 \pm 3.9$  mg/mmol of creatinine, respectively. The limit for the reference value was thus set as the mean + 3 SD with values for HS at 53.2 mg/mmol of creatinine and for DS at 29.0 mg/mmol of creatinine (Figure 2). A larger number of samples will eventually be required to establish reference values in order to reduce the false-positive rate.



**Figure 2.** HS and DS concentrations expressed in mg/mmol of creatinine measured in five hundred dried urine spots (DUS) from 21-day-old control newborns. Cutoffs values represented by the dotted line correspond to the average analyte concentration + 3 standard deviations.

### 3.3. Urine Samples from Confirmed MPS Patients

Urine samples from confirmed MPS patients (Age range: 20 months to 10 years old) were analyzed to evaluate the effectiveness of the proposed multiplex method. Results are shown in Table 3. Unfortunately, DUS from 21-day-old MPS patients were not available. The values measured in 21-day-old control newborns cannot be used to establish reference values for the older MPS patients evaluated because HS and DS urinary levels are known to decrease with age [5]. Reference values for HS and DS in children aged 4–9 years old have been shown to be more than 3 times lower than the 12-month age group [5]. However, DUS from controls with matching age and gender were analyzed to assess the efficiency of the

proposed method. As expected, all untreated MPS patients had increased levels of urinary HS and/or DS when compared with matching controls (Table 3); the 3 treated patients (patients 7 to 9) showed slightly increased levels of HS and DS. Unfortunately, based information on the time of initiation of treatment is not available.

**Table 3.** Analysis of dermatan sulfate (DS) and heparan sulfate (HS) in urine samples collected on filter papers from Mucopolysaccharidose (MPS) patients.

Patient	MPS Type	Gender	Age (Years)	ERT	HS*	DS*	Control HS*	Control DS*
1	I (H)	M	1.7	U	86.4	42.6	8.4	1.7
2	I (H/S)	M	8.0	U	68.7	36.4	9.7	1.4
3	I (H/S)	F	10	U	48.1	24.2	4.0	1.4
4	II	M	3.0	U	150.3	72.6	10.6	1.3
5	II	M	5.0	U	45.4	15.1	9.6	1.7
6	II	M	5.0	U	47.5	14.9	9.4	0.8
7	II	M	5.0	T	13.4	3.8	7.3	2.3
8	II	M	6.0	T	16.3	4.9	5.8	0.8
9	II	M	7.0	T	12.9	5.2	4.8	1.2
10	IIIA	M	3.0	U	142.1	4.0	8.4	1.8
11	IIIB	F	1.8	U	56.5	1.6	10.2	1.6
12	VI	F	10	U	65.4	46.4	7.7	2.9

Gender: Male (M) or Female (F), Enzyme Replacement Therapy (ERT): Untreated patient (U) or treated patient (T). \*Expressed in mg/mmol of creatinine.

#### 4. Conclusions

The early identification of MPS affected newborns remains challenging since most of them do not exhibit any signs of the disease early in life [23]. However, considering that several studies demonstrated that GAGs are elevated as early as 21 weeks of gestation [9,24], we strongly believe that newborn screening will be a useful tool to identify patients before the onset of irreversible signs and symptoms associated with the disease. We described herein, the development and validation of a UPLC-MS/MS multiplex method, which allows

an absolute quantification of HS, DS and creatinine, and is suitable for newborn screening of MPS I, II, III, VI, and VII using urine DUS from 21-day-old newborns. The proposed method is rapid, efficient, and reliable which allows the analysis of 500 samples per day per UPLC-MS/MS instrument. LC-MS/MS methods for urine GAG quantification have been previously published, but none allows the simultaneous quantification of HS, DS and creatinine by a 1-minute method. Unlike dried blood spots, DUS collection offers major advantages since it is non-invasive and easy to collect by parents. It also favors storage and shipping of samples to biochemical genetics and metabolic laboratories at low cost by regular mail. Also, previous studies have shown that GAG concentrations are more elevated in urine specimens than other biological fluids such as blood and plasma, thus favoring urine as a better matrix to quantify GAGs for early detection of MPSs [25,26]. A limitation of this study is the unavailability of samples from 21-day-old infants affected with various MPSs. A future perspective involves the comparison of DUS and DBS glycosaminoglycan methods for MPS screening on the same newborn cohort. While this method is intended to screen newborns, it might also be suitable for high-risk screening [27] and monitoring treated MPS patients, as long as appropriate reference age-related values are established.

**Author contributions:** I.M. was involved in the development and validation of the methodology, the analysis of samples, the original draft preparation, as well as the review and editing process. A.-S.M. was involved in the analysis of an important number of samples. M.B. was involved in the revision of the manuscript. C.A.-B. was involved in the design and supervision of the study. She also facilitated the recruitment of urine specimens from healthy infants and secured the resources and funding required for this study. She revised and edited the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Acknowledgments:** We would like to acknowledge the Canadian MPS Society who provided a summer grant used to fund this project. We would also like to acknowledge Waters Corp. for their continuous support and technical expertise. We would like to thank Dr Joe TR Clarke for his expertise and insights on MPSs. This project was supported by C. Auray-Blais' research funds.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

45. Palmieri, C.; Giger, U.; Wang, P.; Pizarro, M.; Shivaprasad, H.L. Pathological and Biochemical Studies of Mucopolysaccharidosis Type IIIB (Sanfilippo Syndrome Type B) in Juvenile Emus (*Dromaius novaehollandiae*). *Vet. Pathol.* **2015**, *52*, 160–169.
46. Muenzer, J. Overview of the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology* **2011**, *50*, v4–v12.
47. Lawrence, R.; Brown, J.R.; Lorey, F.; Dickson, P.I.; Crawford, B.E.; Esko, J.D. Glycan-based biomarkers for mucopolysaccharidoses. *Mol. Genet. Metab.* **2014**, *111*, 73–83.
48. Khan, S.A.; Peracha, H.; Ballhausen, D.; Wiesbauer, A.; Rohrbach, M.; Gautschi, M.; Mason, R.W.; Giugliani, R.; Suzuki, Y.; Orii, K.E.; et al. Epidemiology of mucopolysaccharidoses. *Mol. Genet. Metab.* **2017**, *121*, 227–240.
49. Auray-Blais, C.; Lavoie, P.; Tomatsu, S.; Valayannopoulos, V.; Mitchell, J.J.; Raiman, J.; Beaudoin, M.; Maranda, B.; Clarke, J.T. UPLC-MS/MS detection of disaccharides derived from glycosaminoglycans as biomarkers of mucopolysaccharidoses. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *936*, 139–148.
50. Mitchell, J.; Berger, K.I.; Borgo, A.; Braunlin, E.A.; Burton, B.K.; Ghotme, K.A.G.; Kircher, S.G.; Molter, D.; Orchard, P.J.; Palmer, J.; et al. Unique medical issues in adult patients with mucopolysaccharidoses. *Eur. J. Intern. Med.* **2016**, *34*, 2–10.
51. Gaffke, L.; Pierzynowska, K.; Piotrowska, E.; Węgrzyn, G. How close are we to therapies for Sanfilippo disease? *Metab. Brain Dis.* **2017**, *33*, 1–10.
52. Giugliani, R.; Federhen, A.; Rojas, M. V., Vieira, T.; Artigalás, O.; Pinto, L.L.; Azevedo, A. C.; Acosta, A.; Bonfim, C.; Lourenço, C.M.; et al. Mucopolysaccharidosis I, II, and VI: Brief review and guidelines for treatment. *Genet. Mol. Biol.* **2010**, *33*, 589–604.
53. Kubaski, F.; Mason, R.W.; Nakatomi, A.; Shintaku, H.; Xie, L.; Van Vlies, N.N.; Church, H.; Giugliani, R.; Kobayashi, H.; Yamaguchi, S.; et al. Newborn screening for mucopolysaccharidoses: a pilot study of measurement of glycosaminoglycans by tandem mass spectrometry. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2016**, *40*, 151–158.
54. Muenzer, J. Early initiation of enzyme replacement therapy for the mucopolysaccharidoses. *Mol. Genet. Metab.* **2014**, *111*, 63–72.
55. Gabrielli, O.; Clarke, L.A.; Bruni, S.; Coppa, G.V. Enzyme-Replacement Therapy in a 5-Month-Old Boy With Attenuated Presymptomatic MPS I: 5-Year Follow-up. *Pediatrics* **2010**, *125*, e183–e187.

56. Clarke, L.A.; Atherton, A.M.; Burton, B.K.; Day-Salvatore, D.L.; Kaplan, P.; Leslie, N.D.; Scott, C.R.; Stockton, D.W.; Thomas, J.A.; Muenzer, J. Mucopolysaccharidosis Type I Newborn Screening: Best Practices for Diagnosis and Management. *J. Pediatr.* **2017**, *182*, 363–370.
57. Grosse, S.D.; Lam, W.K.; Wiggins, L.D.; Kemper, A.R. Cognitive outcomes and age of detection of severe mucopolysaccharidosis type 1. *Genet. Med.* **2017**, *19*, 975–982.
58. Shone, S. M. Newborn Screening Policy Decisions. *North Carol. Med J.* **2019**, *80*, 42–44.
59. Laraway, S.; Breen, C.; Mercer, J.; Jones, S.; Wraith, J.E. Does early use of enzyme replacement therapy alter the natural history of mucopolysaccharidosis I? Experience in three siblings. *Mol. Genet. Metab.* **2013**, *109*, 315–316.
60. Chan, M.-J.; Liao, H.-C.; Gelb, M.H.; Chuang, C.-K.; Liu, M.-Y.; Chen, H.-J.; Kao, S.-M.; Lin, H.-Y.; Huang, Y.-H.; Kumar, A.B.; et al. Taiwan National Newborn Screening Program by Tandem Mass Spectrometry for Mucopolysaccharidoses Types I, II, and VI. *J. Pediatr.* **2019**, *205*, 176–182.
61. Hopkins, P.V.; Campbell, C.; Klug, T.; Rogers, S.; Raburn-Miller, J.; Kiesling, J. Lysosomal Storage Disorder Screening Implementation: Findings from the First Six Months of Full Population Pilot Testing in Missouri. *J. Pediatr.* **2015**, *166*, 172–177.
62. Auray-Blais, C.; Cyr, D.; Drouin, R. Quebec neonatal mass urinary screening programme: From micromolecules to macromolecules. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2007**, *30*, 515–521.
63. Auray-Blais, C.; Giguère, R.; Lemieux, B. Newborn urine screening programme in the province of Quebec: an update of 30 years' experience. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2003**, *26*, 393–402.
64. Auray-Blais, C.; Lavoie, P.; Zhang, H.; Gagnon, R.; Clarke, J.T.; Maranda, B.; Young, S.P.; An, Y.; Millington, D.S. An improved method for glycosaminoglycan analysis by LC–MS/MS of urine samples collected on filter paper. *Clin. Chim. Acta* **2012**, *413*, 771–778.
65. Chen, Y.; Shen, G.; Zhang, R.; He, J.; Zhang, Y.; Xu, J.; Yang, W.; Chen, X.; Song, Y.; Abliz, Z. Combination of Injection Volume Calibration by Creatinine and MS Signals'

- Normalization to Overcome Urine Variability in LC-MS-Based Metabolomics Studies. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 7659–7665.
66. Zhang, H.; Young, S.P.; Millington, D. S. Quantification of Glycosaminoglycans in Urine by Isotope-Dilution Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* **2013**, *76*, 17.12. 1–17.12. 14.
67. Clarke, L.; Ellaway, C.; Foster, H.E.; Giugliani, R.; Goizet, C.; Goring, S.; Hawley, S.; Jurecki, E.; Khan, Z.; Lampe, C.; et al. Understanding the Early Presentation of Mucopolysaccharidoses Disorders. *J. Inborn. Errors Metab. Screen* **2018**, *6*, 232640981880034.
68. Kubaski, F.; Brusius-Facchin, A.C.; Mason, R. W.; Patel, P.; Burin, M.G.; Michelin-Tirelli, K.; Kessler, R. G.; Bender, F.; Leistner-Segal, S; Moreno, C.; Cavalcanti, D.; Giugliani, R.; Tomatsu, S. Elevation of glycosaminoglycans in the amniotic fluid of a fetus with mucopolysaccharidosis VII. *Prenat Diagn* **2017**, *37*(5), 435–439.
69. Khan, S.A.; Mason, R.W.; Giugliani, R.; Orii, K.; Fukao, T.; Suzuki, Y.; Yamaguchi, S.; Kobayashi, H.; Orii, T.; Tomatsu, S. Glycosaminoglycans analysis in blood and urine of patients with mucopolysaccharidosis. *Mol. Genet. Metab.* **2018**, *125*, 44–52.
70. Menkovic, I.; Lavoie, P.; Boutin, M.; Auray-Blais, C. Distribution of heparan sulfate and dermatan sulfate in mucopolysaccharidosis type II mouse tissues pre- and post-enzyme-replacement therapy determined by UPLC–MS/MS. *Bioanalysis* **2019**, *11*(8), 727-740.
71. Colón, C.; Alvarez, J.V.; Castaño, C.; Gutierrez-Solana, L.G.; Marquez, A.M.; O’Callaghan, M.; Sánchez-Valverde, F.; Yeste, C; Couce, M.L. A selective screening program for the early detection of mucopolysaccharidosis. *Medicine* **2017**, *96*(19).



