

Université de Sherbrooke

**Analyse de type multiplex de sept nouveaux biomarqueurs urinaires de
la maladie de Fabry par spectrométrie de masse en tandem**

Par
Pamela Lavoie
Médecine nucléaire et radiobiologie

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

Sherbrooke, Québec, Canada
Novembre, 2012

Membres du jury d'évaluation

Dre Christiane Auray-Blais, Département de pédiatrie, Faculté de médecine et des sciences
de la santé, Université de Sherbrooke

Dr Joe T.R. Clarke, Département de pédiatrie, Faculté de médecine, Université de Toronto

Dr Michael Huels, Département de médecine nucléaire et radiobiologie, Faculté de médecine
et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke

© Pamela Lavoie, 2012



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-94383-0

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-94383-0

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

Analyse de type multiplex de sept nouveaux biomarqueurs urinaires de la maladie de Fabry par spectrométrie de masse en tandem

Pamela Lavoie
Médecine nucléaire et radiobiologie

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

Les maladies lysosomales (aussi appelées maladies de surcharge) sont causées par l'activité déficitaire d'une ou de plusieurs hydrolases lysosomales perturbant ainsi le catabolisme de macromolécules. Ce déficit enzymatique engendre leur accumulation dans les tissus, les organes et les liquides biologiques de la personne atteinte. Plus de 70 maladies lysosomales ont été décrites jusqu'à maintenant et, bien que rares individuellement, elles ont une prévalence combinée d'environ 1:7000. Il est primordial que des biomarqueurs (ou indicateurs de changement) reflétant la progression et la sévérité de la maladie, la réponse à une intervention thérapeutique donnée et le mécanisme de la pathogénèse soient disponibles pour les patients. La maladie de Fabry est une maladie liée à l'X et causée par l'activité déficitaire de l'enzyme α -galactosidase A. Jusqu'à maintenant, deux sphingolipides ont été étudiés comme biomarqueurs dans l'urine et le plasma des patients Fabry : le globotriaosylcéramide (Gb₃) et le globotriaosylsphingosine (lyso-Gb₃). Notre équipe a récemment découvert sept nouveaux biomarqueurs de la maladie de Fabry par des études en métabolomique utilisant la spectrométrie de masse en temps de vol. Ces nouveaux biomarqueurs présentaient des rapports masse sur charge (m/z) de 758, 774, 784, 800, 802, 820 et 836. Des études de fragmentation ont démontré qu'ils étaient tous des molécules analogues au lyso-Gb₃, présentant des modifications au niveau de la partie sphingosine de la molécule. Les objectifs de ce projet de recherche étaient : 1) d'élaborer et de valider une méthode de spectrométrie de masse en tandem pour la quantification relative de ces sept analogues du lyso-Gb₃; 2) d'évaluer leurs niveaux d'excrétion dans des échantillons d'urine de 164 patients Fabry et de 94 individus contrôles sains de référence; 3) d'établir des corrélations entre l'excrétion urinaire des différents analogues et le sexe du patient et la thérapie enzymatique de remplacement offerte comme traitement aux patients. Une méthodologie d'analyse des biomarqueurs par spectrométrie de masse en tandem a été développée et validée. Les contrôles de référence sains analysés selon cette méthodologie ne présentaient pas de trace de biomarqueurs, à l'exception de l'analogue m/z 836, ce qui est un atout au niveau du diagnostic. Des corrélations significatives ont été établies entre les niveaux d'excrétion du lyso-Gb₃ dans l'urine et le sexe du patient. Les hommes atteints de la maladie de Fabry, qui sont habituellement affectés plus sévèrement que les femmes, avaient des niveaux d'excrétion urinaires supérieurs, suggérant que les biomarqueurs découverts pourraient être reliés à la sévérité de la maladie. L'excrétion urinaire des analogues diminue significativement après l'administration de la thérapie enzymatique de remplacement chez les hommes atteints de la maladie de Fabry, ce qui démontre leur efficacité au niveau du suivi du traitement chez ces derniers. Les analogues du lyso-Gb₃ semblent donc être des biomarqueurs prometteurs pour la maladie de Fabry.

Mots clés : Maladie de Fabry, Biomarqueurs, Spectrométrie de masse, Gb₃, Lyso-Gb₃

À Mathieu.

À Diane, Gervais, Lucienne et Simon

À Judith, Bruno, Blaisou et Christiane

Merci

Table des matières

Liste des tableaux	VI
Liste des figures	VII
Liste des abréviations	IX
Chapitre I - Introduction	1
1.1 Maladies lysosomales.....	1
1.1.1 Aspects généraux.....	1
1.1.2 Formation du lysosome.....	1
1.1.3 Pathophysiologie cellulaire.....	3
1.1.4 Classification.....	4
1.1.5 Présentation clinique.....	5
1.1.6 Stratégies de traitement.....	6
1.2 Maladie de Fabry.....	8
1.2.1 Caractéristiques et incidence.....	8
1.2.2 Symptomatologie.....	10
1.2.3 Femmes hétérozygotes.....	11
1.2.4 Traitement.....	12
1.3 Biomarqueurs.....	13
1.3.1 Importance des biomarqueurs.....	13
1.3.2 Caractéristiques des biomarqueurs idéaux.....	14
1.3.3 Biomarqueurs pour la maladie de Fabry.....	15
1.4 Spectrométrie de masse.....	19
1.4.1 Principes de base.....	19
1.4.2 Caractéristiques du spectromètre de masse utilisé.....	21
1.4.2.1 Nébulisation électrostatique (ESI).....	22
1.4.2.2 Analyseur et ses différents modes d'utilisation possibles.....	24
1.4.3 Optimisation des paramètres.....	29
1.4.4 Effet de matrice.....	33
1.5 Validation de méthodes.....	37

Chapitre II - Article.....	38
Multiplex Analysis of Novel Lyso-Gb ₃ -Related Biomarkers for Fabry Disease by Tandem Mass Spectrometry	
Chapitre III - Discussion.....	78
Chapitre IV - Conclusion.....	83
Remerciements.....	85
Liste des publications.....	86

Liste des tableaux

Tableau 1	Classification des différents types de maladies lysosomales.....	5
------------------	---	----------

Liste des figures

Figure 1	Étapes clés de la formation du lysosome.....	2
Figure 2	La maladie de Fabry : défaut enzymatique responsable.....	9
Figure 3	Nombre de publications disponibles sur PubMed lors d'une recherche avec le mot clé " <i>biomarker</i> " de 1959 à 2011.....	14
Figure 4	Structures des analogues urinaires du lyso-Gb ₃ déterminées par des études de fragmentation en spectrométrie de masse en temps-de-vol...	18
Figure 5	Spectre de masse de fragmentation de la molécule de lyso-Gb ₃ (<i>m/z</i> 786).....	21
Figure 6	Spectromètre de masse en tandem utilisé: Quattro micro (à gauche) couplé à un chromatographe liquide Alliance 2795XE (à droite).....	21
Figure 7	Schéma du spectromètre de masse en tandem utilisé (Quattro Micro)...	22
Figure 8	Principes de la nébulisation électrostatique en mode positif.....	24
Figure 9	Le quadripôle.....	25
Figure 10	La cellule de collision.....	26
Figure 11	Mode MRM utilisé lors de l'analyse de l'analogue du lyso-Gb ₃ de <i>m/z</i> 784 dans l'urine de : A) Un patient atteint de la maladie de Fabry; B) Un contrôle de référence sain.....	27
Figure 12	Mode " <i>Daughter ion spectrum</i> ". Analyse des ions filles produits par fragmentation de l'analogue de <i>m/z</i> 784 dans l'urine d'un patient atteint de la maladie de Fabry: A) Chromatogramme obtenu; B) Spectre de masse extrait au temps de rétention 2.81 min.....	28
Figure 13	Mode " <i>MS SCAN</i> ": A) Chromatogramme total lors d'un scan de <i>m/z</i> 770 à 780; B) Extraction du chromatogramme pour <i>m/z</i> 784.....	29
Figure 14	Effets de différents paramètres sur l'intensité du signal obtenu pour le lyso-Gb ₃ et ses analogues dans un échantillon d'urine d'un patient atteint de la maladie de Fabry.....	30

Figure 15	Méthode d'infusion post-colonne pour la détermination des zones d'effets de matrice (Adapté de Van Eeckhaut <i>et al.</i> , 2009).....	34
Figure 16	Détermination des zones d'effet de matrice pour le lyso-Gb ₃ selon la méthode développée d'infusion post-colonne.....	35
Figure 17	Méthode de fortification d'échantillons pour l'évaluation des effets de matrice (Adapté de Van Eeckhaut <i>et al.</i> , 2009).....	35
Figure 18	Méthode de fortification d'échantillons. Variation du signal pour le lyso-Gb ₃ (+50) (ayant un <i>m/z</i> 836) à la même concentration dans deux urines.....	36

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AIT	Accident ischémique transitoire
ATP	Adénosine triphosphate
AVC	Accident vasculaire cérébral
CI	"Chemical ionization" (ionisation chimique)
CTH	"Ceramide trihexoside" (trihexosylcéramide)
EC	"Enzyme Commission numbers" (commission des enzymes)
EI	"Electron ionization" (ionisation électronique)
ESI+	"Positive Electrospray Ionization" (ionisation par électronébulisation positive)
Ga₂	Galabiosylcéramide
GB3 ou GL-3	Globotriaosylcéramide
GC	"Gas chromatography" (chromatographie en phase gazeuse)
HPLC	"High performance liquid chromatography" (chromatographie en phase liquide à haute performance)
LOD	"Limit of detection" (limite de détection)
LOQ	"Limit of quantification" (limite de quantification)
Lyso-Gb₃	Globotriaosylsphingosine
M6P	Mannose-6-phosphate
MALDI	"Matrix-assisted laser desorption/ionization" (désorption-ionisation laser assistée par matrice)
MRM	"Multiple Reaction Monitoring" (monitoring de réactions multiples)
MS	"Mass Spectrometry" (spectrométrie de masse)
MSSI	"Mainz Severity Score Index"
m/z	Rapport masse sur la charge d'un ion
OMIM	"Online Mendelian Inheritance in Man"
RE	Réticulum endoplasmique
SPE	"Solid Phase Extraction" (extraction en phase solide)
TER	Thérapie d'enzyme de remplacement
TOF	"Time-of-flight" (temps de vol)
TR	Temps de rétention

Chapitre I – Introduction

1.1 Maladies lysosomales

1.1.1 Aspects généraux

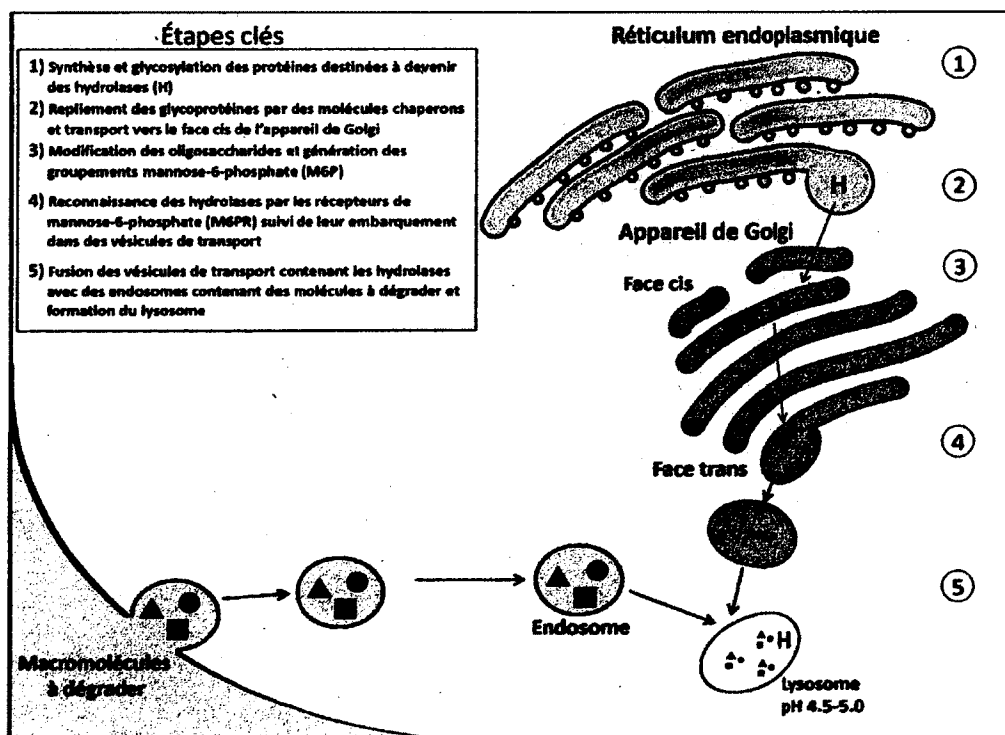
Les maladies lysosomales englobent au-delà de 70 désordres métaboliques héréditaires distincts (Cox et Cachon-Gonzalez, 2012) découlant d'un défaut d'ordre génétique qui affecte le fonctionnement normal du lysosome. La transmission se produit selon un mode autosomique récessif pour la plupart des maladies lysosomales tandis que trois d'entre elles sont liées au chromosome X : la maladie de Hunter (OMIM No. 309900), la maladie de Fabry (OMIM No. 301500) et la maladie de Danon (OMIM No. 300257) (Pastores, 2010). Les maladies lysosomales sont rares individuellement mais leur prévalence combinée pourrait être aussi élevée que 1 :7700 (Meikle *et al.*, 1999).