## 26 DISCUSSION

### *26.1 Les études métabolomiques*

#### *26.1.1 L'optimisation des paramètres UPLC et MS pour les études métabolomiques*

Le but des études métabolomiques réalisées dans le cadre de ce projet de doctorat était, entre autres, d'identifier de nouvelles molécules pouvant être des biomarqueurs potentiels pour la maladie de Gaucher. L'optimisation des paramètres en spectrométrie de masse ainsi que ceux en chromatographie liquide peut s'avérer plutôt complexe, car il est très difficile d'anticiper ce qui sera identifié au préalable en métabolomique. Dans le cas de la présente étude, en raison de la nature de la méthode d'extraction utilisée, nous nous attendions à ce que le lyso-Gb<sub>1</sub> et ses analogues puissent être ciblés comme biomarqueurs pour la maladie de Gaucher. En effet, l'extraction en phase solide à l'aide de colonne « Mixed-Mode Cation Exchange » (MCX) cible les molécules faiblement basiques avec une région hydrophobe. De plus, en nous basant sur les expériences passées au niveau de la maladie de Fabry, nous savions que nous réussirions à isoler cette classe de molécules à l'aide de cette méthode. Considérant cette anticipation de certains résultats, nous avons utilisé des standards du lyso-Gb<sub>1</sub> pour l'optimisation des paramètres en spectrométrie de masse et en chromatographie liquide pour les études métabolomiques. La phrase ci-haut a été remplacée par la phrase suivante: « De fait, au niveau de la chromatographie pour l'analyse métabolomique non-ciblée, nous avons utilisé une méthode de 45 minutes avec un changement de gradient relativement lent pour être en mesure de séparer le lyso-Gb<sub>1</sub> de son isomère, le galactosylsphingosine (psychosine), tel que décrit dans les Articles 1 et 3 aux pages 109 et 200 respectivement. De plus, l'utilisation d'un gradient lent diminue la suppression ionique et favorise la détection d'un plus grand nombre de molécules. Évidemment, l'aspect chromatographique n'a pas pu être évalué pour les autres molécules puisque nous ne savions pas, à ce moment, quels métabolites seraient identifiés. Pour ce qui est des paramètres de spectrométrie de masse, ceux-ci ont également été optimisés à l'aide du standard de lyso-Gb<sub>1</sub>. D'ailleurs, cette optimisation à l'aide de ce standard s'est avérée particulièrement importante, car nous avons réussi à augmenter considérablement le signal tout en conservant un effet de fragmentation dans la source (« in-source fragmentation ») relativement bas. Il est fort possible que pour certaines molécules, comme les analogues polycycliques ou les phosphocholines identifiées dans le

plasma, ces paramètres ne soient pas optimaux. Cependant, il est important de préciser que le but visé par l'étude métabolomique est l'identification des métabolites et non la quantification absolue des biomarqueurs. De plus, lorsque des molécules d'intérêt sont ciblées, il est possible d'optimiser différents paramètres en spectrométrie de masse dans le but d'augmenter le signal lors des analyses MS/MS pour étudier la fragmentation de ces molécules. Dans le cas des deux études métabolomiques présentées, tous les analogues et les phosphocholines ciblés étaient très abondants dans les échantillons analysés pour les tests de fragmentation. En effet, lors des analyses MS/MS pour étudier la fragmentation de ces molécules, nous avons utilisé un échantillon de patient sévèrement atteint qui présentait un très haut niveau de biomarqueurs. Ce faisant, nous n'avons donc pas eu besoin d'optimiser davantage les paramètres d'ionisation. Seuls les paramètres de fragmentation ont été optimisés pour chaque molécule afin d'obtenir un spectre optimal.

#### ***26.1.2 L'origine potentielle des biomarqueurs identifiés lors des études métabolomiques***

Les deux études métabolomiques réalisées ont permis d'identifier de nouveaux biomarqueurs au niveau du plasma et de l'urine. Étant donné la méthode d'extraction privilégiée dans le cadre de ces études à l'aide de la colonne MCX et des données disponibles sur les biomarqueurs existants pour d'autres sphingolipidoses, nous nous attendions à découvrir des molécules apparentées au lyso-Gb<sub>1</sub>. De plus, nos études métabolomiques ont permis d'observer une variabilité importante au niveau des biomarqueurs plasmatiques et urinaires. En effet, dans le cas des analogues du lyso-Gb<sub>1</sub> par exemple, il est possible de constater que les analogues présents au niveau de l'urine sont généralement plus polaires que ceux présents dans le plasma. La raison derrière ce phénomène pourrait potentiellement reposer sur les mêmes bases que celui du métabolisme des médicaments. En effet, le métabolisme des médicaments se produit en 3 phases. Lors de la phase 1, l'objectif principal est de transformer le substrat initial en un composé plus polaire et soluble dans l'eau. Ainsi, des réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse sont les principales transformations effectuées par le cytochrome P450 dans le cadre de cette phase 1 (Phang-Lyn et Llerena, 2021). La phase 2 quant à elle consiste à ajouter des groupements hydrophiles de manière à rendre la molécule encore plus polaire et soluble dans l'eau pour faciliter l'excrétion de celle-ci. Des réactions de glucuronidation, d'acétylation et de sulfatation sont souvent réalisées (Phang-Lyn et Llerena, 2021). La phase 3 quant à elle fait plutôt référence au rôle joué par des transporteurs

actifs qui auront pour but de diriger les substrats vers différents tissus pour ultimement être excrétés tant au niveau de la bile que dans l'urine (Almarzroo *et al.*, 2017). Il est alors possible d'extrapoler que le lyso-Gb<sub>1</sub>, une molécule cytotoxique qui est très abondante au niveau du plasma des patients Gaucher, soit métabolisé de façon similaire afin de produire des composés plus polaires et plus facilement excrétés dans l'urine. Évidemment, cette assertion ne demeure qu'une hypothèse, mais pourrait en partie être la raison de l'existence des analogues du lyso-Gb<sub>1</sub>. Évidemment, des études mécanistiques devraient être réalisées afin de constater si les analogues du lyso-Gb<sub>1</sub> sont en effet des produits de dégradation du cytochrome P450 dans le but de métaboliser le lyso-Gb<sub>1</sub> cytotoxique. Ainsi, cette hypothèse pourrait en partie expliquer pourquoi le lyso-Gb<sub>1</sub> plasmatique représente ~95-98% du contenu en lyso-Gb<sub>1</sub> et analogues alors qu'au niveau de l'urine la concentration du lyso-Gb<sub>1</sub> est équivalente à celle des analogues dits traditionnels.

### ***26.1.3 Les analogues polycycliques: des biomarqueurs inattendus***

Pour ce qui est des analogues polycycliques identifiés lors des études métabolomiques dans l'urine, il s'agit d'une découverte fort intéressante puisque cette classe de molécules n'a jamais été rapportée dans la littérature précédemment. Évidemment, avec ce type de découverte il y a toujours des questions quant à l'origine de ces composés. S'agit-il de biomarqueurs liés à la maladie ou bien des produits secondaires du métabolisme des glycosphingolipides? Nous avons observé une variabilité de la concentration des analogues polycycliques en fonction de la sévérité des atteintes et ce, au niveau de certains patients Gaucher qui provenaient de différents pays à travers le monde. De plus, bien que notre cohorte de patients Gaucher pour l'étude urinaire ait été relativement limitée en termes de patients ayant des atteintes sévères, nous avons tout de même observé une augmentation des analogues polycycliques chez les 3 patients plus sévèrement atteints comparativement au reste de la cohorte. Nous avons également observé une diminution au niveau de la concentration des analogues polycycliques chez les patients suite à un traitement par thérapie enzymatique de remplacement.

La structure chimique des analogues polycycliques également semble suggérée que ces molécules sont des biomarqueurs qui proviendraient de réactions d'hydrolyse, d'oxydation et de cyclisation à partir d'une sphingosine. Comme décrit précédemment, des réactions

d'hydrolyse et d'oxydation se produisent fréquemment lors de la phase 1 du métabolisme des médicaments pour rendre la molécule plus polaire afin de pouvoir être excrétée. Ainsi, bien que tous les éléments semblent suggérer que les analogues polycycliques soient des biomarqueurs d'intérêt pour la maladie de Gaucher, des études avec des cohortes plus nombreuses présentant des patients traités et non traités nous permettront de mieux évaluer la pertinence de ces biomarqueurs dans le domaine clinique.

#### ***26.1.4 Les cohortes des études plasmatiques et urinaires***

La réussite d'une étude métabolomique est directement liée à la « qualité » des échantillons analysés. En effet, une cohorte comportant des échantillons de patients non traités et qui sont sévèrement atteints de la maladie est souhaitable puisque la concentration de biomarqueurs devrait, en théorie, être plus élevée dans ces échantillons, ce qui augmente les chances que ceux-ci soient détectés lors des analyses non-ciblées par le spectromètre de masse en temps de vol. Dans le cadre de ce projet, nous avons utilisé deux types de matrices pour notre étude métabolomique, soit l'urine et le plasma. En ce qui a trait à l'étude métabolomique dans le plasma, nous avons inclus des hommes et des femmes âgés de 18 ans et plus qui n'avaient jamais reçu de traitement et qui présentaient des manifestations cliniques sévères de la maladie. Évidemment, le choix d'inclure uniquement des patients non traités repose sur le fait que les patients traités ont, théoriquement, une concentration plus faible de biomarqueurs dans les échantillons biologiques. Pour ce qui est de l'âge minimal, nous avons choisi de considérer uniquement des patients d'âge adulte puisqu'il peut s'avérer difficile de recruter des contrôles d'âge et de sexe appariés chez des enfants contrôles considérant l'aspect invasif de la prise de sang.

Au niveau de l'étude métabolomique dans l'urine, nous avons été plus limités au niveau des échantillons disponibles. En effet, puisque le suivi des patients n'implique généralement pas d'analyses urinaires, nous avons dû recruter de nouveaux patients spécialement pour cette partie de l'étude. Compte tenu de la situation à travers le monde avec la pandémie de COVID-19, le recrutement s'est avéré extrêmement complexe et nous avons dû nous résoudre à inclure des échantillons de patients présentant de faibles manifestations cliniques qui provenaient de différents centres à travers le monde qui ont accepté de collaborer au projet. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle des cohortes différentes ont été utilisées pour les

études métabolomiques dans le plasma et dans l'urine. Dans le cadre de l'étude métabolomique dans l'urine, le seul critère d'inclusion était d'avoir un diagnostic confirmé de la maladie et de ne pas recevoir de traitement. Ainsi, contrairement à l'étude plasmatique, nous avons inclus des patients pédiatriques dans l'étude urinaire afin d'avoir une plus grande marge de manœuvre quant à la sévérité des atteintes des patients inclus dans l'étude. Évidemment, le fait d'avoir majoritairement des échantillons de patients atténués peut être à l'origine d'un certain biais de sorte que seuls les biomarqueurs les plus abondants ont pu être détectés, puis fragmentés adéquatement lors des expériences d'élucidation de structures par MS/MS. Bien que nous ayons identifié un certain nombre de biomarqueurs, l'une des limitations des études urinaires, tant pour la métabolomique que pour la quantification des biomarqueurs, est le nombre limité d'échantillons de patients sévèrement atteints.