1.1.2 Formation du lysosome

Les lysosomes sont des organites cellulaires contenant plus de 60 hydrolases (Lubke *et al.*, 2009), chacune ayant une fonction différente dépendamment du lien moléculaire sur lequel elles agissent. Leur action combinée permet le catabolisme de macromolécules naturelles (protéines, ADN, lipides, glucides, etc.) en leurs composants les plus simples (acides aminés, nucléotides, sucres, etc.). Cette dégradation en plus petites molécules permet leur sortie du lysosome par diffusion simple ou encore à l'aide de transporteurs de métabolites présents sur la membrane lysosomale, les rendant ainsi disponibles pour la cellule (Winchester *et al.*, 2000). La formation du lysosome comprend plusieurs étapes clés. Premièrement, des ribosomes liés aux membranes du réticulum endoplasmique rugueux effectuent la synthèse de protéines destinées à devenir des hydrolases. Simultanément, un transfert d'oligosaccharides (glycosylation) contenant un taux élevé de mannose se produit sur certains acides aminés des protéines en cours de synthèse, plus précisément sur l'azote libre de certaines asparagines (Coutinho *et al.*, 2012). La présence d'oligosaccharides favorise le repliement adéquat des hydrolases, au sein du réticulum endoplasmique, en

interagissant avec des molécules chaperons ce qui permet leur transport vers l'appareil de Golgi (Cox et Cachon-Gonzalez, 2012). À leur entrée par la face cis de l'appareil de Golgi, les enzymes destinées au lysosome sont reconnues par une phosphotransférase (GlcNAc-1-phosphotransférase) qui génère le transfert d'un groupement GlcNAc-1-phosphate en position C6 de certains des sucres mannose situés sur les oligosaccharides (Coutinho *et al.*, 2012). En un deuxième temps, une N-acétylglucosamine-1-phosphodiester α -N-acétylglucosaminidase permet l'élimination du GlcNAc terminal du groupement GlcNAc-1-phosphate, ce qui expose un groupement mannose-6-phosphate. Ce groupement mannose-6-phosphate agit alors comme un signal de reconnaissance et se lie à des récepteurs de mannose-6-phosphate situés sur la face trans de l'appareil de Golgi. Les hydrolases reconnues par ces récepteurs sont par la suite spécifiquement transportées par des vésicules de transport. Ces vésicules fusionneront avec des endosomes, qui deviendront des lysosomes lorsqu'ils auront acquis la gamme complète d'hydrolases (Cooper, 2000). L'activité des hydrolases s'amorce alors en raison du pH acide (entre 4.5 et 5), assuré par une pompe à protons qui utilise l'ATP pour pomper des protons du cytosol vers l'intérieur du lysosome (Mindell, 2012). (Voir Figure 1)

Figure 1 – Étapes clés de la formation du lysosome



1.1.3 Pathophysiologie cellulaire

Toutes les étapes, allant de la synthèse de chaque hydrolase à leur transport du réticulum endoplasmique jusqu'au lysosome en passant par l'appareil de Golgi, sont critiques. Toute mutation altérant ce processus peut engendrer une maladie lysosomale (Futerman et van Meer, 2004). Certaines d'entre elles présentent la formation d'une hydrolase défectueuse ayant une activité enzymatique réduite au sein du lysosome ou encore un problème au niveau du transport de l'hydrolase du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi en raison d'un repliement inadéquat. Dans certains cas, une complication au niveau d'une des étapes de la création du groupement mannose-6-phosphate peut empêcher le transport de l'appareil de Golgi vers le lysosome. Un défaut d'une protéine lysosomale transmembranaire ou la dysfonction d'une protéine d'activation requise pour l'activité optimale d'une hydrolase sont également des causes possibles d'une maladie lysosomale. Les défauts lysosomaux ont comme conséquence l'accumulation progressive de molécules partiellement dégradées au sein des lysosomes, ce qui augmente ultimement la taille et le nombre de ceux-ci (Chang *et al.*, 2000). Une dysfonction cellulaire et tissulaire généralisée s'installe alors progressivement et génère un désordre d'ordre multisystémique (Filocamo et Morrone, 2011). Les mutations non sens, les insertions ou les délétions et les duplications génèrent souvent des protéines tronquées menant à une activité enzymatique nulle tandis que des mutations faux sens ou de site d'épissage peuvent mener à un niveau enzymatique résiduel pouvant correspondre à une forme atténuée de la maladie (Gieselmann, 2006). Les prédictions de type génotype/phénotype sont difficiles à établir car une même mutation chez deux individus peut générer deux phénotypes complètement différents (Wilcox, 2004). Le mécanisme primaire causant la pathologie est de toute évidence le stockage de substrat dans les lysosomes. Toutefois, une incapacité à expliquer le phénotype de manière adéquate en tenant uniquement compte du mécanisme primaire a démontré la complexité de ces maladies et a amené les chercheurs à tenter d'élucider des mécanismes secondaires de la pathogénèse (Futerman et Van Meer, 2004). Quoique encore difficiles à élucider et pouvant varier dépendamment du désordre lysosomal, ces mécanismes secondaires pourraient inclure notamment des défauts au niveau de la signalisation calcique, du métabolisme du fer et des mécanismes d'autophagie.

L'accumulation de métabolites toxiques et la présence de processus d'inflammation pourraient aussi faire partie de la pathogénèse de ces maladies (Cox et Cachon-Gonzalez, 2012).

1.1.4 Classification

Une classification récente (Winchester, 2012) propose un regroupement des différents types de maladies lysosomales : 1) Selon la nature des produits de stockage générés pour les désordres résultant d'un déficit enzymatique unique: sphingolipidoses, mucopolysaccharidoses, glycoprotéinoses et autres; et 2) Selon la nature du défaut au niveau du système lysosomal en ce qui concerne les désordres qui ne sont pas de nature enzymatique: les troubles post-traductionnels des enzymes lysosomales, les défauts de la membrane lysosomale et du transport, les défauts du lysosome et de la biogénèse de ses organelles, les céréoïdes lipofuscinoses neuronales. Une telle classification permet donc de repérer facilement les désordres qui partagent des caractéristiques similaires au niveau clinique et pathologique (voir le Tableau 1).

Tableau 1 – Classification des différents types de maladies lysosomales

<input type="checkbox"/> GM1- Gangliosidose <ul style="list-style-type: none"> ▪ I ▪ II ▪ III <input type="checkbox"/> GM2-Gangliosidose <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tay-Sachs ▪ Sandhoff ▪ GM2 déficit de l'activateur <input type="checkbox"/> Fabry <input type="checkbox"/> Gaucher <ul style="list-style-type: none"> ▪ I ▪ II ▪ III ▪ Atypique <input type="checkbox"/> Leucodystrophie <ul style="list-style-type: none"> ▪ Métachromatique ▪ Krabbe ▪ Krabbe atypique <input type="checkbox"/> Niemann-Pick <ul style="list-style-type: none"> ▪ A ▪ B <input type="checkbox"/> Farber <input type="checkbox"/> Déficit de la prosaposine	<input type="checkbox"/> Mucopolysaccharidoses (MPS) <ul style="list-style-type: none"> ▪ IH (Hurler) ▪ IH/S (Hurler/Scheie) ▪ IS (Scheie) ▪ II (Hunter) ▪ IIIA (Sanfilippo A) ▪ IIIB (Sanfilippo B) ▪ IIIC (Sanfilippo C) ▪ IIID (Sanfilippo D) ▪ IVA (Morquio A) ▪ IVB (Morquio B) ▪ VI (Maroteaux-Lamy) ▪ VII (Sly) ▪ MPS IX 	<input type="checkbox"/> Aspartylglucosaminurie <ul style="list-style-type: none"> ▪ Fucosidose ▪ α-Mannosidose ▪ β-Mannosidose ▪ Sialidose <ul style="list-style-type: none"> ▪ I ▪ II ▪ Schindler/Kanzaki ▪ Galactosialdose 	<input type="checkbox"/> Glycogénoses <ul style="list-style-type: none"> ▪ Pompe ▪ Lipidoses ▪ Wolman ▪ Défauts de protéase <ul style="list-style-type: none"> ▪ Papillon-Lefèvre ▪ Pycnodysostose
Déficit des enzymes lysosomales	Déficit des enzymes lysosomales de transport	Carbène lipofuscinose neuronale	Déficit des enzymes lysosomales de dégradation des sphingolipides
<input type="checkbox"/> Mucosulfatidose <input type="checkbox"/> Mucopolidoses <ul style="list-style-type: none"> ▪ ML II ▪ ML IIIA ▪ ML III 	<input type="checkbox"/> Cystinose <input type="checkbox"/> Maladie de stockage de l'acide sialique libre <ul style="list-style-type: none"> ▪ Forme infantile ▪ Forme adulte <input type="checkbox"/> Cobalamine F <input type="checkbox"/> Danon <input type="checkbox"/> Déficience LIMP-2 <input type="checkbox"/> Osteopétrose <input type="checkbox"/> Mucopolidose IV <input type="checkbox"/> Niemann-Pick <ul style="list-style-type: none"> ▪ C1 ▪ C2 	<input type="checkbox"/> CLN1 <input type="checkbox"/> CLN2 <input type="checkbox"/> CLN3 <input type="checkbox"/> NCL adulte récessive <input type="checkbox"/> CLN4 <input type="checkbox"/> CLN5 <input type="checkbox"/> CLN6 <input type="checkbox"/> CLN7 <input type="checkbox"/> CLN8 <input type="checkbox"/> CLN9 <input type="checkbox"/> CLN10	<input type="checkbox"/> Syndrome de Chediak-Higashi <input type="checkbox"/> Syndrome de Griscelli <ul style="list-style-type: none"> ▪ I ▪ II ▪ III <input type="checkbox"/> Syndrome de Hermansky-Pudlak <ul style="list-style-type: none"> ▪ I-IX

1.1.5 Présentation Clinique

Pour la plupart des maladies lysosomales, le phénotype est très hétérogène. La sévérité de la maladie pourrait être en lien avec le type de substrat qui s'accumule, le type de cellules touchées et le niveau d'activité enzymatique du patient (Gieselmann, 2006). Les maladies lysosomales sont progressives et peuvent se présenter sous trois formes : infantile, juvénile et adulte. La forme infantile correspond à une sévérité aiguë avec une atteinte neurologique, la forme adulte est une forme plus atténuée avec des symptômes surtout périphériques et la forme juvénile est de sévérité intermédiaire (Futerman et Van Meer, 2004). Pour les formes infantiles (Wraith et Beck, 2012), les premiers signes apparaissent sous forme d'un retard ou d'une régression au niveau développemental avec perte des habiletés acquises. Les atteintes neurologiques possibles comprennent des convulsions, une perte d'acuité visuelle,

une spasticité, des habiletés de langage restreintes, de la dysphagie, des difficultés au niveau du mouvement des globes oculaires et une cataplexie ou perte soudaine de tonus musculaire. Certains patients présentent une dysmorphie faciale (nez large et aplati, protubérance frontale, hypertrophie de la langue et traits grossiers), des problèmes d'audition et une obstruction des voies respiratoires supérieures. Diverses atteintes d'ordre périphérique peuvent aussi être observées telles que des viscéromégalies (cardiomégalie, hépatomégalie, splénomégalie), des anomalies squelettiques et des fractures pathologiques. Les formes adultes comprennent des symptômes plutôt non spécifiques qui compliquent et retardent l'établissement du diagnostic, étant déjà un défi en soi pour le clinicien en raison de la rareté et de la nature progressive des maladies lysosomales. Les symptômes fréquents de la forme adulte (Clarke, 2009) comprennent des troubles moteurs (dystonie, ataxie, faiblesse musculaire) et des atteintes au niveau neurologique (démence, psychoses, épilepsie, Parkinson, accident vasculaire cérébral, troubles de la vision), des atteintes au niveau cardiaque (cardiomyopathies, arythmies) et rénal (protéinurie, insuffisance et problème de filtration glomérulaire). L'espérance de vie et la qualité de vie sont généralement grandement diminuées chez les patients atteints de maladies lysosomales.

1.1.6 Stratégies de traitement

Plusieurs stratégies de traitement ont été mises en place ou sont en cours de développement pour les patients atteints de maladies lysosomales. Une thérapie enzymatique de remplacement (TER) est disponible pour certaines de ces maladies (Gaucher, Fabry, Mucopolysaccharidoses I, II, VI et Pompe (Desnick et Schuchman, 2012)). Grâce à la présence de récepteurs mannose-6-phosphate sur la membrane plasmique de plusieurs types de cellules, l'entrée cellulaire de molécules exogènes comportant un groupement mannose-6-phosphate et leur redirection vers le lysosome est possible (Clarke, 2009). Une préparation contenant l'enzyme déficiente créée en laboratoire peut donc être administrée par voie intraveineuse aux patients. La thérapie enzymatique de remplacement est bénéfique mais comporte tout de même des limitations, notamment au niveau des atteintes neurologiques puisqu'elle ne peut traverser la barrière hémato-encéphalique en raison du haut poids moléculaire des enzymes (Germain *et al.*, 2010). L'accessibilité des cellules

visées, la composition moléculaire, l'architecture et le taux de régénération du tissu visé et la formation possible d'anticorps peuvent également affecter le succès de la TER (Van Gelder *et al.*, 2012). Il faut aussi noter le coût élevé qui se situe de 145 000 à 377 000\$US annuellement par patient (Beutler, 2006). Les patients présentant un niveau enzymatique résiduel pourraient éventuellement bénéficier d'une thérapie par chaperons (Parenti, 2009). Dans le réticulum endoplasmique, les enzymes mutées peuvent être reconnues par le système de contrôle de qualité du RE et être détruites ou alors elles réussissent à sortir de celui-ci mais n'atteignent pas le lysosome. Les chaperons, soit de petites molécules données comme traitement pharmacologique aux patients, se lient aux enzymes mutées et permettent leur repliement adéquat et leur stabilisation. Le complexe ainsi formé peut sortir du réticulum endoplasmique et être transporté vers le lysosome où le chaperon délaisse le site actif de l'enzyme au profit du substrat naturel (van Gelder *et al.*, 2012). Une augmentation d'activité enzymatique modeste peut faire une différence notable pour les patients (Gritti, 2011) et ce traitement pourrait même être utilisé parallèlement avec la TER. Le faible poids moléculaire des chaperons pourrait permettre d'outrepasser la barrière hémato-encéphalique et l'administration par voie orale serait possible. Cette forme de traitement représenterait un avantage majeur pour les patients. Leur applicabilité est cependant restreinte à certains types de mutations où le patient présente une activité enzymatique résiduelle. Concernant les autres traitements possibles, une stratégie consiste à diminuer la biogénèse du produit de stockage pour rétablir partiellement l'équilibre entre la biogénèse et la dégradation déficiente du substrat (thérapie de réduction de substrat) (Van Gelder *et al.*, 2012). Le développement futur de traitements par thérapie génique pourrait également être une option intéressante (Gritti, 2011). Ce traitement consiste à transférer l'information génétique nécessaire à la synthèse d'hydrolases saines aux cellules du patient. L'activité enzymatique pourrait donc être rétablie à long terme et remplacer l'administration d'une TER aux deux semaines (Ruiz de Garibay *et al.*, 2012).

1.2 Maladie de Fabry

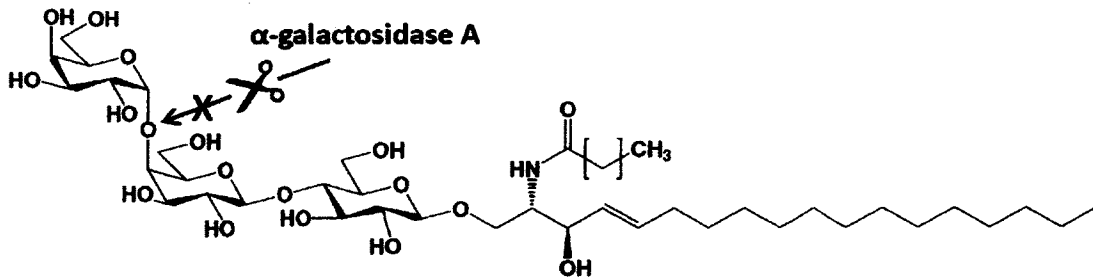
1.2.1 Caractéristiques et incidence

La maladie de Fabry (OMIM 301500) est une maladie métabolique héréditaire avec un mode de transmission lié à l’X. La symptomatologie est causée par l’absence ou la réduction des niveaux d’activité de l’enzyme α -galactosidase A (E.C. 3.2.1.22), une hydrolase permettant le clivage d’un galactose terminal en position alpha (α) anomérique (Garman et Garboczi, 2004). En conséquence, le mécanisme normal de dégradation de certains sphingolipides, des constituants des membranes plasmiques, est affecté. Ces molécules s’accumulent donc dans les organes et les tissus de la personne atteinte notamment dans les cellules endothéliales, péricellulaires et musculaires lisses des vaisseaux sanguins, dans les cellules épithéliales du glomérule et des tubules des reins, dans les myocytes cardiaques, les cellules ganglionnaires du système nerveux autonome, dans la cornée et les cellules histiocytaires et réticulaires du tissu conjonctif (Mehta et Ramaswami, 2012). Les sphingolipides sont aussi retrouvés dans l’urine et le plasma des patients Fabry, permettant l’élaboration de tests diagnostiques basés sur leur détection par des méthodes analytiques. La Figure 2 montre la structure du globotriaosylcéramide (Gb_3 , aussi appelé GL-3 ou CTH (cérébrotrihexoside ou trihexosylcéramide)) et du globotriaosylsphingosine (lyso- Gb_3), deux molécules dont le métabolisme est perturbé chez les patients atteints. La maladie de Fabry est panethnique et l’incidence est variable selon les populations. Il faut souligner la difficulté posée par l’obtention de données épidémiologiques précises dans le cas des maladies lysosomales en raison de leur rareté et des différentes méthodes diagnostiques utilisées à travers les centres d’évaluation (Hopwood, 2012). Néanmoins, plusieurs incidences de la maladie de Fabry ont été rapportées et ce, pour différents pays. En Australie, une rétrospective du nombre de cas diagnostiqués de 1980 à 1996 a démontré une incidence de 1 :117 000 naissances (Meikle *et al.*, 1999). En Italie, une étude de dépistage néonatal sur 37 104 garçons par la mesure de l’activité enzymatique de l’ α -galactosidase A sur sang séché a montré une incidence surprenante de 1 :3100 naissances (Spada *et al.*, 2006). Par ailleurs, il est à noter que sur les douze cas trouvés dans cette étude italienne, un seul présentait la forme classique de la maladie de Fabry et les onze

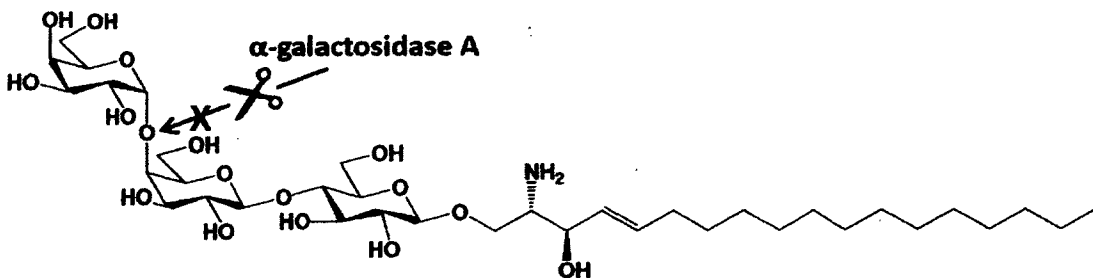
autres cas dépistés présentaient la forme tardive de la maladie. En Nouvelle-Écosse, un effet fondateur est responsable d'une incidence aussi élevée que 1 :15 000 (West *et al.*, 2002). Certaines études de dépistage à haut-risque dans des populations spécifiques (troubles cardiaques, troubles rénaux) ont rapporté une incidence de la maladie de Fabry de 0.55% chez les patients sous hémodialyse (Gaspar *et al.*, 2010), 4% chez les hommes avec cardiomyopathie hypertrophique tardive (Sachdev *et al.*, 2002), 4.9% chez les hommes et 2.4% chez les femmes de 18 à 55 ans ayant souffert d'un accident cérébrovasculaire d'origine inconnue (Rolfs *et al.*, 2005). L'espérance de vie est diminuée chez les patients atteints de la maladie de Fabry: elle passe de 74.7 à 58.2 ans pour les hommes et de 80.0 à 75.4 ans pour les femmes. Néanmoins, l'espérance de vie des patients Fabry est variable et certains patients peuvent décéder dans la quarantaine (Clarke, 2007; MacDermot *et al.*, 2001). Un délai dans le diagnostic pourrait être associé avec une mort précoce (Waldek *et al.*, 2009).

Figure 2 : La maladie de Fabry : défaut enzymatique responsable

Globotriaosylcéramide (Gb₃)



Globotriaosylsphingosine (Lyso-Gb₃)



1.2.2 Symptomatologie

Les symptômes associés à la maladie de Fabry sont multisystémiques, très hétérogènes, progressifs et peuvent apparaître dès l'enfance. Les enfants peuvent alors être en proie à des épisodes de douleur intense (acroparesthésie) se présentant par des picotements et une sensation de brûlure dans les extrémités (Clarke, 2007). Ces crises peuvent être déclenchées notamment par des changements de température et peuvent persister jusqu'à plusieurs heures. La capacité de sudation peut aussi être affectée (hypohidrose ou anhidrose) entraînant une intolérance au chaud et au froid, des fièvres fréquentes et de l'inconfort lors de la pratique d'activité physique. Certaines anomalies ophtalmologiques sont typiques, telles la cornée verticillée et la tortuosité des vaisseaux rétiniens et conjonctivaux (Sodi *et al.*, 2007), mais ceux-ci ne perturbent toutefois pas l'acuité visuelle du patient. L'observation d'angiokératomes, soit des manifestations dermatologiques de petite taille se présentant comme des éruptions cutanées protubérantes de couleur rougeâtre (situées plus fréquemment dans la zone s'étendant du nombril aux genoux), sont typiques de la maladie de Fabry (Mutoh *et al.*, 2012). À l'adolescence, une protéinurie (présence de protéines dans les urines) peut survenir (Warnock *et al.*, 2012). Des problèmes gastro-intestinaux (douleurs à l'estomac, diarrhée, constipation) peuvent faire leur apparition (Buda *et al.*, 2011) à l'instar de problèmes de fatigue et de dépression. À l'âge adulte, l'atteinte des différents organes de la personne souffrant de la maladie de Fabry est bien réelle et la nature multisystémique de la maladie se fait davantage ressentir. Au niveau neurologique, les patients peuvent souffrir de vertiges, d'acouphène ou de migraines et être en proie à des accidents ischémiques transitoires (AIT) et à des accidents vasculaires cérébraux (AVC) (Mehta et Ramaswami, 2012). Les troubles au niveau cardiovasculaire les plus fréquents comprennent l'épaississement de la paroi du muscle cardiaque, une hypertrophie ventriculaire gauche, de l'arythmie et de l'hypertension (Clarke, 2007). L'implantation d'un stimulateur cardiaque ("pacemaker") peut s'avérer nécessaire chez des patients afin de corriger certaines de ces manifestations cliniques. Certaines mutations se distinguent de la forme classique de la maladie de Fabry et engendrent une variante cardiaque atypique caractérisée par un niveau enzymatique résiduel relativement plus élevé et des symptômes limités au niveau du cœur (Linhart, 2006). L'atteinte rénale est observée par la présence de

protéinurie et une vitesse de filtration glomérulaire ou de clairance plus faible de la créatinine. Une insuffisance rénale peut s'installer progressivement et, dans les cas sévères, nécessiter un traitement par dialyse ou une transplantation rénale (Sunder-Plassmann, 2006).