## ***26.2 Les méthodes quantitatives pour l'analyse des biomarqueurs Gaucher***

### ***26.2.1 Les défis et les solutions***

L'un des défis lorsque l'on cherche à développer des méthodes quantitatives avec de nouveaux biomarqueurs est l'absence de standard ou de standard interne disponible commercialement pour ces molécules. Afin de contourner ce problème, il est possible de développer des méthodes de quantification relative ce qui implique de quantifier un analyte par rapport à la réponse d'une courbe de calibration d'une autre molécule. De fait, en ce qui concerne les deux méthodes de quantification présentées dans cette thèse, tous les analogues du lyso-Gb<sub>1</sub> ont été quantifiés par rapport à la réponse de la courbe de calibration du lyso-Gb<sub>1</sub>. Évidemment, ce type d'approche nécessite le respect de certains paramètres pour en arriver à des résultats probants. Il doit y avoir une similarité au niveau des: 1) propriétés physico-chimiques des molécules afin d'obtenir un signal semblable en spectrométrie de masse; 2) sites d'ionisation, du pK<sub>A</sub> et de la structure générale des composés quantifiés de façon relative; 3) conditions d'élution de toutes les molécules lors de la séparation chromatographique. En effet, le solvant utilisé pour l'élution peut avoir un impact majeur sur le signal mesuré pour un analyte donné, car la production d'ions en phase gazeuse s'effectue plus facilement avec des solvants volatils tels que l'acétonitrile ou le MeOH qu'avec de l'eau comme solvant. Nous avons donc utilisé des gradients stables pour les régions d'élution de différents analytes. Tous ces gradients ont été optimisés afin de réduire au maximum l'effet

de matrice tout en conservant une haute résolution pour les pics associés aux différents analytes en chromatographie liquide.

Un autre objectif était d'assurer la séparation chromatographique du lyso-Gb<sub>1</sub> du galactosylsphingosine. De fait, lors du développement de la méthode quantitative dans le plasma, nous avons observé des traces de galactosylsphingosine dans les échantillons utilisés pour établir la courbe de calibration. Il était donc essentiel de séparer les deux isomères de sucre, qui faut-il le rappeler, diffèrent uniquement par l'orientation d'un groupement hydroxyl pour éviter un biais particulièrement pour les analytes de faible concentration. Pour ce faire, nous avons eu recours à une chromatographie d'interactions hydrophile qui a permis sans contredit la séparation chromatographique de ces deux composés qui possèdent d'ailleurs le même rapport *m/z*. Par ailleurs, la littérature récente fait ressortir la difficulté de bien séparer le glucosylsphingosine du galactosylsphingosine (Welford *et al.*, 2014; Mirzaian *et al.*, 2017). De fait, certains chercheurs font référence à l'hexosylsphingosine qui comprend les deux molécules non séparées. Néanmoins, il demeure que les méthodes développées deviennent des atouts indéniables permettant l'analyse efficace des deux biomarqueurs.

### ***26.2.2 Les corrélations entre les biomarqueurs et les manifestations cliniques***

Les études quantitatives réalisées dans le cadre de ce projet de recherche nous ont permis d'établir certaines corrélations entre les biomarqueurs plasmatiques et les manifestations cliniques viscérales et hématologiques de la maladie de Gaucher. Malheureusement, il ne fut pas possible d'établir des corrélations avec les biomarqueurs urinaires puisque les patients Gaucher analysés avaient des atteintes atténuées. En effet, la grande majorité des patients composant notre cohorte pour l'aspect urinaire du projet avait une forme atténuée de la maladie où près de 80% d'entre eux n'avaient pas de manifestations cliniques liées au système osseux et relativement peu de patients avaient des atteintes hématologiques et viscérales. Par ailleurs, il serait important de poursuivre l'étude quantitative au niveau de la matrice urinaire en recrutant un nombre important de patients avec une vaste étendue de manifestations cliniques. Une autre perspective serait d'évaluer les biomarqueurs analysés chez les patients Gaucher de type 1 également chez les patients Gaucher de types 2 et 3. En incluant des patients aux extrémités du spectre clinique de la maladie, nous pourrions avoir

une meilleure idée quant à la corrélation des différents biomarqueurs et les manifestations cliniques, donc la sévérité de la maladie.

### ***26.2.3 Les biomarqueurs urinaires et les biomarqueurs plasmatiques***

À ce stade-ci, il est trop tôt pour se prononcer à savoir quelle matrice est une source préférable de biomarqueurs en raison du manque de données au niveau des biomarqueurs urinaires. Cependant, il est possible qu'une combinaison de méthodes analytiques dans l'urine et le plasma soit la meilleure approche pour la prise en charge des patients Gaucher. En effet, avec l'analyse d'échantillons de patients ayant une forme atténuée de la maladie de Gaucher, il nous a été possible de constater que les biomarqueurs tant urinaires que plasmatiques sont présents et facilement quantifiables. Ceci suggère donc que les deux matrices sont une source de biomarqueurs sensibles et robustes. Cependant, chacune de ces matrices possède des avantages et des inconvénients. Dans l'urine, l'aspect non invasif de la collecte de prélèvement est un élément majeur, particulièrement pour une clientèle pédiatrique. D'autre part, nos données semblent indiquées que la quantification de biomarqueurs dans le plasma comporte un peu moins de variabilité. En effet, bien que le nombre de données soit très limité, lorsque l'on compare les résultats des suivis longitudinaux post traitements dans le plasma et l'urine présentés aux Articles 2 (Figures 7, S-1 et S-2 aux pages 165, 177 et 178) et 4 (Figures 8, S-2 et S-3 aux pages 242, 256 et 257) respectivement, il semble y avoir une diminution plus constante au niveau de la concentration de l'ensemble des biomarqueurs plasmatiques que pour les biomarqueurs urinaires. Bien qu'une étude avec un plus grand nombre de données/patients sera requise pour confirmer cette observation, en se basant sur nos résultats, une approche envisageable pour le monitoring et le suivi du patient serait de procéder aux dosages plasmatiques et urinaires pour les premières semaines du début d'un traitement puis, lorsque les cliniciens sont en mesure de confirmer que le patient répond bien au traitement, le suivi pourrait être fait uniquement dans l'urine. Évidemment, compte tenu de la nature de la maladie, des prises de sang seraient nécessaires pour évaluer certains désordres hématologiques telles que l'anémie ou la thrombocytopénie. Toutefois, cette approche pourrait réduire grandement le nombre de prises de sang requises en procédant à des analyses urinaires. De plus, le patient pourrait procéder lui-même aux prélèvements urinaires, donc moins de mobilisation de ressources hospitalières requises. Il s'agit là de quelques hypothèses sur l'utilisation potentielle des deux méthodes quantitatives pour aussi évaluer un

profil de biomarqueurs. Plus de données et d'études seront toutefois requises pour comprendre et évaluer le potentiel que ces méthodes pourraient avoir dans un environnement clinique.

#### ***26.2.4 Les méthodes quantitatives et les laboratoires cliniques***

Bien que les méthodes de quantification développées dans le cadre de ce projet ont été validées, davantage de données sur les forces et les limitations des méthodes sont nécessaires pour procéder à un transfert technologique vers la clinique. De fait, un nombre plus élevé de patients Gaucher devrait faire partie d'une étude prospective afin de comprendre la variation et la signification réelle des biomarqueurs identifiés en particulier au niveau de la réponse au traitement. D'ailleurs, il serait important d'évaluer l'influence de certains paramètres face aux biomarqueurs ciblés tels que l'alimentation, l'exercice, la médication ou autres. Bref, il existe encore des questions à répondre sur les propriétés des différents biomarqueurs dans le cadre d'éventuelles études prospectives. De plus, nos études quantitatives sont principalement orientées vers la distribution des biomarqueurs chez les patients. Il serait important d'établir des valeurs de référence chez les contrôles face aux patients de différents âges, sexes et ethnies. Néanmoins, les méthodes quantitatives en spectrométrie de masse développées et validées pourraient facilement être utilisables dans les laboratoires cliniques, considérant qu'elles sont fiables et robustes. Il est toutefois important de mentionner que bien que les méthodes présentées soient robustes, certaines stratégies auraient pu être utilisées afin d'améliorer la spécificité de celles-ci. En effet, l'usage d'ions rapporteurs pourrait augmenter la spécificité des différentes méthodes puisque ce type d'approche utilise deux transitions d'une même molécule afin de s'assurer que la molécule quantifiée est pure. Dans ce type d'approche, un ion « qualitatif » et un ion « quantitatif » sont analysés. Le rapport entre les deux types d'ion est connu pour certains paramètres définis. Ainsi, un écart face à ce rapport suggère la présence d'un contaminant. Cette approche est relativement simple et pourrait facilement être utilisée pour s'assurer des résultats produits.

### ***26.3 Le dépistage des MPSs***

#### ***26.3.1 Le dépistage des MPSs au Québec et ailleurs***

Pour qu'une maladie soit considérée pour un dépistage populationnel, elle doit généralement répondre à 3 critères soit : 1) une détection précoce de la condition doit être possible; 2) elle



doit occasionner une atteinte importante à la santé de l'individu; et 3) des traitements sont disponibles, qui, lorsqu'initiés précocément, permettent d'altérer significativement la progression de la maladie (Chan et Petros, 2019). Aux États-Unis, la MPS I fait partie des maladies qui sont recommandées à être dépistées en période néonatale (Chan et Petros, 2019). De plus, la MPS II est également dépistée au niveau de plusieurs pays dont les États-Unis, le Japon et Taiwan, (Burton *et al.*, 2020). L'inclusion de ces maladies au panel de dépistage fait suite aux nombreuses preuves publiées qui démontrent l'importance d'identifier les patients atteints de MPS afin d'organiser une prise en charge et un traitement rapide (Muenzer, 2014; Al-Sanna *et al.*, 2015; Gabrielli *et al.*, 2016). En effet, plusieurs publications décrivent les différences significatives au niveau de la progression de la maladie chez des enfants ayant reçu un traitement précocément comparativement à ceux ayant reçu un traitement tardivement dans l'enfance (Muenzer, 2014; Al-Sanna *et al.*, 2015; Gabrielli *et al.*, 2016). Un fait à noter est qu'au Québec, les mucopolysaccharidoses ne sont pas dépistées à l'échelle populationnelle. Par contre, considérant le transfert technologique possible du Programme québécois de dépistage néonatal urinaire vers la spectrométrie de masse, un ajout au niveau des biomarqueurs pour les MPSs pourrait facilement être fait dans le cadre d'une recherche évaluative.

### **26.3.2 Les biomarqueurs analysés**

La méthode telle que présentée dans l'Article 5 permet le dosage de l'héparan sulfate et du dermatan sulfate. Par ailleurs, elle pourrait facilement être adaptée pour inclure également le chondroïtine sulfate. En effet, les standards utilisés dans le cadre de cette étude pour doser le dermatan sulfate ne sont pas purs à 100%. Il y a toujours une certaine contamination par le chondroïtine sulfate. Considérant cette contamination et puisque le dermatan sulfate et le chondroïtine sulfate partagent les mêmes transitions, il a été décidé que la séparation chromatographique des deux composés était requise. Donc, dans l'éventualité où cette méthode est utilisée en clinique et que des standards purs sont disponibles pour l'héparan sulfate, le dermatan sulfate ainsi que pour la chondroïtine sulfate, il serait très simple d'inclure ce dernier standard dans la courbe de calibration et de le doser en même temps que les deux autres biomarqueurs.

En ce qui concerne le kératan sulfate qui est augmenté chez les patients atteints des MPS IVA, IVB et VII, la méthanolyse n'est tout simplement pas compatible avec cette méthode, car elle dégrade complètement le kératan sulfate. C'est pour cette raison que les différentes méthodes de dosage du kératan sulfate ont recours à une digestion enzymatique par la kératanase pour la production de composés analysables en spectrométrie de masse en tandem (Auray-Blais *et al.*, 2016; Auray-Blais *et al.*, 2018).

### **26.3.3 Les valeurs de référence pour les MPSs**

Pour ce qui est de la méthode de dépistage des MPSs développée dans le cadre de ce projet, il s'agit là d'une preuve de concept qui pourrait facilement être adaptée et utilisable en clinique. La méthode est simple, rapide et fiable comme démontrée par l'étape de validation. Toutefois, la limitation majeure de cette étude fut l'absence d'échantillons provenant de patients MPSs à 21 jours de vie. Malgré tout, nous avons tenté d'estimer les valeurs de référence pour l'héparan sulfate et le dermatan sulfate en analysant 500 échantillons contrôles et en considérant la moyenne + 3 écarts-types. Typiquement, pour un test clinique, les valeurs de référence sont fixées au 95<sup>e</sup> percentile (Katayev *et al.*, 2010). Cela signifie donc que dans une cohorte de 100 personnes contrôles, automatiquement 5 individus devraient avoir des valeurs dites anormales. Évidemment, pour des tests de dépistage populationnel visant 70 000 échantillons/an, 5% de faux positifs engendre un nombre considérable d'analyses à refaire. Il est donc important de réduire ce nombre de faux positifs, sans augmenter le nombre de faux négatifs. En se basant sur des études récentes qui ont démontré une élévation des biomarqueurs liés aux MPSs chez les nouveau-nés atteints (Arunkumar *et al.*, 2020), nous avons estimé que trois déviations standards au-dessus de la moyenne, comme valeur de référence serait mieux adaptée pour cette méthode de dépistage. Évidemment, il ne s'agit là que d'une estimation. Il est donc fort probable que ces valeurs de référence devront être réajustées après l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons de contrôles et éventuellement de patients appartenant à la population cible. Malgré tout, nous avons testé cette méthode en analysant des échantillons de patients MPS plus âgés pour comparer à des contrôles d'âge et de sexe appariés. Nos résultats ont été concluants. Nous avons pu confirmer que les patients MPS présentaient des augmentations importantes d'héparan sulfate et/ou de dermatan sulfate comparativement aux contrôles.