1.2.3 Femmes hétérozygotes

Malgré la transmission liée à l'X de la maladie de Fabry, les femmes porteuses peuvent aussi être atteintes. Cette particularité pourrait être expliquée en partie par la lyonisation correspondant à l'inactivation aléatoire d'un des deux chromosomes X chez la femme qui se produit à l'état embryonnaire, peu après l'implantation dans l'utérus. Toutefois, certaines études remettent en cause l'implication de la lyonisation dans la symptomatologie des femmes hétérozygotes. En effet, aucune corrélation n'a été relevée entre les ratios d'inactivation du chromosome X et l'activité enzymatique, le Mainz Severity Score Index (MSSI) et les symptômes cliniques (Elstein *et al.*, 2012). L'atteinte peut varier grandement au sein des patientes hétérozygotes. Elle est parfois aussi sévère que chez les hommes mais les femmes tendent à développer des symptômes à un âge plus avancé. Une étude sur les manifestations cliniques chez une cohorte de 60 femmes adultes atteintes de la maladie de Fabry (MacDermot *et al.*, 2001) montre qu'une grande proportion d'entre elles ont été victimes : 1) d'accidents ischémiques transitoires ou d'accidents vasculaires cérébraux (22%); 2) de douleurs neuropathiques (70%); 3) d'hypohidrose (33%); et 4) de douleurs thoraciques (53%). L'investigation a été poussée plus loin pour vingt femmes de cette cohorte qui ont été examinées au niveau cardiaque et rénal. Plusieurs d'entre elles présentaient une hypertrophie ventriculaire gauche (19%), une fonction rénale anormale (35%), des anomalies au niveau des valves cardiaques (48%) et de l'arythmie (33%). Une étude récente (Bouwman *et al.*, 2012) porte sur la prévalence de symptômes non spécifiques chez un groupe de femmes atteintes de la maladie de Fabry en comparaison avec un groupe de femmes contrôles saines. Les symptômes suivants étaient présents plus souvent ($p < 0.001$) chez les femmes atteintes de la maladie de Fabry: acroparesthésie, fatigue, palpitations, étourdissements, protéinurie pendant la grossesse, perte de libido et

douleurs articulaires. L'atteinte des patientes hétérozygotes est donc bien réelle malgré qu'elle fut longtemps passée sous silence.

1.2.4 Traitement

Deux traitements par thérapie enzymatique de remplacement sont présentement disponibles pour les patients atteints de la maladie de Fabry qui correspondent à certains critères d'inclusion: l'agalsidase α administré à une dose de 0.2 mg/kg (Replagal[®], Shire Human Genetic Therapies) et l'agalsidase β , administré à une dose de 1.0 mg/kg (Fabrazyme[®], Genzyme Corporation, une Division Sanofi). Pour les deux traitements, la solution doit être administrée par voie intraveineuse à toutes les 2 semaines. Les enzymes sont produits par la technique de l'ADN recombinant, l'agalsidase α par l'activation du gène codant pour l' α -galactosidase A dans une lignée cellulaire humaine (Pastores, 2007) et l'agalsidase β à l'aide d'une culture de cellules de mammifères extraites de cellules ovariennes de hamster chinois (Barbey, 2004). Une étude a comparé les deux formulations au niveau de leurs propriétés (Lee *et al.*, 2003) et a déduit qu'elles sont comparables au niveau de leur composition et de leur activité spécifique. Par contre, le Fabrazyme contient une plus grande proportion de groupements mannose-6-phosphate, ce qui s'est traduit par une fixation accrue aux récepteurs de mannose-6-phosphate et conséquemment une meilleure absorption par les fibroblastes des sujets Fabry lors de l'étude. La différence majeure d'un facteur 5 entre les deux produits de TER administrés (0.2 mg/kg *versus* 1.0 mg/kg) aux patients n'a pas pu être justifiée par cette étude et il convient de se demander si leur efficacité est comparable. Une étude récente (Pisani *et al.*, 2012) rapporte une rétrospective de la littérature concernant les effets de la thérapie enzymatique de remplacement et compare les deux préparations au niveau de l'amélioration d'atteintes typiques de la maladie de Fabry. La stabilisation ou la diminution de la vitesse de détérioration de la fonction rénale a été rapportée dans la littérature pour les patients traités avec l'un ou l'autre des deux traitements. Au niveau cardiaque, une stabilisation ou une diminution de l'hypertrophie ventriculaire gauche est également rapportée par les auteurs de l'étude. Le traitement par thérapie enzymatique de remplacement améliorerait également la qualité de

vie, la sévérité de la douleur neuropathique et les symptômes gastro-intestinaux (douleurs, diarrhées, vomissements).

Les patients présentant un niveau enzymatique résiduel pourraient bientôt bénéficier d'une thérapie par chaperons. De fait, l'administration à des souris transgéniques par voie orale d'une molécule inhibitrice de l'enzyme α -galactosidase A, le 1-deoxygalactonojirimycin, a eu des résultats prometteurs, incluant une augmentation de l'activité enzymatique et une réduction des niveaux de Gb₃ dans plusieurs organes (Ishii, 2012).

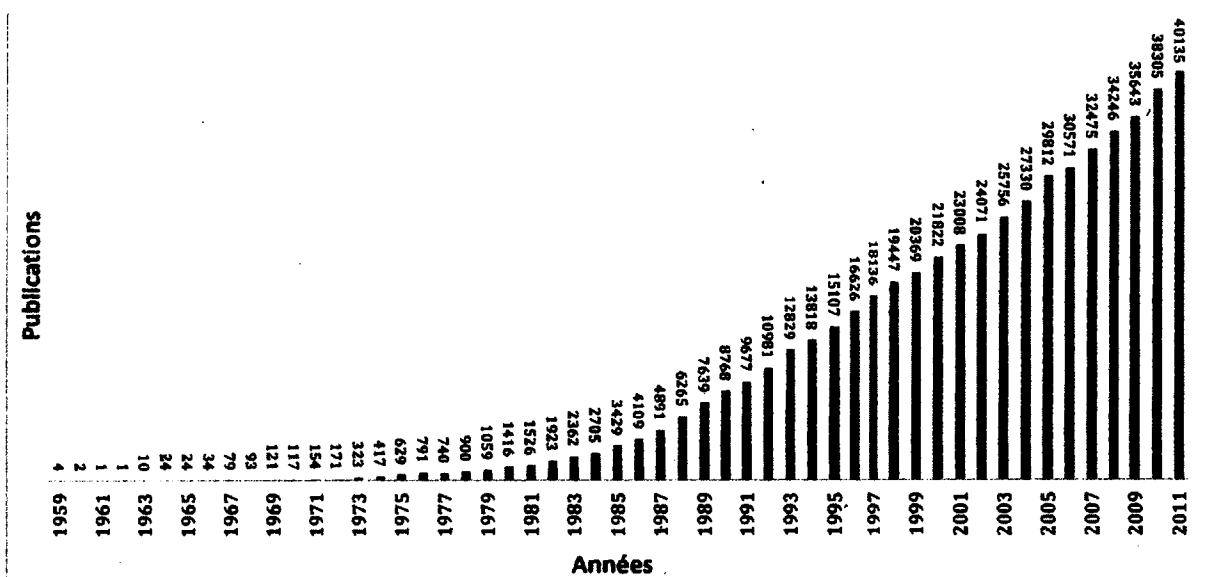
1.3 Biomarqueurs

1.3.1 Importance des biomarqueurs

Les biomarqueurs sont des indicateurs de changements qui reflètent la présence de processus biologiques et qui sont directement reliés aux manifestations cliniques et au devenir d'une maladie. Ils sont observables ou mesurables à plusieurs niveaux (moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental) (Cox, 2006). Les applications reliées aux biomarqueurs sont multiples. Ils permettent notamment le dépistage (populationnel ou à haut-risque), le diagnostic et la vérification de l'efficacité d'un traitement (Aerts *et al.*, 2005). Les biomarqueurs peuvent aussi assurer le suivi à long terme des patients traités et également refléter la gravité de l'atteinte d'un patient et son pronostic. Plusieurs autres sphères d'activités peuvent bénéficier de l'utilisation de biomarqueurs: le processus d'approbation d'un traitement lors d'essais cliniques, l'évaluation objective des effets d'une intervention thérapeutique et l'élucidation des mécanismes de pathogénèse de maladies. Dans le cas précis des maladies lysosomales, l'importance des biomarqueurs est majeure étant donné le faible nombre de cas répertoriés, l'hétérogénéité des symptômes, les mécanismes de pathogénèse secondaires non élucidés et le coût élevé des traitements (Cox, 2006). De plus en plus, des anomalies biochimiques détectables dans le sang ou l'urine sont utilisées comme biomarqueurs (Aerts *et al.*, 2011). Ces anomalies peuvent être des molécules substrats des hydrolases défectueuses ou encore des biomarqueurs secondaires en lien avec les dommages découlant du stockage (signes d'inflammation, perturbation de processus cellulaires, etc.) qui peuvent aussi s'avérer très informatifs.

La recherche sur les biomarqueurs prend de l'ampleur en raison de leur grande utilité clinique. La Figure 3 représente le nombre de publications répertoriées sur le moteur de recherche "PubMed" en inscrivant le mot clé "*biomarker*" de 1959 à 2011. Le nombre de publications disponibles n'a cessé d'augmenter depuis les années 60. Depuis l'an 2000, le nombre de publications sur le sujet a presque doublé et est passé de 21822 à 40135 en 2011.

Figure 3 : Nombre de publications disponibles sur PubMed lors d'une recherche avec le mot clé "*biomarker*" de 1959 à 2011



1.3.2 Caractéristiques des biomarqueurs idéaux

Pour être efficaces cliniquement, les biomarqueurs doivent détenir certaines caractéristiques souhaitables (Cox, 2006). Premièrement, ils devraient être mesurés rapidement, avec une méthode fiable, peu coûteuse et de façon non invasive (par un test urinaire, par exemple). Un biomarqueur idéal devrait également être spécifique pour la maladie étudiée (expression augmentée ou diminuée seulement chez des personnes atteintes) ou encore, s'il n'est pas spécifique, qu'il n'y ait pas d'ambiguïtés entre les niveaux observés chez des patients comparativement à des individus contrôles sains de référence. Cette caractéristique démontre le lien entre le biomarqueur et la maladie et facilite le processus de diagnostic. Un diagnostic rapide est primordial pour les patients

atteints de maladies lysosomales. Une prise en charge réalisée tôt est associée avec une meilleure espérance de vie en plus d'une meilleure qualité de vie. Une autre caractéristique primordiale est l'existence d'une corrélation entre les paramètres cliniques observés (symptômes, troubles, lésions, etc.) et les niveaux de concentration du biomarqueur. Une telle corrélation permet notamment d'avoir une idée de la sévérité de la maladie, d'aider au pronostic, mais aussi de faire la lumière sur des mécanismes possibles reliés à la pathogénèse. Finalement, les niveaux du biomarqueur idéal devraient changer rapidement en réponse à un traitement et permettre de suivre son efficacité. Par exemple, après un premier traitement par thérapie enzymatique de remplacement, on devrait pouvoir observer la diminution de la concentration urinaire ou plasmatique du substrat de l'enzyme défectueux. De plus, lors d'un suivi à long terme, l'augmentation progressive de la concentration du substrat pourrait être en lien avec la formation d'anticorps contre la thérapie enzymatique de remplacement (Vedder *et al.*, 2008). Un tel biomarqueur pourrait également permettre d'ajuster les doses optimales à administrer au patient ou encore permettre de comparer deux traitements spécifiques selon leur efficacité à diminuer la concentration du substrat.