## 27 CONCLUSIONS

Dans le cadre de la partie touchant la maladie de Gaucher de ce projet de doctorat, nous avons été en mesure de cibler un total de 21 molécules qui pourraient potentiellement être des biomarqueurs pour ladite maladie. En résumé, notre étude métabolomique dans le sang a permis d'identifier 7 biomarqueurs potentiels alors que l'étude métabolomique dans l'urine a révélé 14 biomarqueurs potentiels. Parmi tous ces biomarqueurs potentiels, 11 n'avaient jamais été décrits dans la littérature. D'ailleurs, parmi ces nouveaux biomarqueurs, nous avons identifié une nouvelle classe de métabolites d'intérêt soit les analogues polycycliques du lyso-Gb<sub>1</sub>. Nos résultats indiquent également que cette nouvelle classe de molécules est significativement plus élevée dans l'urine que le lyso-Gb<sub>1</sub> lui-même et les analogues dits « traditionnels » du lyso-Gb<sub>1</sub>.

L'identification des biomarqueurs potentiels pour la maladie de Gaucher par les études métabolomiques nous a permis de travailler au développement et à la validation de méthodes de quantification par spectrométrie de masse en tandem. Ces méthodes s'avèrent fiables et robustes et ont été utilisées afin d'étudier la distribution et les implications de ces biomarqueurs chez des patients traités et non-traités. Ces études ont d'ailleurs révélé des corrélations significatives entre certains biomarqueurs plasmatiques tels que les analogues -28, -12, -2, +14, +16 et +18 Da et les atteintes viscérales et/ou hématologiques des patients Gaucher. De plus, nous avons noté une corrélation significative entre les scores de sévérité et certains biomarqueurs. Nos données indiquent également que les biomarqueurs plasmatiques diminuent rapidement face au traitement par thérapie enzymatique de remplacement, ce qui suggère que lesdits biomarqueurs pourraient être utilisés pour le suivi des patients. De plus en plus d'études proposent d'utiliser le lyso-Gb<sub>1</sub> plasmatique comme outil diagnostique (Hurvitz, 2019). Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude semblent également montrer que le lyso-Gb<sub>1</sub> pourrait jouer un rôle important dans le cadre d'un diagnostic précoce puisque des différences significatives sont perceptibles même entre les patients atténués et les contrôles. En effet, les résultats présentés à l'Article 2 suggèrent des différences significatives au niveau de la distribution du lyso-Gb<sub>1</sub> et les analogues dans le plasma chez les patients atteints d'une forme atténuée de la maladie et les contrôles. Ces données suggèrent donc que les biomarqueurs plasmatiques ciblés sont dotés d'un grand

niveau de sensibilité puisqu'ils sont détectables chez des patients ne présentant que très peu de manifestations cliniques.

Pour ce qui est des biomarqueurs urinaires, des résultats préliminaires suggèrent que les patients atteints d'une forme plus sévère de la maladie semblent avoir de plus haut niveau de biomarqueurs. Il est cependant à noter que cette observation est basée sur un nombre limité de patients présentant des atteintes plus sévères (n=3) parmi la cohorte de patients Gaucher étudiés dans le cadre du développement de la méthode quantitative dans l'urine (Article 3) De plus, en raison d'une cohorte composée de patients ayant une forme atténuée de la maladie, il n'a pas été possible d'étudier en détails les corrélations entre les manifestations cliniques et les biomarqueurs urinaires.

Finalement, nous avons montré la faisabilité d'implanter dans le cadre d'une recherche évaluative éventuelle une méthode de dépistage populationnel des glycosaminoglycans, dermatan sulfate et héparan sulfate, pour les MPS I, II, III, VI et VII qui serait compatible avec le Programme québécois de dépistage néonatal urinaire en existence au Québec. Cette méthode d'une minute permet de doser les deux biomarqueurs normalisés à la créatinine. Aussi, une fois les valeurs de référence optimisées pour différents âges, cette méthode pourrait facilement être transférée en clinique dans le cadre d'un dépistage à haut-risque.

## **28 REMERCIEMENTS**

Premièrement, j'aimerais remercier ma directrice de recherche, Christiane Auray-Blais, qui a été une mentore incroyable durant mes études graduées. Merci pour le temps, le support, les encouragements et les conseils que tu m'as donnés au cours de ces 5 dernières années d'études de maîtrise et de doctorat. Je me considère incroyablement chanceux d'avoir été ton étudiant. Ta joie et ta bonne humeur sont des éléments contagieux qui font en sorte qu'il est un réel plaisir de travailler avec toi. Sincèrement, je pense que tu as relevé avec brio le défi que peut représenter la supervision d'étudiants gradués. Merci de m'avoir pris sous ton aile et de m'avoir guidé à travers toutes ces années. Merci de m'avoir donné une chance de

poursuivre mes études de doctorat dans ton laboratoire. Je te serai éternellement reconnaissant pour tout ce que tu as fait pour moi.

Deuxièmement, j'aimerais remercier mon co-directeur Michel Boutin. Merci, Michel, pour ton temps, ton aide et tes conseils. Sans toi, ce projet n'aurait pas été possible. J'ai l'impression d'avoir beaucoup appris de nos conversations et de nos échanges. Tu m'as permis de voir la spectrométrie de masse d'un autre œil. Merci pour tout !

J'aimerais également remercier tous les membres du laboratoire qui ont rendu les 5 dernières années si agréables.

Finalement, j'aimerais aussi remercier toutes les personnes qui ont contribué à ce projet, patients, contrôles, infirmières, coordonnateurs, médecins et autres. Sans votre collaboration ce projet n'aurait pas été possible.

## 29 LISTE DES RÉFÉRENCES

- Abdelwahab, M., Potegal, M., Shapiro, E. G., Nestrail, I. (2017). Previously unrecognized behavioral phenotype in Gaucher disease type 3. *Neurology Genetics*, 3(3), e158.
- Aerts, J., Miranda, M., Lacerda, L. D., Weely, S. V., Donker-Koopman, W., Brouwer-Kelder, B., Jansen, D., Leeuwen, M., Schram, A., Tsiapara, A., Tager, J. (1991). The identification of type 1 Gaucher disease patients, asymptomatic cases and carriers in The Netherlands using urine samples: An evaluation. *Clinica Chimica Acta*, 203(2-3), 349-361.
- Aghili, H., Tabatabaei, S. M. A., Moghadam, M. G. (2017). Clinical and Radiographic Features of Pycnodysostosis with Emphasis on Dentofacial Problems. *Case Reports in Dentistry*, 2017, 1-5.
- Agilent Technologies (2016). Spectrométrie de masse : Principes de base – Théorie. *Agilent Academic & Institutional Research*, 24-37.
- Al-Sannaa, N. A., Bay, L., Barbouth, D. S., Benhayoun, Y., Goizet, C., Guelbert, N., Jones, S. A., Kyosen, S. O., Martins, A. M., Phornphutkul, C., Reig, C., Pleat, R., Fallet, S., Ivanovska Holder, I. (2015). Early treatment with laronidase improves clinical outcomes in patients with attenuated MPS I: a retrospective case series analysis of nine sibships. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 10, 131.
- Almazroo, O. A., Miah, K. M., Venkataramanan, R. (2017). Clinics in Liver Disease: Drug Metabolism in the Liver, *Elsevier*, 21(1), 1-20.
- Anderson W. (1898). A case of "angiokeratoma". *British Journal of Dermatology*. 1898; 10:113-117.
- Arsenault J. C. (2012) Beginner's Guide to Solid-Phase Extraction. *Waters Corporation*, 48-51.
- Arunkumar, N., Langan, T. J., Stapleton, M., Kubaski, F., Mason, R. W., Singh, R., Kobayashi, H., Yamaguchi, S., Suzuki, Y., Orii, K., Orii, T., Fukao, T., Tomatsu, S. (2020). Newborn screening of mucopolysaccharidoses: past, present, and future. *Journal of Human Genetics*, 65(7), 557-567.
- Auray-Blais, C., Giguère, R., Lemieux, B. (2003). Newborn urine screening programme in the province of Quebec: an update of 30 years' experience. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 26(4), 393-402.
- Auray-Blais, C., Cyr, D., Drouin, R. (2007). Quebec neonatal mass urinary screening programme: from micromolecules to macromolecules. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 30(4), 515-521.

Auray-Blais, C., Bhérier, P., Gagnon, R., Young, S. P., Zhang, H. H., An, Y., Clarke, J. T., Millington, D. S. (2011). Efficient analysis of urinary glycosaminoglycans by LC-MS/MS in mucopolysaccharidoses type I, II and VI. *Molecular Genetics and Metabolism*, 102(1), 49-56.

Auray-Blais, C., Boutin, M., Gagnon, R., Dupont, F. O., Lavoie, P., Clarke, J. T. (2012). Urinary globotriaosylsphingosine-related biomarkers for Fabry disease targeted by metabolomics. *Analytical chemistry*, 84(6), 2745-2753.

Auray-Blais, C., Lavoie, P., Maranda, B., Boutin, M. (2016). Evaluation of urinary keratan sulfate disaccharides in MPS IVA patients using UPLC-MS/MS. *Bioanalysis*, 8(3), 179-191.

Auray-Blais, C., Lavoie, P., Boutin, M., Ntwari, A., Hsu, T.-R., Huang, C.-K., Niu, D.-M. (2017). Biomarkers associated with clinical manifestations in Fabry disease patients with a late-onset cardiac variant mutation. *Clinica Chimica Acta*, 466, 185-193.

Auray-Blais, C., Collette-Tremblay, J., Lavoie, P. (2018). UPLC-MS/MS analysis of keratan sulfate from urine samples collected on filter paper for monitoring & follow-up of Morquio A patients. *Bioanalysis*, 10(15), 1181-1192.

Auray-Blais, C., Boutin, M., Lavoie, P., Maranda, B. (2021). Neonatal Urine Screening Program in the Province of Quebec: Technological Upgrade from Thin Layer Chromatography to Tandem Mass Spectrometry. *International Journal of Neonatal Screening*, 7(1), 18.

Banerjee, S., Mazumdar, S. (2012). Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2012, 282574.

Baris, H. N., Cohen, I. J., Mistry, P. K. (2014). Gaucher Disease: The Metabolic Defect, Pathophysiology, Phenotypes and Natural History. *Pediatric Endocrinology Reviews*. 12(01), 72-81.

Barkhuizen, M., Anderson, D. G., Westhuizen, F. H. V. D., Grobler, A. F. (2017). A molecular analysis of the GBA gene in Caucasian South Africans with Parkinsons disease. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 5(2), 147-156.

Barth, H. G. (2018). Chromatography Fundamentals, Part V: Theoretical Plates: Significance, Properties, and Uses: This month's "Chromatography Fundamentals" is a continuation of the development of the theoretical plate concept, with emphasis on its significance, properties, and uses as applied to liquid chromatography. *LC-GC North America*, 36(11), 830.

Benjamin, R. J., McLaughlin, L. S. (2012). Plasma components: properties, differences, and uses. *Transfusion*, 52 Suppl 1, 9S-19S.

- Bernstein, K. E., Khan, Z., Giani, J. F., Cao, D. Y., Bernstein, E. A., Shen, X. Z. (2018). Angiotensin-converting enzyme in innate and adaptive immunity. *Nature Reviews of Nephrology*, 14(5), 325-336.
- Berruti, G., Paiardi, C. (2011). Acrosome biogenesis: Revisiting old questions to yield new insights. *Spermatogenesis*, 1(2), 95-98.
- Beshlawy, A. E., Murugesan, V., Mistry, P. K., Eid, K. (2019). Reversal of life-threatening hepatopulmonary syndrome in Gaucher disease by imiglucerase enzyme replacement therapy. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 20, 100490.
- Biegstraaten, M., Cox, T. M., Belmatoug, N., Berger, M. G., Collin-Histed, T., Vom Dahl, S., Di Rocco, M., Fraga, C., Giona, F., Giraldo, P., Hasanhodzic, M., Hughes, D. A., Iversen, P. O., Kiewiet, A. I., Lukina, E., Machaczka, M., Marinakis, T., Mengel, E., Pastores, G. M., Plöckinger, U., Hollak, C. (2018). Management goals for type 1 Gaucher disease: An expert consensus document from the European working group on Gaucher disease. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 68, 203-208.
- Bigger, B. W., Begley, D. J., Virgintino, D., Pshezhetsky, A. V. (2018). Anatomical changes and pathophysiology of the brain in mucopolysaccharidosis disorders. *Molecular Genetics and Metabolism*, 125(4), 322-331.
- Biomarkers Definitions Working Group. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 69(3), 89-95.
- Blasco, H., Błaszczyszki, J., Billaut, J. C., Nadal-Desbarats, L., Pradat, P. F., Devos, D., Moreau, C., Andres, C. R., Emond, P., Corcia, P., Słowiński, R. (2015). Comparative analysis of targeted metabolomics: dominance-based rough set approach versus orthogonal partial least square-discriminant analysis. *Journal of Biomedical Informatics*, 53, 291-299.
- Boot, R. G., Verhoek, M., de Fost, M., Hollak, C. E. M., Maas, M., Bleijlevens, B., van Breemen, M. J., van Meurs, M., Boven, L. A., Laman, J. D., Moran, M. T., Cox, T. M., Aerts. (2004). Marked elevation of the chemokine CCL18/PARC in Gaucher disease: a novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention. *Blood*, 103(1), 33-39.
- Boyer, S. W., Barclay, L. J., Burrage, L. C. (2015). Inherited Metabolic Disorders. *Nutrition in Clinical Practice*, 30(4), 502-510.
- Brady, R. O., Kanfer, J. N., Shapiro, D. (1965). Metabolism of glucocerebrosides II. Evidence of an enzymatic deficiency in Gauchers disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 18(2), 221-225.
- Brady R. O. (2006). Enzyme replacement for lysosomal diseases. *Annual Review of Medicine*, 57, 283-296.



- Braulke, T., Bonifacino, J. S. (2009). Sorting of lysosomal proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1793(4), 605-614.
- Brenton, A. G., Godfrey, A. R. (2010). Accurate mass measurement: terminology and treatment of data. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 21(11), 1821-1835.
- Burton, B. K., Hickey, R., Hitchins, L. (2020). Newborn Screening for Mucopolysaccharidosis Type II in Illinois: An Update. *International Journal of Neonatal Screening*, 6(3), 73.
- Buszewski, B., Noga, S. (2012). Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC): A powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(1), 231-247.
- Caterson, B., Melrose, J. (2018). Keratan sulfate, a complex glycosaminoglycan with unique functional capability. *Glycobiology*, 28(4), 182-206.
- Chamoles, N. A., Blanco, M. B., Gaggioli, D., Casentini, C. (2001). Hurler-like phenotype: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clinical Chemistry*, 47(12), 2098–2102.
- Chan, K., Petros, M. (2019). Simple Test, Complex System: Multifaceted Views of Newborn Screening. *Global Pediatric Health*, 6, 2333794X19894812.
- Chandra, G., Bagh, M. B., Peng, S., Saha, A., Sarkar, C., Moralle, M., Zhang, Z., Mukherjee, A. B. (2015). Cln1 gene disruption in mice reveals a common pathogenic link between two of the most lethal childhood neurodegenerative lysosomal storage disorders. *Human Molecular Genetics*, 24(19), 5416-5432.
- Chen, H. H., Sawamoto, K., Mason, R. W., Kobayashi, H., Yamaguchi, S., Suzuki, Y., Orii, K., Orii, T., Tomatsu, S. (2019). Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidoses; past, present, and future. *Journal of Human Genetics*, 64(11), 1153-1171.
- Colmenares-Bonilla, D., Colin-Gonzalez, C., Gonzalez-Segoviano, A., Garcia, E. E., Vela-Huerta, M. M., Lopez-Gomez, F. G. (2018). Diagnosis of Mucopolysaccharidosis Based on History and Clinical Features: Evidence from the Bajío Region of Mexico. *Cureus*, 10 (11), e3617.
- Concolino, D., Deodato, F., Parini, R. (2018). Enzyme replacement therapy: efficacy and limitations. *Italian Journal of Pediatrics*, 44(Suppl 2), 120.
- Cooper, G. M. (2000) *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. *Sunderland (MA): Sinauer Associates*
- Coskun O. (2016). Separation techniques: Chromatography. *Northern Clinics of Istanbul*, 3(2), 156-160.

Coutinho, M. F., Lacerda, L., Alves, S. (2012). Glycosaminoglycan Storage Disorders: A Review. *Biochemistry Research International*, 2012, 1-16.

Coutinho, M. F., Santos, J. I., Alves, S. (2016). Less Is More: Substrate Reduction Therapy for Lysosomal Storage Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1065.

Cox, T. M. (2006). Biomarkers in lysosomal storage diseases. Dans Mehta, A., Beck, M., Sunder-Plassmann, G., *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. Oxford PharmaGenesis, Oxford, Chapitre 9.

Cox, T. M., Amato, D., Hollak, C. E., Luzy, C., Silkey, M., Giorgino, R., Steiner, R. D., Miglustat Maintenance Study Group (2012). Evaluation of miglustat as maintenance therapy after enzyme therapy in adults with stable type 1 Gaucher disease: a prospective, open-label non-inferiority study. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 7, 102.

Dahl, M., Doyle, A., Olsson, K., Månsson, J. E., Marques, A., Mirzaian, M., Aerts, J. M., Ehinger, M., Rothe, M., Modlich, U., Schambach, A., Karlsson, S. (2015). Lentiviral gene therapy using cellular promoters cures type 1 Gaucher disease in mice. *Journal of the American Society of Gene Therapy*, 23(5), 835-844.

Dahl, M., Smith, E., Warsi, S., Rothe, M., Ferraz, M. J., Aerts, J., Golipour, A., Harper, C., Pfeifer, R., Pizzurro, D., Schambach, A., Mason, C., Karlsson, S. (2020). Correction of pathology in mice displaying Gaucher disease type 1 by a clinically-applicable lentiviral vector. *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development*, 20, 312-323.

Danilov, S. M., Tikhomirova, V. E., Metzger, R., Naperova, I. A., Bukina, T. M., Goker-Alpan, O., Tayebi, N., Gayfullin, N. M., Schwartz, D. E., Samokhodskaya, L. M., Kost, O. A., Sidransky, E. (2018). ACE phenotyping in Gaucher disease. *Molecular genetics and metabolism*, 123(4), 501-510.

D'Avanzo, F., Rigon, L., Zanetti, A., Tomanin, R. (2020). Mucopolysaccharidosis Type II: One Hundred Years of Research, Diagnosis, and Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1258.

de Duve, C. (2005). The lysosome turns fifty. *Nature Cell Biology*, 7(9), 847-849.

Deegan, P. B., Cox, T. M. (2012). Imiglucerase in the treatment of Gaucher disease: a history and perspective. *Drug design, development and therapy*, 6, 81-106.

Deevska, G. M., Nikolova-Karakashian, M. N. (2017). The expanding role of sphingolipids in lipid droplet biogenesis. *Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(10 Pt B), 1155-1165.

Degnan, A. J., Ho-Fung, V. M., Ahrens-Nicklas, R. C., Barrera, C. A., Serai, S. D., Wang, D.-J., Ficicioglu, C. (2019). Imaging of non-neuronopathic Gaucher disease: recent advances in quantitative imaging and comprehensive assessment of disease involvement. *Insights into Imaging*, 10(1), 70.

Dinur, T., Bauer, P., Beetz, C., Kramp, G., Cozma, C., Iuraşcu, M. I., Becker-Cohen, M., Istiti, M., Rolfs, A., Zimran, A., Revel-Vilk, S. (2022). Gaucher Disease Diagnosis Using Lyso-Gb1 on Dry Blood Spot Samples: Time to Change the Paradigm? *International journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1627.

Do, J., Mckinney, C., Sharma, P., Sidransky, E. (2019). Glucocerebrosidase and its relevance to Parkinson disease. *Molecular Neurodegeneration*, 14(1).

Dupont, F. O., Gagnon, R., Boutin, M., Auray-Blais, C. (2013). A metabolomic study reveals novel plasma lyso-Gb3 analogs as Fabry disease biomarkers. *Current Medicinal Chemistry*, 20(2), 280-288.

Eaton, S. L., Proudfoot, C., Lillico, S. G., Skehel, P., Kline, R. A., Hamer, K., Rzechorzek, N. B., Clutton, E. M., Gregson, R., King, T., O'Neill, C., Cooper, J., Whitelaw, C., Wishart, T. M. (2019). CRISPR/Cas9 mediated generation of an ovine model for infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN1 disease). *Scientific Reports*, 9(1).

Edmiston, R., Wilkinson, S., Jones, S., Tylee, K., Broomfield, A., Bruce, I. A. (2018). I-Cell Disease (Mucopolipidosis II): A Case Series from a Tertiary Paediatric Centre Reviewing the Airway and Respiratory Consequences of the Disease. *JIMD Reports*, Volume 45, 1-8.

Elstein, D., Belmatoug, N., Deegan, P., Göker-Alpan, Ö., Hughes, D. A., Schwartz, I., Weinreb, N., Bonner, N., Panter, C., Fountain, D., Lenny, A., Longworth, L., Miller, R., Shah, K., Schenk, J., Sen, R., Zimran, A. (2022). Development and validation of Gaucher disease type 1 (GD1)-specific patient-reported outcome measures (PROMs) for clinical monitoring and for clinical trials. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 17(1), 9.

Elstein, D., Mellgard, B., Dinh, Q., Lan, L., Qiu, Y., Cozma, C., Eichler, S., Böttcher, T., Zimran, A. (2017). Reductions in glucosylsphingosine (lyso-Gb1) in treatment-naïve and previously treated patients receiving velaglucerase alfa for type 1 Gaucher disease: Data from phase 3 clinical trials. *Molecular Genetics and Metabolism*, 122(1-2), 113-120.

Fabry J. (1898). Ein Beitrag zur Kenntnis der Purpura haemorrhagica nodularis (Purpura papulosa haemorrhagica Hebrae). *Archive for Dermatology Syphilis*. 1898; 43:187-200.

Fenzl, C., Teramoto, K., Moshirfar, M. (2015). Ocular manifestations and management recommendations of lysosomal storage disorders I: mucopolysaccharidoses. *Clinical Ophthalmology*, 1633.

Ferreira, C. R., Gahl, W. A. (2017). Lysosomal storage diseases. *Translational Science of Rare Diseases*, 2(1-2), 1-71.

FDA (2020). Methods, Method Verification and Validation. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION OFFICE OF REGULATORY AFFAIRS ORA Laboratory Manual Volume II.

Fraldi, A., Serafini, M., Sorrentino, N. C., Gentner, B., Aiuti, A., Bernardo, M. E. (2018). Gene therapy for mucopolysaccharidoses: in vivo and ex vivo approaches. *Italian Journal of Pediatrics*, 44(Suppl 2), 130.

Futerman, A. H., Meer, G. V. (2004). The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(7), 554-565.

Gabrielli, O., Clarke, L. A., Bruni, S., Coppa, G. V. (2010). Enzyme-replacement therapy in a 5-month-old boy with attenuated presymptomatic MPS I: 5-year follow-up. *Pediatrics*, 125(1), e183–e187.

Gabrielli, O., Clarke, L. A., Ficcadenti, A., Santoro, L., Zampini, L., Volpi, N., Coppa, G. V. (2016). 12 year follow up of enzyme-replacement therapy in two siblings with attenuated mucopolysaccharidosis I: the important role of early treatment. *BMC Medical Genetics*, 17, 19.

Garcia-Ac, A., Segura, P. A., Viglino, L., Gagnon, C., Sauvé, S. (2011). Comparison of APPI, APCI and ESI for the LC-MS/MS analysis of bezafibrate, cyclophosphamide, enalapril, methotrexate and orlistat in municipal wastewater. *Journal of Mass Spectrometry*, 46(4), 383-390.

Gaucher. P (1882) De L'epithelioma primitif de la rate, hypertrophie idiopathique de la rate sans leucemie, thèse de médecine de Paris n° 31, Paris, France.

Giraldo, P., Irún, P., Alfonso, P., Dalmau, J., Fernández-Galán, M. A., Figueredo, A., Hernández-Rivas, J., Julia, A., Luño, E., Marín-Jimenez, F., Martín-Nuñez, G., Montserrat, J., Serna, J., Vidaller, A., Villalón, L., Pocovi, M. (2011). Evaluation of Spanish Gaucher disease patients after a 6-month imiglucerase shortage. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 46(1), 115-118.