1.3.3 Biomarqueurs de la maladie de Fabry

Certains produits de stockage ont été observés chez les patients atteints de la maladie de Fabry. En 1963, des chercheurs ont examiné les lipides de tissus rénaux d'un homme décédé à l'âge de 28 ans d'une insuffisance rénale et ayant les symptômes classiques de la maladie de Fabry (Sweeley et Klionsky, 1963). L'extraction des lipides a été réalisée avec un mélange de chloroforme/méthanol, puis l'extrait a été examiné par chromatographie sur couche mince. Ils ont fait la découverte de deux glycolipides en concentration anormale dans les tissus rénaux : le premier, trouvé en plus grande quantité est maintenant connu sous le nom de globotriaosylcéramide (Gb_3) et le deuxième, présent en quantité inférieure, sous le nom de galabiosylcéramide (Ga_2). Ces deux glycolipides comportent une famille d'isoformes découlant d'une hétérogénéité de la composition de la chaîne d'acide gras de la céramide (Winchester et Young, 2006). Des antigènes du groupe sanguin B peuvent aussi s'accumuler chez certains patients, dépendamment de leur groupe sanguin (Asfaw *et al.*, 2002).

Le Gb₃ a été évalué comme biomarqueur dans les tissus, l'urine et le plasma des patients atteints de la maladie de Fabry. Ce biomarqueur a notamment été un facteur déterminant lors de l'attestation de l'efficacité de la thérapie enzymatique de remplacement. En effet, en 1973, une préparation de l'enzyme α -galactosidase A provenant de tissu placentaire humain a été administrée à deux patients atteints de la maladie de Fabry (Brady *et al.*, 1973). Les niveaux plasmatiques de globotriaosylcéramide ont diminué chez les deux patients, 40 minutes seulement après l'infusion. Plus tard, une étude a démontré qu'une unique dose d' α -galactosidase A avait réduit significativement les niveaux de Gb₃ dans le foie et les cellules épithéliales tubulaires du rein chez 9 des 10 patients atteints de la maladie de Fabry faisant partie de l'étude (Schiffmann *et al.*, 2000). En 2002, un groupe de chercheurs a évalué l'effet de l'administration de la TER (1 mg/kg aux deux semaines) chez un groupe de 58 patients atteints de la maladie de Fabry. Des biopsies du rein ont été réalisées avant et après traitement et l'élimination du Gb₃ accumulé a été observée dans plusieurs types de cellules après 11 mois de traitement (Thurberg *et al.*, 2002).

En 2005, différents groupes de chercheurs ont proposé une méthode de dépistage de la maladie de Fabry non invasive par mesure du Gb₃ urinaire par spectrométrie de masse en tandem (Kitagawa *et al.*, 2005). Le niveau de Gb₃ urinaire était significativement plus élevé chez les hémizygotes et certains hétérozygotes présentant la forme classique de la maladie comparativement aux contrôles sains de référence. Une étude subséquente a démontré que l'excrétion urinaire de Gb₃ normalisée par la créatinine présentait une corrélation significative avec le sexe, le traitement par thérapie enzymatique de remplacement et le type de mutations, mais pas de corrélation avec l'âge des patients Fabry (Auray-Blais *et al.*, 2008). Une caractéristique négative de ce biomarqueur s'est traduite par la relation incomplète entre la concentration urinaire et plasmatique du Gb₃ et les manifestations cliniques de la maladie (Vedder *et al.*, 2007, Young *et al.*, 2005).

Le manque de concordance entre les symptômes des patients Fabry et leur excrétion de Gb₃ a amené les chercheurs à chercher d'autres biomarqueurs. En 2008, après avoir postulé que des métabolites du Gb₃ pourraient jouer un rôle dans la pathogénèse de la maladie de Fabry

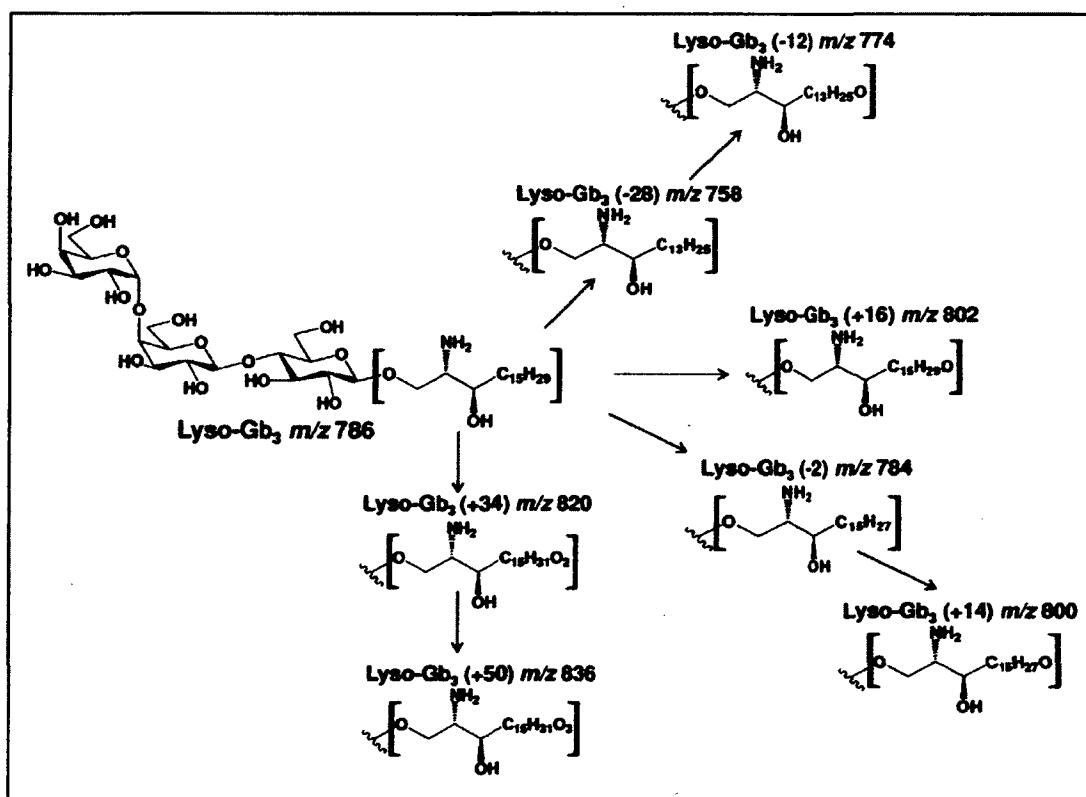
des chercheurs néerlandais ont fait la découverte du globotriaosylsphingosine (lyso-Gb₃) dans le plasma de patients atteints de la maladie de Fabry (Aerts *et al.*, 2008). La diminution de la concentration plasmatique du lyso-Gb₃ après un traitement par thérapie enzymatique de remplacement a alors pu être observée. D'autres études ont démontré la corrélation de l'excrétion plasmatique du lyso-Gb₃ avec certains signes cliniques de la maladie de Fabry, notamment les lésions cérébrovasculaires de la matière blanche chez les hommes et l'hypertrophie ventriculaire gauche chez les femmes (Rombach *et al.*, 2010). Une méthode d'analyse plus sensible utilisant la spectrométrie de masse en tandem a par la suite permis l'analyse du lyso-Gb₃ urinaire et des corrélations significatives ont été établies entre sa concentration et le type de mutation, le sexe et la thérapie enzymatique de remplacement (Auray-Blais *et al.*, 2010). Une étude récente a aussi démontré que le lyso-Gb₃ pourrait aussi être en lien avec les lésions glomérulaires observées chez les patients atteints de la maladie de Fabry puisqu'il favorise l'activation de molécules médiatrices (Sanchez-Nino *et al.*, 2011).

D'autres biomarqueurs provenant de mécanismes secondaires découlant du stockage cellulaire de glycosphingolipides ont été évalués mais la plupart sont non spécifiques pour la maladie de Fabry. Par exemple, la protéinurie est un biomarqueur important de la condition rénale chez les patients atteints de la maladie de Fabry. Plus celle-ci est élevée, plus le déclin de la fonction rénale est rapide (Schiffmann *et al.*, 2010). Une étude a aussi suggéré que la cystatine C, qui participe à la régulation du métabolisme des protéines extracellulaires (Malek, 2012), pourrait être un bon biomarqueur pour indiquer la présence de problèmes rénaux et cardiaques (Torralba-Cabeza *et al.*, 2011). La même équipe a conclu que les patients atteints de la maladie de Fabry présentaient également des taux anormalement élevés du peptide NT-proBNP (molécule synthétisée par le ventricule cardiaque soumis à une pression trop élevée ou à une distension de sa paroi) et que celui-ci semblait être en lien avec l'atteinte cardiaque.

La recherche de nouveaux biomarqueurs efficaces qui pourraient corrélérer avec la sévérité et la progression de la maladie se poursuit. Récemment, une étude utilisant une approche métabolomique par spectrométrie de masse en temps de vol a permis de découvrir des

molécules analogues du lyso-Gb₃ dans le plasma (Dupont *et al.*, 2012) et l'urine (Auray-Blais *et al.*, 2012) des patients atteints de la maladie de Fabry. Ces molécules se distinguent par des modifications au niveau de la partie sphingosine de la molécule de lyso-Gb₃. La Figure 4 montre la structure des sept nouveaux biomarqueurs urinaires trouvés lors de cette étude et qui font l'objet du présent mémoire. Une autre étude en métabolomique a également permis de trouver des analogues et des isoformes du Gb₃ (Auray-Blais *et al.*, 2012). Le lien possible entre ces molécules et la pathogénèse de la maladie est à l'étude (Auray-Blais *et al.*, résultats non publiés). Certains de ces biomarqueurs serviront pour évaluer l'efficacité de la thérapie génique administrée à des patients Fabry dans le cadre d'une étude pancanadienne (Medin *et al.*, résultats non publiés).

Figure 4 : Structures des analogues urinaires du lyso-Gb₃ déterminées par des études de fragmentation en spectrométrie de masse en temps de vol.



Un outil important de confirmation du diagnostic des hommes atteints de la maladie de Fabry et pouvant être considéré comme un biomarqueur est la diminution de l'activité de

l'enzyme α -galactosidase A mesurée dans les leucocytes, le plasma ou le sang séché sur papier filtre. Ce biomarqueur présente malheureusement plusieurs lacunes, notamment au niveau du diagnostic des femmes hétérozygotes. En effet, une étude portant sur la mesure de l'activité enzymatique dans le sang séché sur papier filtre (Linthorst *et al.*, 2005) a démontré qu'environ 33% des femmes hétérozygotes pour la maladie de Fabry présentaient une activité enzymatique normale. Ces femmes hétérozygotes n'auraient pas été différenciées des femmes contrôles de référence par ce seul critère. De plus, la mesure de l'activité enzymatique n'est pas utile pour évaluer l'efficacité d'un traitement par TER offert aux patients Fabry.

Il est à noter que la confirmation du diagnostic, autant chez les femmes que chez les hommes atteints de la maladie de Fabry, doit se faire par séquençage du gène GLA, codant pour l'enzyme α -galactosidase A (Wang *et al.*, 2011). Plus de 600 mutations ont été identifiées jusqu'ici (Mehta et Ramaswami, 2012), la plupart étant des mutations faux sens (Saito *et al.*, 2011).