Giraldo, P., López de Frutos, L., Cebolla, J. J. (2018). Biomarker combination is necessary for the assessment of Gaucher disease? *Annals of Translational Medicine*, 6(Suppl 1), S81.

Giugliani, R., Muschol, N., Keenan, H. A., Dant, M., Muenzer, J. (2021). Improvement in time to treatment, but not time to diagnosis, in patients with mucopolysaccharidosis type I. *Archives of Disease in Childhood*, 106(7), 674–679.

Goker-Alpan, O., Hruska, K. S., Orvisky, E., Kishnani, P. S., Stubblefield, B. K., Schiffmann, R., Sidransky, E. (2005) Divergent phenotypes in Gaucher disease implicate the role of modifiers. *Journal of Medical Genetics*. 42(6), e37.

Greco, G., Letzel, T. (2013). Main interactions and influences of the chromatographic parameters in HILIC separations. *Journal of Chromatographic Science*, 51(7), 684-693.

Griffiths J. (2008). A Brief History of Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 80(15), 5678-5683.

- Gross, J. H., Roepstorff, P. (2014). Mass spectrometry: A textbook. Heidelberg: *Springer*, 21-66.
- Guffon, N., Pettazzoni, M., Pangaud, N., Garin, C., Lina-Granade, G., Plault, C., Mottolese, C., Froissart, R., Fouilhoux, A. (2021). Long term disease burden post-transplantation: three decades of observations in 25 Hurler patients successfully treated with hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 16(1), 60.
- Hampe, C. S., Eisengart, J. B., Lund, T. C., Orchard, P. J., Swietlicka, M., Wesley, J., McIvor, R. S. (2020). Mucopolysaccharidosis Type I: A Review of the Natural History and Molecular Pathology. *Cells*, 9(8), 1838.
- Han, T. U., Sam, R., Sidransky, E. (2020). Small Molecule Chaperones for the Treatment of Gaucher Disease and GBA1-Associated Parkinson Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 271.
- Hao, Z., Xiao, B., Weng, N. (2008). Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *Journal of Separation Science*, 31(9), 1449-1464.
- Hendrickson, C. (2021) Electrospray ionization (ESI). The National High Magnetic Field Laboratory. (<https://nationalmaglab.org/user-facilities/icr/techniques/esi>)
- Hermawan, D., Suwandri, Sulaeman, U., Istiqomah, A., Abou-Eneun, H. Y. (2017). Development of High-Performance Liquid Chromatography for Miconazole Analysis in Powder Sample. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 172, 012011.
- Hers, H., G. (1963). Alpha-Glucosidase deficiency in generalized glycogenstorage disease (Pompe's disease). *The Biochemical Journal*, 86(1), 11-16.
- Honour, J. W. (2011). Development and validation of a quantitative assay based on tandem mass spectrometry. *Annals of Clinical Biochemistry*, 48(2), 97-111.
- Horovitz, D., Leão, E., Ribeiro, E. M., Martins, A. M., Barth, A. L., Neri, J., Kerstenetzky, M., Siqueira, A., Ribeiro, B., Kim, C. A., Santos, F. C., Franco, J., Lichtvan, L., Giuliani, L. R., Rodrigues, M., Bonatti, R., Teixeira, T. B., Gonçalves, A., Lourenço, C. M., Pereira, A., Acosta, A. X. (2021). Long-term impact of early initiation of enzyme replacement therapy in 34 MPS VI patients: A resurvey study. *Molecular Genetics and Metabolism*, 133(1), 94-99.
- Hughes, D., Cappellini, M. D., Berger, M., Van Droogenbroeck, J., de Fost, M., Janic, D., Marinakis, T., Rosenbaum, H., Villarubia, J., Zhukovskaya, E., Hollak, C. (2007). Recommendations for the management of the haematological and onco-haematological aspects of Gaucher disease. *British Journal of Haematology*, 138(6), 676-686.
- Hughes, D., Mikosch, P., Belmatoug, N., Carubbi, F., Cox, T., Goker-Alpan, O., Kindmark, A., Mistry, P., Poll, L., Weinreb, N., Deegan, P. (2019). Gaucher Disease in Bone: From Pathophysiology to Practice. *Journal of Bone and Mineral Research*, 34(6), 996-1013.

Hurvitz, N., Dinur, T., Becker-Cohen, M., Cozma, C., Hovakimyan, M., Oppermann, S., Demuth, L., Rolfs, A., Abramov, A., Zimran, A., Revel-Vilk, S. (2019). Glucosylsphingosine (lyso-Gb<sub>1</sub>) as a Biomarker for Monitoring Treated and Untreated Children with Gaucher Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(12), 3033.

Istaiti, M., Revel-Vilk, S., Becker-Cohen, M., Dinur, T., Ramaswami, U., Castillo-Garcia, D., Ceron-Rodriguez, M., Chan, A., Rodic, P., Tincheva, R. S., Al-Hertani, W., Lee, B. H., Yang, C. F., Kiec-Wilk, B., Fiumara, A., Rubio, B., Zimran, A. (2021). Upgrading the evidence for the use of ambroxol in Gaucher disease and GBA related Parkinson: Investigator initiated registry based on real life data. *American Journal of Hematology*, 96(5), 545-551.

Jakóbkiewicz-Banecka, J., Piotrowska, E., Narajczyk, M., Barańska, S., Wegrzyn, G. (2009). Genistein-mediated inhibition of glycosaminoglycan synthesis, which corrects storage in cells of patients suffering from mucopolysaccharidoses, acts by influencing an epidermal growth factor-dependent pathway. *Journal of Biomedical Science*, 16(1), 26.

Jandera, P., Hájek, T. (2018). Mobile phase effects on the retention on polar columns with special attention to the dual hydrophilic interaction-reversed-phase liquid chromatography mechanism, a review. *Journal of Separation Science*, 41(1), 145-162.

Jeanne Dit Fouque, D., Maroto, A., Memboeuf, A. (2018). Internal Standard Quantification Using Tandem Mass Spectrometry of a Tryptic Peptide in the Presence of an Isobaric Interference. *Analytical Chemistry*, 90(24), 14126-14130.

Jian, J., Chen, Y., Liberti, R., Fu, W., Hu, W., Saunders-Pullman, R., Pastores, G., Chen, Y., Sun, Y., Grabowski, G., Liu, C. J. (2018). Chitinase-3-like Protein 1: A Progranulin Downstream Molecule and Potential Biomarker for Gaucher Disease. *EBioMedicine*, 28, 251-260.

Kadali, S., Kolusu, A., Gummadi, M. R., Undamatla, J. (2014). The relative frequency of lysosomal storage disorders: a medical genetics referral laboratory's experience from India. *Journal of Child Neurology*, 29(10), 1377-1382.

Kaddah, N. A., Saied, D. A., Alwakeel, H. A., Hashem, R. H., Rowizak, S. M., Elmonem, M. A. (2017). Plasma chitotriosidase and carotid intima-media thickness in children with sickle cell disease. *International Journal of Hematology*, 106(5), 648-654.

Kalinichenko, L. S., Gulbins, E., Kornhuber, J., Müller, C. P. (2018). The role of sphingolipids in psychoactive drug use and addiction. *Journal of Neural Transmission*, 125(4), 651-672.

Katayev, A., Balciza, C., Seccombe, D. W. (2010). Establishing reference intervals for clinical laboratory test results: is there a better way? *American Journal of Clinical Pathology*, 133(2), 180-186.

Kavcic, N., Pegan, K., Turk, B. (2017). Lysosomes in programmed cell death pathways: from initiators to amplifiers. *Biological Chemistry*, 398(3), 289-301.

Kelley, K. (2010). Tay-Sachs Disease. *Embryo Project Encyclopedia, Arizona State University. School of Life Sciences, AZ, USA. ISSN: 1940-5030.*

Kherif, F., Latypova, A. (2020). Machine Learning - Chapter 12 - Principal component analysis, *Academic Press*, 209-225.

King, R., Bonfiglio, R., Fernandez-Metzler, C., Miller-Stein, C., Olah, T. (2000). Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 11(11), 942-950.

Kingma, S., Jonckheere, A. I. (2021). MPS I: Early diagnosis, bone disease and treatment, where are we now? *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 44(6), 1289–1310.

Kirkland, J.J., Langlois, T.J., DeStefano J.J. (N.D). New Fused-Core Particles for Very Fast HPLC Separation. *Advanced Materials Technology*.

Kiykim, E., Barut, K., Cansever, M. S., Zeybek, C. A., Zubarioglu, T., Aydin, A., Kasapcopur, O. (2016). Screening Mucopolysaccharidosis Type IX in Patients with Juvenile Idiopathic Arthritis. *JIMD Reports*, 25, 21-24.

Kowalewski, B., Lamanna, W. C., Lawrence, R., Damme, M., Stroobants, S., Padva, M., Kalus, I., Frese, M. A., Lübke, T., Lüllmann-Rauch, R., D'Hooge, R., Esko, J. D., Dierks, T. (2012). Arylsulfatase G inactivation causes loss of heparan sulfate 3-O-sulfatase activity and mucopolysaccharidosis in mice. *PNAS*. 109(26), 10310-10315.

Kubaski, F., Osago, H., Mason, R. W., Yamaguchi, S., Kobayashi, H., Tsuchiya, M., Orii, T., Tomatsu, S. (2017). Glycosaminoglycans detection methods: Applications of mass spectrometry. *Molecular Genetics and Metabolism*, 120(1-2), 67-77.

Kubaski, F., de Oliveira Poswar, F., Michelin-Tirelli, K., Burin, M. G., Rojas-Málaga, D., Brusius-Facchin, A. C., Leistner-Segal, S., Giugliani, R. (2020). Diagnosis of Mucopolysaccharidoses. *Diagnostics*, 10(3), 172.

Lal, R. T., Sidransky, E. (2017). The Spectrum of Neurological Manifestations Associated with Gaucher Disease. *Diseases*, 5(1),10.

Lecourt, S., Vanneaux, V., Cras, A., Freida, D., Heraoui, D., Herbi, L., Caillaud, C., Chomienne, C., Marolleau, J. P., Belmatoug, N., Larghero, J. (2012) Bone marrow microenvironment in an in vitro model of gaucher disease: consequences of glucocerebrosidase deficiency. *Stem Cells and Development*, 21(2),239-248.

Lee, D. K., In, J., Lee, S. (2015). Standard deviation and standard error of the mean. *Korean Journal of Anesthesiology*, 68(3), 220-223.

- Lim, J.-A., Kakhlon, O., Li, L., Myerowitz, R., Raben, N. (2015). Pompe disease: Shared and unshared features of lysosomal storage disorders. *Rare Diseases*, 3(1), e1068978.
- Lin, X. (2004). Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development*, 131(24), 6009-6021.
- Linari, S., Castaman, G. (2015). Hematological manifestations and complications of Gaucher disease. *Expert Review of Hematology*, 9(1), 51-58.
- Lindahl, U., Couchman, J., Kimata, K., Esko, J. D. (2017). Essentials of Glycobiology: Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Lindon, J. C., Tranter, G. E., Koppenaal, D. W. (2010). Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry. *Amsterdam: Elsevier*.
- Liou, B., Zhang, W., Fannin, V., Quinn, B., Ran, H., Xu, K., Setchell, K., Witte, D., Grabowski, G. A., Sun, Y. (2019). Combination of acid  $\beta$ -glucosidase mutation and Saposin C deficiency in mice reveals Gba1 mutation dependent and tissue-specific disease phenotype. *Scientific Reports*, 9(1), 5571.
- López-Ruiz, R., Romero-González, R., Garrido-Frenich, A. (2019). Ultra-high-pressure liquid chromatography-mass spectrometry: An overview of the last decade. *Trends in Analytical Chemistry*, 118, 170-181.
- Lu, J., Yang, C., Chen, M., Ye, D. Y., Lonser, R. R., Brady, R. O., Zhuang, Z. (2011). Histone deacetylase inhibitors prevent the degradation and restore the activity of glucocerebrosidase in Gaucher disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(52), 21200–21205.
- Luzio, J. P., Hackmann, Y., Dieckmann, N. M. G., Griffiths, G. M. (2014). The Biogenesis of Lysosomes and Lysosome-Related Organelles. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(9).
- Lv, Y., Wang, G., Xu, W., Tao, P., Lv, X., Wang, Y. (2015). Tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a marker of osteoclast number and volume in RAW 264.7 cells treated with receptor-activated nuclear  $\kappa$ B ligand. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 9(1), 143-146.
- Maegawa, G. H. B., Tropak, M. B., Buttner, J. D., Rigat, B. A., Fuller, M., Pandit, D., Tang, L., Kornhaber, G. J., Hamuro, Y., Clarke, J. T. R., Mahuran, D. J. (2009). Identification and Characterization of Ambroxol as an Enzyme Enhancement Agent for Gaucher Disease. *Journal of Biological Chemistry*, 284(35), 23502-23516.
- McBride, K. L., Flanigan, K. M. (2021). Update in the Mucopolysaccharidoses. *Seminars in Pediatric Neurology*, 37, 100874.



Mehta, A. (2006). Epidemiology and natural history of Gaucher's disease. *European Journal of Internal Medicine*, 17 Suppl: S2-5.

Mehta, A., Beck, M., Sunder-Plassmann, G., Widmer, U. (2006). Fabry disease: Perspectives from 5 years of FOS. *Oxford: PharmaGenesis*.

Menkovic, I., Lavoie, P., Boutin, M., Auray-Blais, C. (2019). Distribution of heparan sulfate and dermatan sulfate in mucopolysaccharidosis type II mouse tissues pre- and post-enzyme-replacement therapy determined by UPLC–MS/MS. *Bioanalysis*, 11(8), 727-740.

Menkovic, I., Marchand, A. S., Boutin, M., Auray-Blais, C. (2019). Neonatal Mass Urine Screening Approach for Early Detection of Mucopolysaccharidoses by UPLC-MS/MS. *Diagnostics*, 9(4), 195.

Menkovic, I., Boutin, M., Alayoubi, A., Mercier, F. E., Rivard, G. É., Auray-Blais, C. (2020). Identification of a Reliable Biomarker Profile for the Diagnosis of Gaucher Disease Type 1 Patients Using a Mass Spectrometry-Based Metabolomic Approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 7869.

Menkovic, I., Boutin, M., Alayoubi, A., Curado, F., Bauer, P., Mercier, F. E., Auray-Blais, C. (2022). Metabolomic Study Using Time-of-Flight Mass Spectrometry Reveals Novel Urinary Biomarkers for Gaucher Disease Type 1. *Journal of Proteome Research*, 21(5), 1321–1329.

Menkovic, I., Boutin, M., Alayoubi, A., Curado, F., Bauer, P., Mercier, F. E., Auray-Blais, C. (2022). Quantitation of a Urinary Profile of Biomarkers in Gaucher Disease Type 1 Patients Using Tandem Mass Spectrometry. *Diagnostics, en révision*

Menkovic, I., Boutin, M., Alayoubi, A., Curado, F., Bauer, P., Mercier, F. E., Rivard, G. É., Auray-Blais, C. (2022). Quantitation of a plasma biomarker profile for the early detection of Gaucher disease type 1 patients. *Bioanalysis*, 14(4), 223–240.

Meyer-Schwesinger C. (2021). Lysosome function in glomerular health and disease. *Cell and Tissue Research*, 385(2), 371-392.

Mirzaian, M., Wisse, P., Ferraz, M. J., Gold, H., Donker-Koopman, W. E., Verhoek, M., Overkleeft, H., Boot, R., Kramer, G., Dekker, N., Aerts, J. M. (2015). Mass spectrometric quantification of glucosylsphingosine in plasma and urine of type 1 Gaucher patients using an isotope standard. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 54(4), 307-314.

Mirzaian, M., Wisse, P., Ferraz, M. J., Marques, A., Gaspar, P., Oussoren, S. V., Kytidou, K., Codée, J., van der Marel, G., Overkleeft, H. S., Aerts, J. M. (2017). Simultaneous quantitation of sphingoid bases by UPLC-ESI-MS/MS with identical <sup>13</sup>C-encoded internal standards. *Clinica chimica acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 466, 178-184.

Mistry, P. K., Liu, J., Sun, L., Chuang, W. L., Yuen, T., Yang, R., Lu, P., Zhang, K., Li, J., Keutzer, J., Stachnik, A., Mennone, A., Boyer, J. L., Jain, D., Brady, R. O., New, M. I., Zaidi, M. (2014). Glucocerebrosidase 2 gene deletion rescues type 1 Gaucher disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(13), 4934-4939.

Mistry, P. K., Lopez, G., Schiffmann, R., Barton, N. W., Weinreb, N. J., Sidransky, E. (2017). Gaucher disease: Progress and ongoing challenges. *Molecular genetics and metabolism*, 120(1-2), 8-21.

Motta, I., Consonni, D., Stroppiano, M., Benedetto, C., Cassinerio, E., Tappino, B., Ranalli, P., Borin, L., Facchini, L., Patriarca, A., Barcellini, W., Lanza, F., Filocamo, M., Cappellini (2021). Predicting the probability of Gaucher disease in subjects with splenomegaly and thrombocytopenia. *Scientific Reports*, 11(1), 2594.

Mucci, J. M., Scian, R., De Francesco P. N., Garcia, F. S., Ceci, R., Frossati, C. A., Delphino, M. V., Rozenfeld, P. A. (2012) Induction of osteoclastogenesis in an in vitro model of Gaucher disease is mediated by T cells via TNF- $\alpha$ . *Gene*, 509(1), 51-59.

Mucci, J. M., Rozenfeld, P. (2015). Pathogenesis of Bone Alterations in Gaucher Disease: The Role of Immune System. *Journal of Immunology Research*, 2015, 1-6.

Muenzer J. (2014). Early initiation of enzyme replacement therapy for the mucopolysaccharidoses. *Molecular Genetics and Metabolism*, 111(2), 63-72.

Murugesan, V., Chuang, W. L., Liu, J., Lischuk, A., Kacena, K., Lin, H., Pastores, G. M., Yang, R., Keutzer, J., Zhang, K., Mistry, P. K. (2016). Glucosylsphingosine is a key biomarker of Gaucher disease. *American Journal of Hematology*, 91(11), 1082-1089.

Nagarajan, A., Malvi, P., Wajapeyee, N. (2018). Heparan Sulfate and Heparan Sulfate Proteoglycans in Cancer Initiation and Progression. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 483

Narita, A., Shirai, K., Itamura, S., Matsuda, A., Ishihara, A., Matsushita, K., Fukuda, C., Kubota, N., Takayama, R., Shigematsu, H., Hayashi, A., Kumada, T., Yuge, K., Watanabe, Y., Kosugi, S., Nishida, H., Kimura, Y., Endo, Y., Higaki, K., Nanba, E., Nishimura, Y., Tamasaki, A., Togawa, M., Saito, Y., Maegaki, Y., Ohno, K., Suzuki, Y. (2016). Ambroxol chaperone therapy for neuronopathic Gaucher disease: A pilot study. *Annals of clinical and Translational Neurology*, 3(3), 200-215.

Neudorfer, O., Giladi, N., Elstein, D., Abrahamov, A., Turezkite, T., Aghai, E., Reches, A., Bembi, B Zimran, A. (1996). Occurrence of Parkinsons syndrome in type 1 Gaucher disease. *Qjm*, 89(9), 691-694.

Nguyen, Y., Stirneman, J., Belmatoug, N. (2019). La maladie de Gaucher : quand y penser ? *Revue de Médecine Interne*, 40(5), 313-322.

Organisation Mondiale de la Santé (OMS). (1993). International Programme on Chemical Safety Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. *INCHEM*.

Orvisky, E., Park, J. K., Lamarca, M. E., Ginns, E. I., Martin, B. M., Tayebi, N., Sidransky, E. (2002). Glucosylsphingosine accumulation in tissues from patients with Gaucher disease: correlation with phenotype and genotype. *Molecular Genetics and Metabolism*, 76(4), 262-270.

Oto, Y., Inoue, T., Nagai, S., Tanaka, S., Itabashi, H., Shiraisihi, M., Nitta, A., Murakami, N., Ida, H., Matsubara, T. (2021). Successful treatment of Gaucher disease type 1 by enzyme replacement therapy over a 10-year duration in a Japanese pediatric patient: A case report. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 21(3), 246.

Panuwet, P., Hunter, R. E., Dsouza, P. E., Chen, X., Radford, S. A., Cohen, J. R., Marder, M. E., Kartavenka, K., Ryan, P. B., Barr, D. B. (2016). Biological matrix effects in quantitative tandem mass spectrometry-based analytical methods: advancing biomonitoring. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 46(2), 93-105.

Parenti, G., Andria, G., Valenzano, K. J. (2015). Pharmacological Chaperone Therapy: Preclinical Development, Clinical Translation, and Prospects for the Treatment of Lysosomal Storage Disorders. *Journal of the American Society of Gene Therapy*, 23(7), 1138-1148.

Parenti, G., Medina, D. L., Ballabio, A. (2021). The rapidly evolving view of lysosomal storage diseases. *EMBO Molecular Medicine*, 13(2), e12836.

Parini, R., Deodato, F. (2020). Intravenous Enzyme Replacement Therapy in Mucopolysaccharidoses: Clinical Effectiveness and Limitations. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 2975.

Pavan, E., Ormazabal, M., Peruzzo, P., Vaena, E., Rozenfeld, P., Dardis, A. (2020). CRISPR/Cas9 Editing for Gaucher Disease Modelling. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3268.

Phang-Lyn, S., Llerena, V. A. (2021) Biochemistry, Biotransformation. *StatPearls Treasure Island*, 1-5.

Phetthong, T., Tim-Aroon, T., Khongkraparn, A., Noojarern, S., Kuptanon, C., Wichajarn, K., Sathienkijanchai, A., Suphapeetiporn, K., Charoenkwan, P., Tantiworawit, A., Noentong, N., Wattanasirichaigoon, D. (2021). Gaucher disease: clinical phenotypes and refining GBA mutational spectrum in Thai patients. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 16(1), 519.

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

Piotrowska, E., Jakóbkiewicz-Banecka, J., Tylki-Szymanska, A., Liberek, A., Maryniak, A., Malinowska, M., Czartoryska, B., Puk, E., Kloska, A., Liberek, T., Baranska, S., Wegrzyn, A., Wegrzyn, G. (2008). Genistin-rich soy isoflavone extract in substrate reduction therapy for Sanfilippo syndrome: An open-label, pilot study in 10 pediatric patients. *Current Therapeutic Research, Clinical and Experimental*, 69(2), 166-179.

Pomin, V., Mulloy, B. (2018). Glycosaminoglycans and Proteoglycans. *Pharmaceuticals*, 11(1), 27.

Portolés, T., Pitarch, E., López, F. J., Hernández, F., Niessen, W. M. (2011). Use of soft and hard ionization techniques for elucidation of unknown compounds by gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(11), 1589-1599.

Puckett, Y., Mallorga-Hernández, A., Montaña, A. M. (2021). Epidemiology of mucopolysaccharidoses (MPS) in United States: challenges and opportunities. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 16(1), 241.

Purushothaman, A., Fukuda, J., Mizumoto, S., Dam, G. B. T., Kuppevelt, T. H. V., Kitagawa, H., Mikami, T., Sugahara, K. (2007). Functions of Chondroitin Sulfate/Dermatan Sulfate Chains in Brain Development. *Journal of Biological Chemistry*, 282(27), 19442-19452.

Raposo, F., Barcelo, D. (2021). Challenges and strategies of matrix effects using chromatography-mass spectrometry: An overview from research versus regulatory viewpoints. *Trends in Analytical Chemistry*, 134, 116068.t.

Raskovalova, T., Deegan, P. B., Yang, R., Pavlova, E., Stirnemann, J., Labarère, J., Zimran, A., Mistry, P., Berger, M. (2017). Plasma chitotriosidase activity versus CCL18 level for assessing type I Gaucher disease severity: protocol for a systematic review with meta-analysis of individual participant data. *Systematic Reviews*, 6(1).

Raskovalova, T., Deegan, P. B., Mistry, P. K., Pavlova, E., Yang, R., Zimran, A., Berger, J., Bourgne, C., Pereira, B., Labarère, J., Berger, M. G. (2021). Accuracy of chitotriosidase activity and CCL18 concentration in assessing type I Gaucher disease severity. A systematic review with meta-analysis of individual participant data. *Haematologica*, 106(2), 437-445.

Regenboog, M., Kuilenburg, A. B. V., Verheij, J., Swinkels, D. W., Hollak, C. E. (2016). Hyperferritinemia and iron metabolism in Gaucher disease: Potential pathophysiological implications. *Blood Reviews*, 30(6), 431-437.

Revel-Vilk, S., Szer, J., Mehta, A., Zimran, A. (2018). How we manage Gaucher Disease in the era of choices. *British Journal of Haematology*, 182(4), 467-480.

Revel-Vilk, S., Fuller, M., Zimran, A. (2020). Value of Glucosylsphingosine (Lyso-Gb<sub>1</sub>) as a Biomarker in Gaucher Disease: A Systematic Literature Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7159.