1.4 Spectrométrie de masse

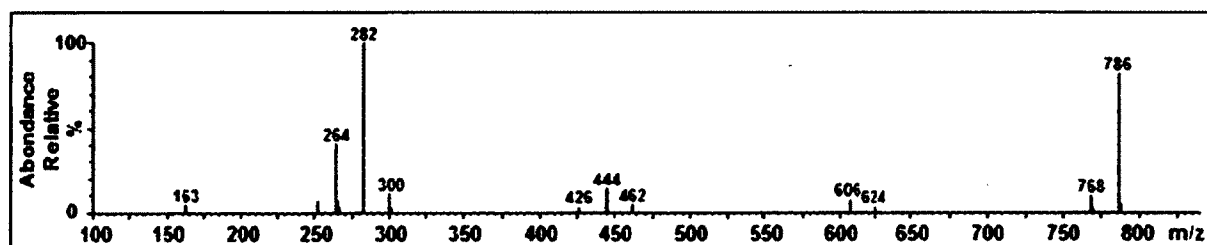
1.4.1 Principes de base

Depuis les débuts de la spectrométrie de masse, qui a pris naissance en 1912 avec les expériences de Joseph John Thomson réalisées à l'aide de rayons cathodiques (Downard, 2012), cette technique a bien évolué. La spectrométrie de masse est maintenant une méthode analytique ayant un domaine d'application très étendu et ce, en raison de ses nombreuses possibilités. Cette technique permet notamment l'obtention d'informations sur la masse, la composition élémentaire et sur la composition qualitative et quantitative d'un échantillon (de Hoffmann et Stroobant, 2007; Watson et Sparkman, 2007). De plus, des informations structurelles peuvent être obtenues en fragmentant une molécule d'intérêt et en faisant l'analyse de ses fragments nommés ions filles. Le principe de base de la spectrométrie de masse est de générer des ions (dans une source d'ionisation ou dans une cellule de collision), de les séparer selon leur rapport masse/charge (m/z), de les détecter, de les identifier, puis d'évaluer leur abondance (Gross, 2011).

La cascade d'étapes retrouvées en utilisant la spectrométrie de masse débute d'abord par l'introduction de l'échantillon à analyser dans le spectromètre de masse. Cette introduction peut se faire selon différentes techniques, dont les plus courantes sont l'infusion directe ou le couplage à des méthodes séparatives telles que la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC, "High performance liquid chromatography") et la chromatographie en phase gazeuse (GC, "Gas chromatography") (Siuzdak, 2006). Il y a certains avantages à utiliser la spectrométrie de masse en parallèle avec un système de chromatographie. Un tel système permet notamment une première purification et une concentration des molécules d'intérêt avant leur entrée dans le spectromètre de masse. De plus, le temps de rétention est un indice supplémentaire pour l'identification de molécules, lors d'une comparaison avec un standard (étalon connu) par exemple. Entre le spectromètre de masse et le système d'introduction de l'échantillon, un dispositif de couplage doit être en place pour obtenir des ions en phase gazeuse. Pour ce faire, différentes techniques ont été mises au point dont les principales sont l'impact électronique (EI), l'ionisation chimique (CI), la nébulisation électrostatique (ESI) et la désorption assistée par matrice (MALDI) (Skoog *et al.*, 2003). Il est possible d'obtenir des ions positifs ou négatifs, selon l'application désirée. Suite à la génération d'ions en phase gazeuse, ceux-ci peuvent être guidés à travers le spectromètre de masse grâce à leur charge et à l'application de champs électriques ou magnétiques précis (de Hoffmann et Stroobant, 2007). Dans le vide, deux particules chargées soumises aux mêmes champs électriques ou magnétiques et ayant des m/z identiques ont une même trajectoire. Selon ce principe, un dispositif nommé "analyseur" permet la détermination du rapport m/z d'un ion à partir des valeurs de champs appliquées, en plus de l'analyse séparée des ions ayant différents rapports m/z (Watson et Sparkman, 2007). Différents analyseurs, présentant des résolutions distinctes selon l'efficacité de la séparation, ont été mis au point dont le quadripôle, la trappe ionique, le secteur magnétique, le temps de vol (TOF) et l'orbitrap pour ne nommer que quelques exemples (Watson et Sparkman, 2007). Les ions qui parviennent jusqu'au détecteur sont transformés en signal électrique proportionnel à leur abondance, puis les données sont traitées par un système informatique (de Hoffmann et Stroobant, 2007). Un spectre de masse est obtenu avec, sur l'axe des X, les rapports m/z des ions détectés et sur l'axe des y

leur abondance relative (Gross, 2011). La Figure 5 montre un spectre de masse obtenu lors de la fragmentation du lyso-Gb₃ et de l'analyse des fragments obtenus. Le pic à m/z 786 représente la molécule complète, les pics à 606, 444 et 282 correspondent aux ions caractéristiques formés par la perte successive des trois sucres du lyso-Gb₃ (2 unités galactose et un glucose).

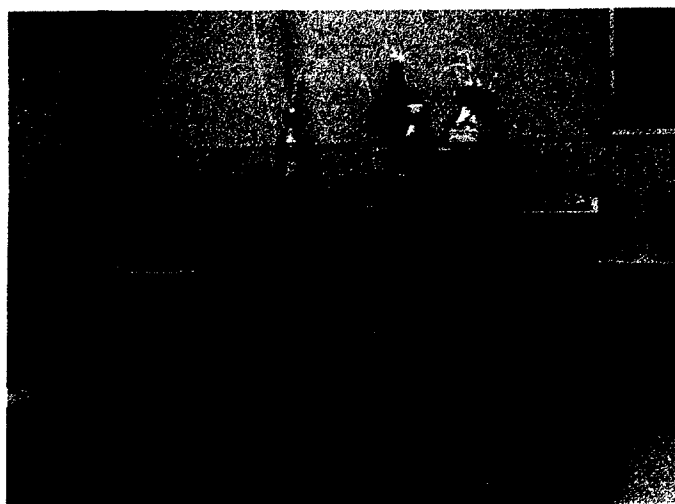
Figure 5 : Spectre de masse de fragmentation de la molécule de lyso-Gb₃ (m/z 786)



1.4.2 Caractéristiques du spectromètre de masse utilisé

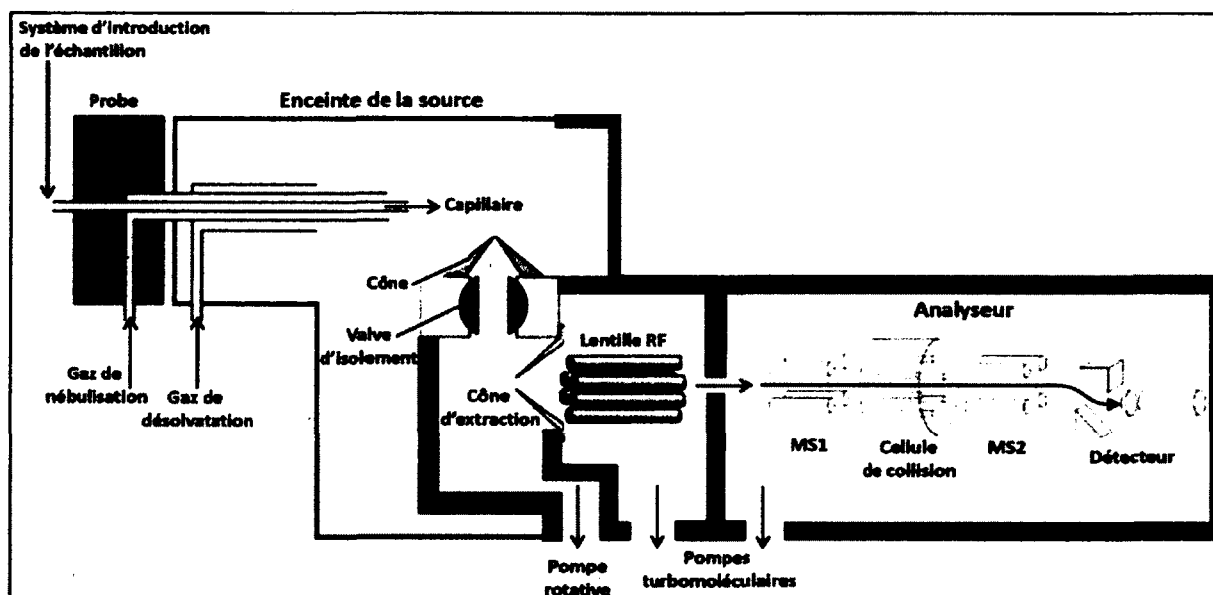
L'appareil utilisé lors de cette étude est un spectromètre de masse en tandem Quattro Micro (Waters Corporation) et l'échantillon y est introduit par un système de chromatographie en phase liquide à haute performance Alliance 2795XE (Waters) (Figure 6).

Figure 6 : Spectromètre de masse en tandem utilisé: Quattro micro (à gauche) couplé à un chromatographe liquide Alliance 2795XE (à droite).



Les ions sont formés par nébulisation électrostatique (ESI) (aussi appelée électronébulisation) et l'analyseur de masse est composé de deux quadripôles (MS1 et MS2) séparés par une cellule à collision (habituellement un hexapôle). C'est l'appareil est aussi appelé un "triple quadripôle". La Figure 7 présente une vue schématique du spectromètre de masse en tandem adaptée du Guide de l'opérateur.

Figure 7 : Schéma du spectromètre de masse en tandem utilisé (Quattro Micro)



1.4.2.1 Nébulisation électrostatique (ESI)

La nébulisation électrostatique est une technique d'ionisation qui se produit à pression atmosphérique, dans l'enceinte de la source. C'est une méthode d'ionisation dite douce donc qui habituellement ne crée pas de fragmentation (Skoog *et al.*, 2003). Elle fonctionne aussi bien pour l'analyse de molécules non volatiles, de haut poids moléculaire et ionisables (ex : protéines) que pour l'analyse de molécules polaires de poids moléculaire plus modeste ou encore de composés inorganiques solubles (Gross, 2011). Une différence de potentiel ($\sim 0.5-3.5$ kV) appliquée entre le capillaire et le cône (voir Figure 7) guide les ions vers ce dernier et engendre la vaporisation de la phase mobile en fines gouttelettes et l'ionisation des molécules présentes (électronébulisation) (Skoog *et al.*, 2003). En mode d'ionisation positif (ESI+), mode utilisé pour les expérimentations du présent ouvrage, le