- Riboldi, G. M., Fonzo, A. B. D. (2019). GBA, Gaucher Disease, and Parkinson's Disease: From Genetic to Clinic to New Therapeutic Approaches. *Cells*, 8(4), 364.
- Rochat, B. (2018). Quantitative and Qualitative LC-High-Resolution MS: The Technological Biological Reasons for a Shift of Paradigm. Recent Advances in Analytical. *IntechOpen*, 1-15.
- Rockwood, A., Kushnir, M., Clarke, J. (2018). Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry, *Elsevier*, 33-65.
- Rolfs, A., Giese, A. K., Grittner, U., Mascher, D., Elstein, D., Zimran, A., Böttcher, T., Lukas, J., Hübner, R., Gölnitz, U., Röhle, A., Dudsek, A., Meyer, W., Wittstock, M., Mascher, H. (2013). Glucosylsphingosine is a highly sensitive and specific biomarker for primary diagnostic and follow-up monitoring in Gaucher disease in a non-Jewish, Caucasian cohort of Gaucher disease patients. *PloS One*, 8(11), e79732.
- Rosenbloom, B. E., Weinreb, N. J., Zimran, A., Kacena, K. A., Charrow, J., Ward, E. (2010). Gaucher disease and cancer incidence: a study from the Gaucher Registry. *Blood*, 105:4569-4572.
- Sabatini, D. D., Adesnik, M. (2013). Christian de Duve: Explorer of the cell who discovered new organelles by using a centrifuge. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(33), 13234-13235.
- Saftig, P., Klumperman, J. (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(9), 623-635.
- Sarigul, N., Korkmaz, F., Kurultak, İ. (2019). A New Artificial Urine Protocol to Better Imitate Human Urine. *Scientific Reports*, 9(1), 20159.
- Sattelle, B. M., Shakeri, J., Cliff, M. J., Almond, A. (2015). Proteoglycans and their heterogeneous glycosaminoglycans at the atomic scale. *Biomacromolecules*, 16(3), 951-961.
- Schiffmann, R., Sevigny, J., Rolfs, A., Davies, E. H., Goker-Alpan, O., Abdelwahab, M., Vellodi, A., Mengel, E., Lukina, E., Yoo, H. W., Collin-Histed, T., Narita, A., Dinur, T., Revel-Vilk, S., Arkadir, D., Szer, J., Wajnrajch, M., Ramaswami, U., Sidransky, E., Donald, A., Zimran, A. (2020). The definition of neuronopathic Gaucher disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 43(5), 1056-1059.
- Schielen, P., Kemper, E., Gelb, M. (2017). Newborn Screening for Lysosomal Storage Diseases: A Concise Review of the Literature on Screening Methods, Therapeutic Possibilities and Regional Programs. *International Journal of Neonatal Screening*, 3(2), 6.
- Schwake, M., Schröder, B., Saftig, P. (2013). Lysosomal Membrane Proteins and Their Central Role in Physiology. *Traffic*, 14(7), 739-48.

Sidhu, R., Mikulka, C. R., Fujiwara, H., Sands, M. S., Schaffer, J. E., Ory, D. S., Jiang, X. (2018). A HILIC-MS/MS method for simultaneous quantification of the lysosomal disease markers galactosylsphingosine and glucosylsphingosine in mouse serum. *Biomedical Chromatography*, 32(7), e4235.

Simpson, W. L., Hermann, G., Balwani, M. (2014). Imaging of Gaucher disease. *World Journal of Radiology*, 6(9), 657-668.

Smid, B. E., Ferraz, M. J., Verhoek, M., Mirzaian, M., Wisse, P., Overkleeft, H. S., Hollak, C. E., Aerts, J. M. (2016). Biochemical response to substrate reduction therapy versus enzyme replacement therapy in Gaucher disease type 1 patients. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 11, 28.

Smith, J. S., Thakur, R. A. (2010). Food Analysis: Mass Spectrometry. *Springer*, Boston, MA. 457-470.

Söderström, A. C., Nybo, M., Nielsen, C., Vinholt, P. J. (2016). The effect of centrifugation speed and time on pre-analytical platelet activation. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 54(12), 1913-1920.

Stapleton, M., Kubaski, F., Mason, R. W., Yabe, H., Suzuki, Y., Orii, K. E., Orii, T., Tomatsu, S. (2017). Presentation and Treatments for Mucopolysaccharidosis Type II (MPS II; Hunter Syndrome). *Expert Opinion on Orphan Drugs*, 5(4), 295-307.

Steckel, A., Schlosser, G. (2019). An Organic Chemist's Guide to Electrospray Mass Spectrometric Structure Elucidation. *Molecules*, 24(3), 611.

Stein, P., Yu, H., Jain, D., Mistry, P. K. (2010). Hyperferritinemia and iron overload in type 1 Gaucher disease. *American Journal of Hematology*, 85(7), 472-476.

Stiles, A. R., Huggins, E., Fierro, L., Jung, S. H., Balwani, M., Kishnani, P. S. (2021). The role of glucosylsphingosine as an early indicator of disease progression in early symptomatic type 1 Gaucher disease. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 27, 100729.

Stirnemann, J., Rose, C., Serratrice, C., Dalbies, F., Lidove, O., Masseau, A., Pers, Y.-M., Baron, C., Belmatoug, N. (2015). Impact of imiglucerase supply constraint on the therapeutic management and course of disease in French patients with Gaucher disease type 1. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 10(1).

Stirnemann, J., Belmatoug, N., Camou, F., Serratrice, C., Froissart, R., Caillaud, C., Levade, T., Astudillo, L., Serratrice, J., Brassier, A., Rose, C., de Villemeur, T. B., Berger, M. G. (2017). A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 441.

Stirnemann, J., Vigan, M., Hamroun, D., Heraoui, D., Rossi-Semerano, L., Berger, M. G., Rose, C., Camou, F., de Roux-Serratrice, C., Grosbois, B., Kaminsky, P., Robert, A., Caillaud, C., Froissart, R., Levade, T., Masseau, A., Mignot, C., Sedel, F., Dobbelaere, D.,

Vanier, M. T., Valayanopoulos, V., Fain, O., Fantin, B., de Villemeur, T. B., Mentré, F., Belmatoug, N. (2012). The French Gaucher Disease Registry: Clinical characteristics, complications and treatment of 562 patients. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 9(7), 77.

Sun A. (2018). Lysosomal storage disease overview. *Annals of Translational Medicine*, 6(24), 476.

Taegtmeyer, H., Ingwall, J. S. (2013). Creatine--a dispensable metabolite? *Circulation Research*, 112(6), 878-880.

Takeda Pharmaceuticals. (2020). VPRIV: Velaglucerase alfa, *Product Monograph*.

Tanpaiboon, P. (2019). Practical management of lysosomal storage disorders (LSDs). *Translational Science of Rare Diseases*, 1–25.

Taylor, M., Khan, S., Stapleton, M., Wang, J., Chen, J., Wynn, R., Yabe, H., Chinen, Y., Boelens, J. J., Mason, R. W., Kubaski, F., Horovitz, D., Barth, A. L., Serafini, M., Bernardo, M. E., Kobayashi, H., Orii, K. E., Suzuki, Y., Orii, T., Tomatsu, S. (2019). Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Mucopolysaccharidoses: Past, Present, and Future. *Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 25(7), e226-e246.

Thein, M. S., Kohli, A., Ram, R., Ingaramo, M. C., Jain, A., Fedarko, N. S. (2017). Chitotriosidase, a marker of innate immunity, is elevated in patients with primary breast cancer. *Cancer Biomarkers: Section A of Disease Markers*, 19(4), 383-391.

Tomatsu, S., Yasuda, E., Patel, P., Ruhnke, K., Shimada, T., Mackenzie, W. G., Mason, R., Thacker, M. M., Theroux, M., Montañó, A. M., Alméciga-Díaz, C. J., Barrera, L. A., Chinen, Y., Sly, W. S., Rowan, D., Suzuki, Y., Orii, T. (2014). Morquio A syndrome: diagnosis and current and future therapies. *Pediatric Endocrinology Reviews*, 12 Suppl 1(1), 141-151.

Tsukamoto, S., Hara, T., Yamamoto, A., Ohta, Y., Wada, A., Ishida, Y., Kito, S., Nishikawa, T., Minami, N., Sato, K., Kokubo, T. (2013). Functional analysis of lysosomes during mouse preimplantation embryo development. *The Journal of reproduction and development*, 59(1), 33-39.

Ueda, N., Takasawa, K. (2018). Impact of Inflammation on Ferritin, Hepcidin and the Management of Iron Deficiency Anemia in Chronic Kidney Disease. *Nutrients*, 10(9), 1173.

van den Berg, R. A., Hoefsloot, H. C., Westerhuis, J. A., Smilde, A. K., van der Werf, M. J. (2006). Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics*, 7, 142.

van Dussen, L., Lips, P., Everts, V. E., Bravenboer, N., Jansen, I. D., Groener, J. E., Maas, M., Blokland, J. A., Aerts, J. M., Hollak, C. E. (2011). Markers of bone turnover in Gaucher disease: modeling the evolution of bone disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 96(7), 2194–2205.

Vlugt, K., Langeveld, M., Poppema, A., Kuiper, S., Hollak, C. E., Aerts, J. M., Groener, J. E. (2008). Prominent increase in plasma ganglioside GM3 is associated with clinical manifestations of type I Gaucher disease. *Clinica Chimica Acta*, 389(1-2), 109-113.

Wang, Y., Sun, J., Qiao, J., Ouyang, J., Na, N. (2018). A "Soft" and "Hard" Ionization Method for Comprehensive Studies of Molecules. *Analytical Chemistry*, 90(24), 14095-14099.

Waters. (ND). Cortecs: A sub-2-um solid-core particle column that lives up to its potential. *Cortecs Columns User guide*

Welford, R. W., Garzotti, M., Marques Lourenço, C., Mengel, E., Marquardt, T., Reunert, J., Amraoui, Y., Kolb, S. A., Morand, O., Groenen, P. (2014). Plasma lysosphingomyelin demonstrates great potential as a diagnostic biomarker for Niemann-Pick disease type C in a retrospective study. *PloS one*, 9(12), e114669.

Wiklund, S., Johansson, E., Sjöström, L., Mellerowicz, E. J., Edlund, U., Shockcor, J. P., Gottfries, J., Moritz, T., Trygg, J. (2008). Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Analytical Chemistry*, 80(1), 115-122.

Wilm M. (2011). Principles of electrospray ionization. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(7), M111.009407.

Winchester, B. (2012). Classification of Lysosomal Storage Diseases. *Lysosomal Storage Disorders*, 37-46.

Xu, H., Ren, D. (2015). Lysosomal Physiology. *Annual Review of Physiology*, 77(1), 57-80.

Yang, C., Rahimpour, S., Lu, J., Pacak, K., Ikejiri, B., Brady, R. O., Zhuang, Z. (2012). Histone deacetylase inhibitors increase glucocerebrosidase activity in Gaucher disease by modulation of molecular chaperones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(3), 966-971.

Yap, J., McCurdy, S., Alcalá, M., Irei, J., Garo, J., Regan, W., Lee, B. H., Kitamoto, S., Boisvert, W. A. (2020). Expression of Chitotriosidase in Macrophages Modulates Atherosclerotic Plaque Formation in Hyperlipidemic Mice. *Frontiers in Physiology*, 11, 714.

Yates, J. (2011) A Century of Mass Spectrometry: From Atoms to Proteomes. *Nature Methods* 8, 633-637.

Yin, Y., Wang, A., Feng, L., Wang, Y., Zhang, H., Zhang, I., Bany, B. M., Ma, L. (2018). Heparan Sulfate Proteoglycan Sulfation Regulates Uterine Differentiation and Signaling During Embryo Implantation. *Endocrinology*, 159(6), 2459-2472.

Zanetti, A., D'Avanzo, F., Rigon, L., Rampazzo, A., Concolino, D., Barone, R., Volpi, N., Santoro, L., Lualdi, S., Bertola, F., Scarpa, M., Tomanin, R. (2019). Molecular diagnosis of



patients affected by mucopolysaccharidosis: a multicenter study. *European Journal of Pediatrics*, 178(5), 739-753.

Zimran, A., Elstein, D. (2014). Management of Gaucher disease: enzyme replacement therapy. *Pediatric Endocrinology Reviews*, 12 Suppl 1, 82-87.

Zhou, J., Lin, J., Leung, W. T., Wang, L. (2020). A basic understanding of mucopolysaccharidosis: Incidence, clinical features, diagnosis, and management. *Intractable & Rare Diseases Research*, 9(1), 1-9.

Žuvela, P., Skoczylas, M., Jay Liu, J., Ba Czek, T., Kaliszan, R., Wong, M. W., Buszewski, B., Héberger, K. (2019). Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Chemical Reviews*, 119(6), 3674-3729.