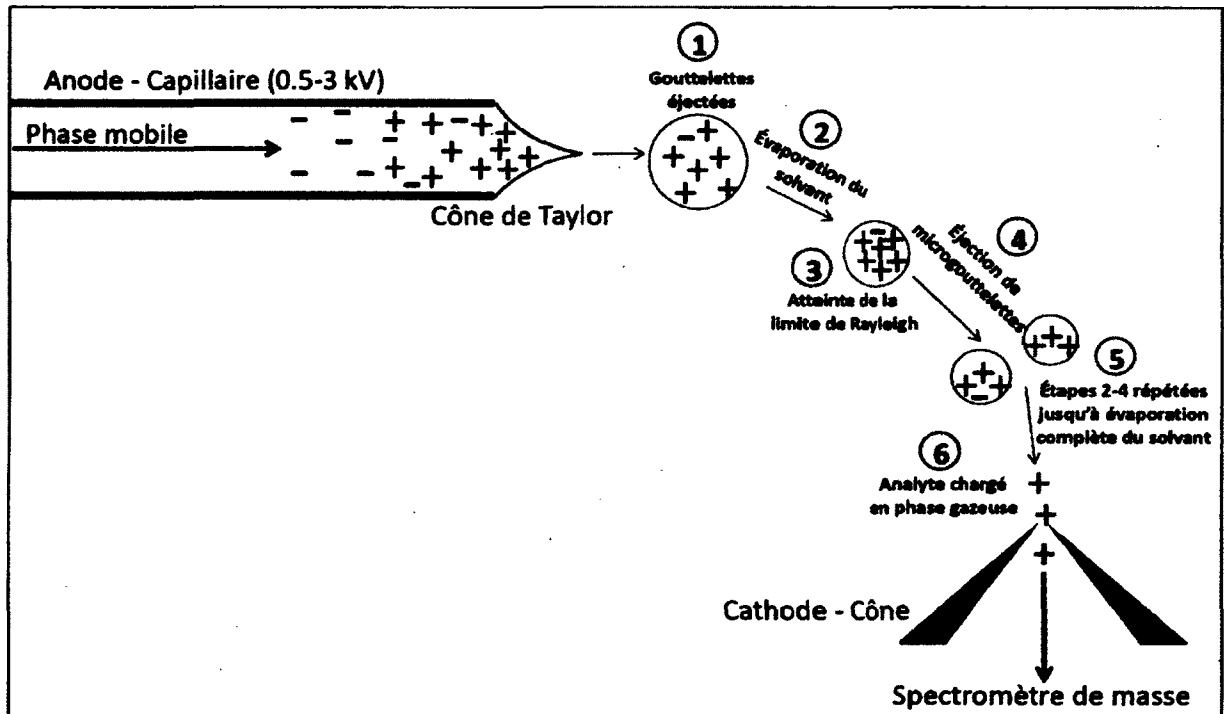
capillaire joue le rôle d'anode. Ce mode est utilisé lorsque les molécules d'intérêt forment des cations en solution (ex : composés basiques) par addition le plus souvent d'un proton H^+ (ou autres cations tels que Na^+ , K^+ , NH_4^+ , etc.) (Watson et Sparkman, 2007). Le rapport m/z des molécules chargées positivement est alors égal à $[M+nH]/z$, avec $n \geq 1$ où M =masse mono-isotopique de l'analyte (uma), H =masse mono-isotopique de l'hydrogène (uma) et z =charge et est égal au nombre de protons ajoutés, n) (Siuzdak, 2006). Lors de l'application d'une différence de potentiel, les anions présents dans la phase mobile s'accumulent au niveau du capillaire tandis que les cations sont repoussés et tendent à s'accumuler au niveau du ménisque du liquide sortant (Kearle, 2000). La tension de surface retient alors les cations jusqu'à un certain point de cassure où le champ électrique est trop fort (Siuzdak, 2006). À ce moment, il y a déformation du ménisque et formation de ce que l'on appelle le "cône Taylor" (Figure 8). Un jet de liquide contenant un excès d'ions positifs est éjecté du bout du cône. Ce jet instable se transforme par la suite en gouttelettes. La densité de charge des gouttelettes augmente au fur et à mesure que le solvant s'évapore (assisté par la présence d'un jet de gaz neutre chauffé) et que leur taille diminue (Watson et Sparkman, 2007). La limite de Rayleigh est le point où la force de répulsion électrostatique excède la tension de surface de la gouttelette (Siuzdak, 2006). À ce point, il y a libération de gouttelettes plus petites et le processus complet se répète jusqu'à l'évaporation totale du solvant. L'enclenchement de l'électronébulisation requiert un champ électrique E_0 décrit par la formule suivante (Kearle, 2000) où γ est la tension de surface du liquide, ϵ_0 est la permittivité du vide et r_c est le rayon du capillaire:

$$E_0 = \left(\frac{2\gamma \cos 49^\circ}{\epsilon_0 r_c} \right)^{1/2}$$

La durée de désolvatation prend seulement quelques millisecondes. Les molécules chargées positivement ($z \geq 1$) peuvent alors continuer leur déplacement au sein du spectromètre de masse. Plusieurs paramètres tels que le débit de la phase mobile et sa composition, le voltage appliqué sur le capillaire et sur le cône, le débit du gaz de désolvatation et sa température doivent être optimisés dans l'optique de favoriser la meilleure analyse possible de la molécule d'intérêt par le spectromètre de masse. Pour la même raison, des solvants présentant une faible tension de surface doivent être utilisés à un haut pourcentage pour

aider la formation du cône de Taylor (paramètre γ au numérateur selon la formule ci-haut). De plus, le pH des phases mobiles doit être en fonction de l'ionisation adéquate de l'analyte. L'utilisateur doit donc choisir les paramètres judicieusement lors du développement d'une méthode dans le but d'augmenter la sensibilité de l'analyse à un niveau optimal.

Figure 8 : Principes de la nébulisation électrostatique en mode positif

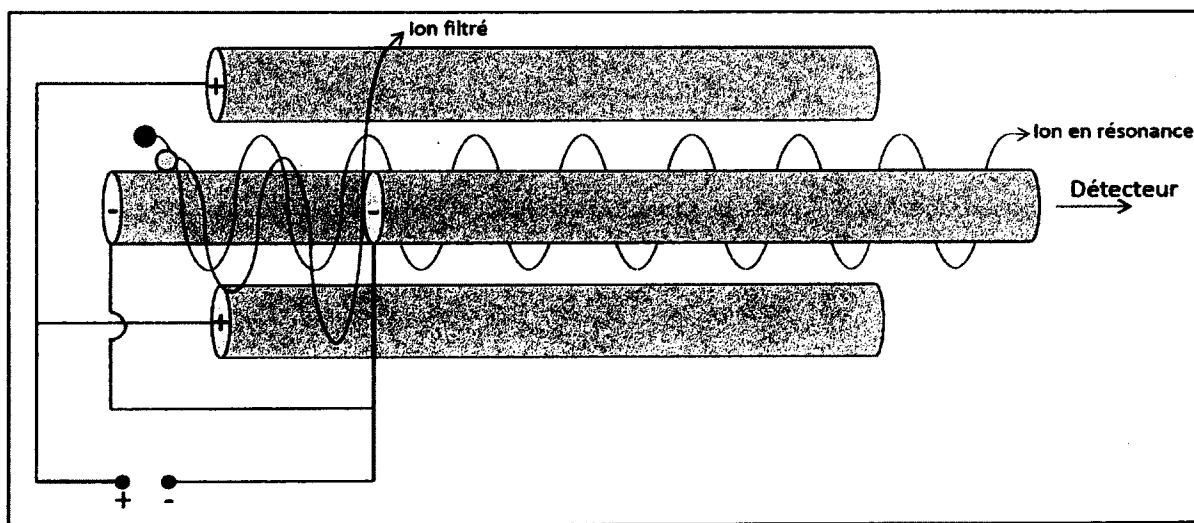


1.4.2.2 Analyseur et ses différents modes d'utilisation possibles

Suite à leur entrée par le cône, les ions sont guidés vers l'analyseur. L'analyseur est la partie du spectromètre de masse ayant pour rôle de séparer les ions formés dans la source selon leur rapport m/z . Tel que mentionné précédemment, l'analyseur de l'appareil utilisé est constitué de deux quadripôles séparés par une cellule de collision. Avant d'étudier les utilisations possibles de ce type d'analyseur, nous présenterons tout d'abord le fonctionnement du quadripôle et de la cellule de collision.

Un quadripôle est constitué de quatre tiges de métal dont la disposition est exposée à la Figure 9 (Watson et Sparkman, 2007). Les deux paires de tiges opposées ont une polarité inverse. Un potentiel continu (U) et un potentiel alternatif de radiofréquence ($V \cos \omega t$) sont appliqués entre les deux paires de tiges et la sommation résulte en un potentiel total égal à $U + V \cos \omega t$ (de Hoffmann et Stroobant, 2007). Selon l'amplitude et la fréquence du champ électrique, les ions sont successivement attirés et repoussés par les paires de tiges et seuls les ions ayant un rapport m/z précis et présélectionné peuvent avoir une trajectoire assez stable pour leur permettre d'osciller et ainsi de cheminer au travers du quadripôle pour se rendre jusqu'au détecteur (ions en résonance) (Siuzdak, 2006). Les autres ions (trop lourds ou trop légers qui n'ont pas été sélectionnés) auront des trajectoires instables et seront déviés vers le quadripôle; ils seront neutralisés, ce qui les empêchera d'atteindre le détecteur (ions filtrés). La gamme d'ions pouvant entrer en résonance dépend de U et V et celle-ci est choisie par l'utilisateur via un logiciel, ce qui montre bien la grande spécificité de la spectrométrie de masse.

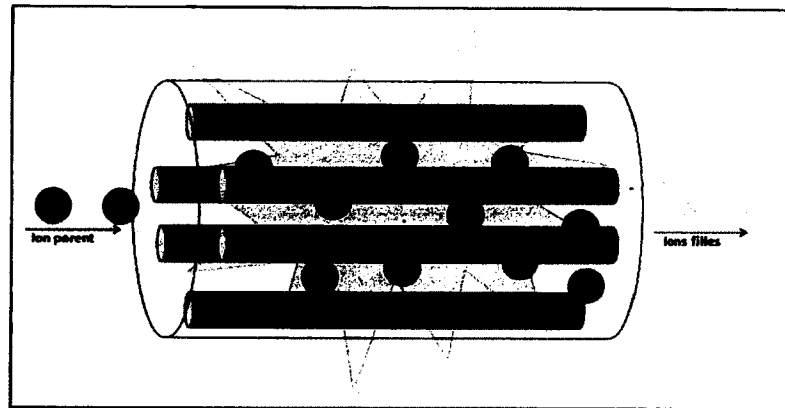
Figure 9 : Le quadripôle



La cellule de collision, constituée d'un hexapole, présente un dispositif de radiofréquences qui permet la focalisation des ions (Watson et Sparkman, 2007). À l'intérieur, un gaz de collision inerte (typiquement de l'argon) y est présent à une certaine pression. Les ions

parents entrant dans la cellule de collision sont fragmentés en ions filles au contact avec des atomes de gaz (voir Figure 10).

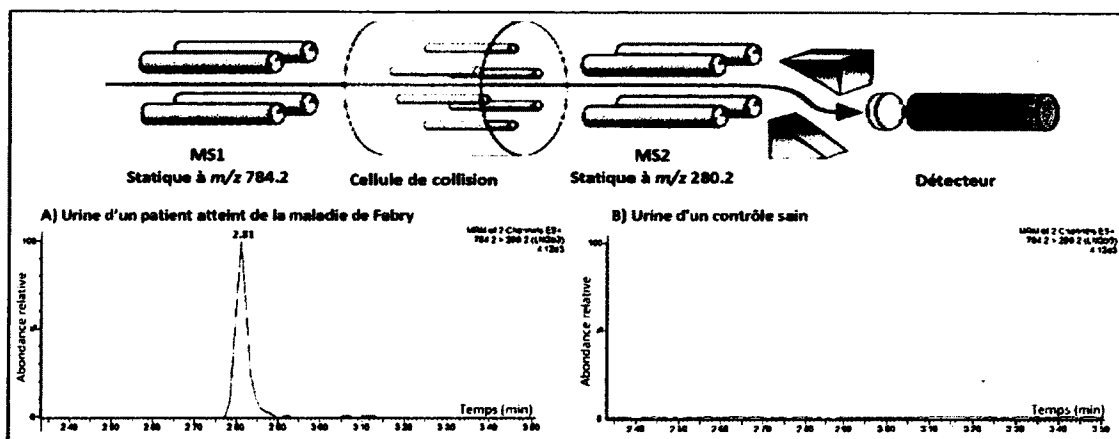
Figure 10 : La cellule de collision



Le triple quadripôle peut opérer selon plusieurs modes et ceux qui ont été le plus utilisés sont décrits ci-dessous:

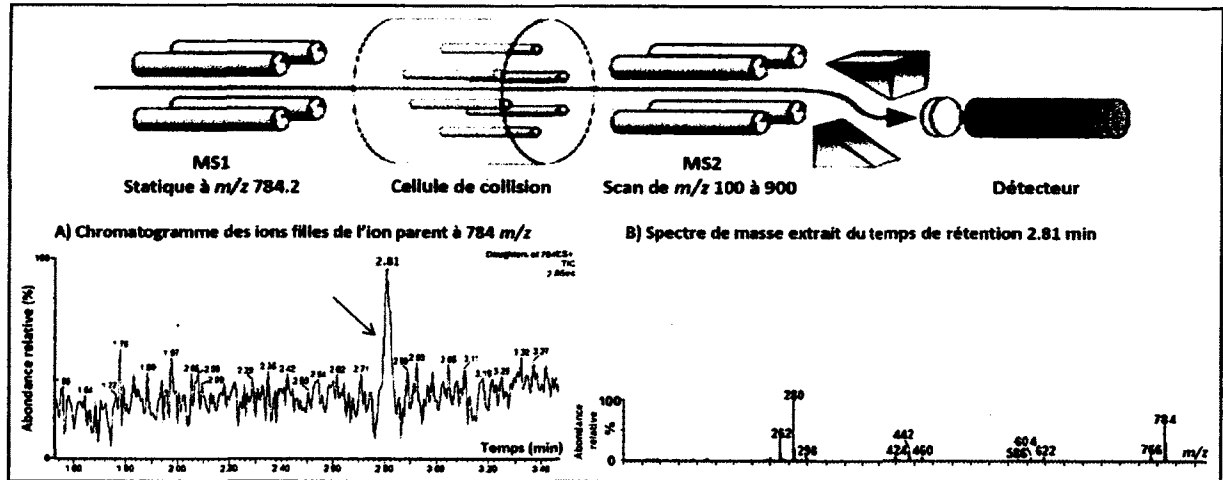
Monitoring de réactions multiples ("Multiple Reaction Monitoring" (MRM)): Lors de ce mode d'opération, le premier quadripôle (MS1) et le deuxième quadripôle (MS2) sont en mode statique, c'est-à-dire que seulement les ions avec un rapport m/z unique peuvent entrer en résonance. Le deuxième quadripôle sélectionne un fragment spécifique seulement d'un ion parent sélectionné par le premier quadripôle. L'ion parent et son ion fille sont notés de la manière suivante : ion parent (m/z)>ion fille (m/z) et cette notation spécifique est appelée une transition. Ce mode est fréquemment utilisé lors d'études quantitatives puisqu'il permet une grande sélectivité et donc une augmentation du rapport signal/bruit. L'analyse d'un ion fille spécifique permet de différencier deux ions parents ayant le même rapport m/z , donc d'éliminer des interférences potentielles. La Figure 11 montre les chromatogrammes obtenus lors d'une analyse urinaire en mode MRM d'un analogue du lyso-Gb₃ (m/z 784) chez un patient Fabry et chez un contrôle sain. La transition enregistrée est 784.2>280.2 et l'ion fille sélectionné par le deuxième quadripôle correspond à la partie sphingosine de la molécule. On peut observer la sélectivité de ce biomarqueur par la présence chez le patient Fabry (temps de rétention à 2.81 min) et l'absence chez un contrôle sain. Il n'y a pas de spectre de masse puisqu'une seule transition est observée.

Figure 11 : Mode MRM utilisé lors de l'analyse de l'analogue du lyso-Gb₃ de m/z 784 dans l'urine de : A) Un patient atteint de la maladie de Fabry; B) Un contrôle de référence sain.



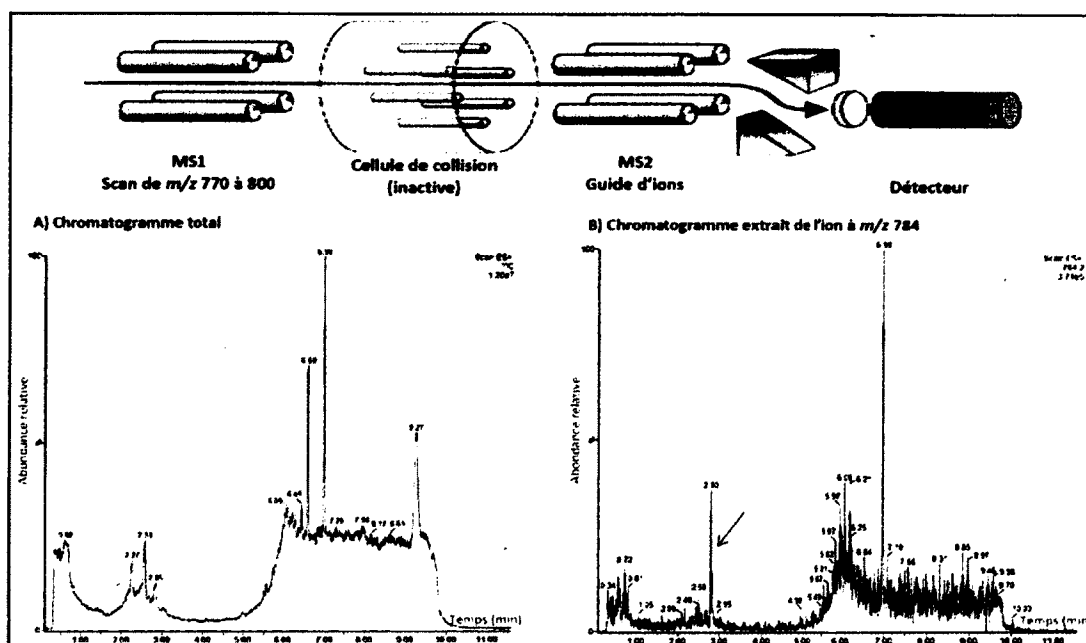
Spectre des ions filles ("Daughter ion spectrum"): Ce mode d'utilisation implique que le premier quadripôle (MS1) soit en mode statique et donc laisse passer l'ion parent d'intérêt seulement. La cellule de collision est active et fragmente cet ion parent. Le deuxième quadripôle (MS2) est en mode scan donc laisse passer les fragments obtenus selon une plage de m/z plus ou moins grande et préalablement déterminée par l'utilisateur. Ce mode permet d'analyser les ions filles produits par une molécule d'intérêt et s'avère très utile lors d'études structurales, en plus d'être utile pour choisir l'ion fille le plus intense à intégrer dans la transition d'une méthode quantitative de type MRM. La Figure 12 montre le chromatogramme obtenu lors d'une analyse en mode "Daughter ion spectrum" dans l'urine d'un patient atteint de la maladie de Fabry. Le chromatogramme montre d'abord un pic au même temps de rétention (2.81 min) que lors de l'analyse en MRM et un spectre de masse extrait à ce temps de rétention montre les ions filles de l'analogue de m/z 784. Il est possible de déceler la molécule non fragmentée (784 m/z), la perte successive des sucres galactose de 162 uma (622,460 m/z) et la partie sphingosine de la molécule (280 m/z). Nous constatons également que l'ion fille choisi dans la transition en MRM (280 m/z) est bel et bien celui qui est le plus intense.

Figure 12 : Mode "Daughter ion spectrum". Analyse des ions filles produits par fragmentation de l'analogue de m/z 784 dans l'urine d'un patient atteint de la maladie de Fabry: A) Chromatogramme obtenu; B) Spectre de masse extrait au temps de rétention 2.81 min.



MS SCAN : En mode MS SCAN, la cellule de collision est inactive et agit seulement comme un guide d'ions. Le premier quadripôle (MS1) est en mode scan et laisse passer une plage d'ions de différents m/z sélectionnée par l'utilisateur. Le deuxième quadripôle (MS2) agit comme un guide d'ions. La Figure 13 montre en A) le chromatogramme total obtenu lors d'un scan de m/z 770 à 800 de l'urine d'un patient atteint de la maladie de Fabry. Il est aussi possible d'extraire le chromatogramme d'un rapport m/z précis. En B), nous observons le chromatogramme extrait pour m/z 784 et nous remarquons le pic au temps de rétention 2.81 min, correspondant à un analogue du lyso-Gb₃. La différence de sélectivité entre ce chromatogramme et l'analyse MRM est flagrante.

Figure 13 : Mode "MS SCAN": A) Chromatogramme total lors d'un scan de m/z 770 à 780; B) Extraction du chromatogramme pour m/z 784.

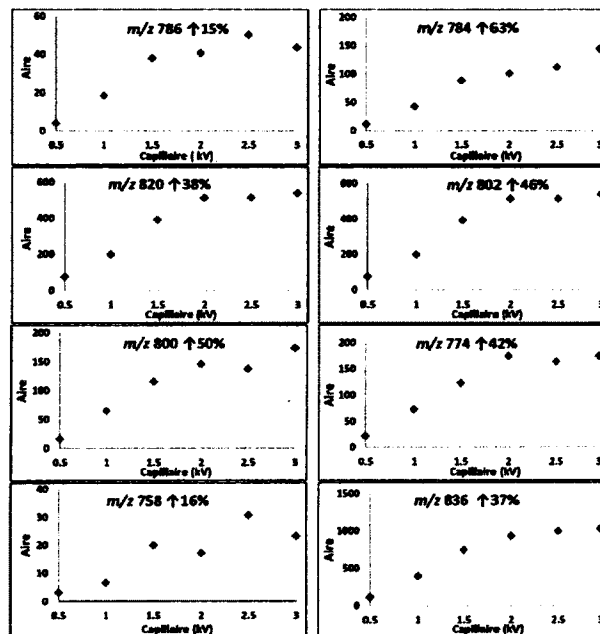


1.4.3 Optimisation des paramètres

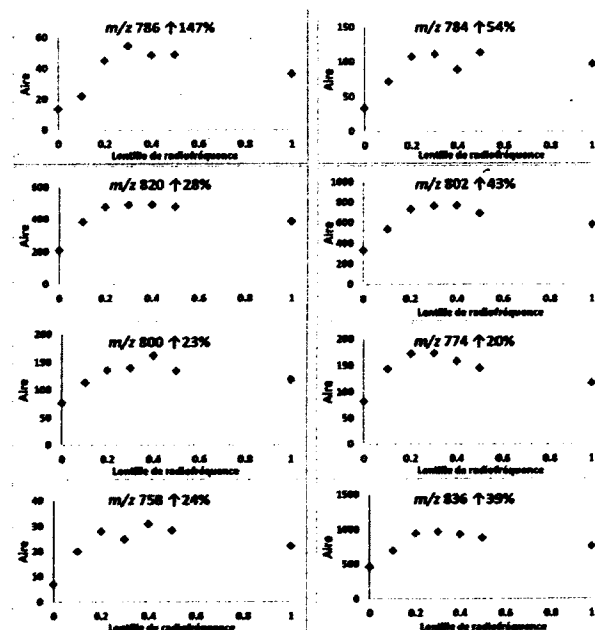
Lors du développement d'une méthode d'analyse par spectrométrie de masse, plusieurs paramètres doivent être optimisés et ce, dans l'optique d'avoir la meilleure sensibilité d'analyse possible. Au niveau de l'enceinte de la source, les voltages du capillaire et du cône doivent être optimisés en plus du débit et de la température du gaz de désolvatation et du débit de gaz du cône. Le voltage idéal à appliquer sur le cône peut être déterminé pour chaque molécule analysée. Au niveau de la cellule de collision, une énergie de collision spécifique peut être choisie pour chaque molécule d'intérêt et ce, de façon à augmenter l'intensité du fragment choisi. D'autres paramètres peuvent être modifiés au niveau du cône d'extraction, de la lentille de radiofréquence et du détecteur. Ces paramètres ont tous été optimisés lors du développement de la méthode d'analyse du lyso-Gb₃ et de ses sept analogues. La Figure 14 montre l'effet de certains de ces paramètres sur l'intensité du lyso-Gb₃ et de ses analogues mesurée dans un échantillon d'urine d'un patient atteint de la maladie de Fabry. Les paramètres qui ont eu le plus d'influence lors de ces optimisations sont le voltage appliqué sur le capillaire et la lentille de radiofréquence.

Figure 14 : Effet de différents paramètres sur l'intensité du signal obtenu pour le lyso-Gb₃ et ses analogues dans un échantillon d'urine d'un patient atteint de la maladie de Fabry. L'augmentation du signal (%) est indiquée sur la figure pour les optimisations effectuées. A) Voltage appliqué sur le capillaire (kV); B) Lentille de radiofréquence (sans unité); C) Cône d'extraction (V). Ce paramètre était déjà optimal; D) Débit du gas de désolvatation (L/h). Ce paramètre était déjà optimal; E) Température du gas de désolvatation (°C). Ce paramètre était déjà optimal; F) Débit du gas de cone (L/h). Ce paramètre était déjà optimal.

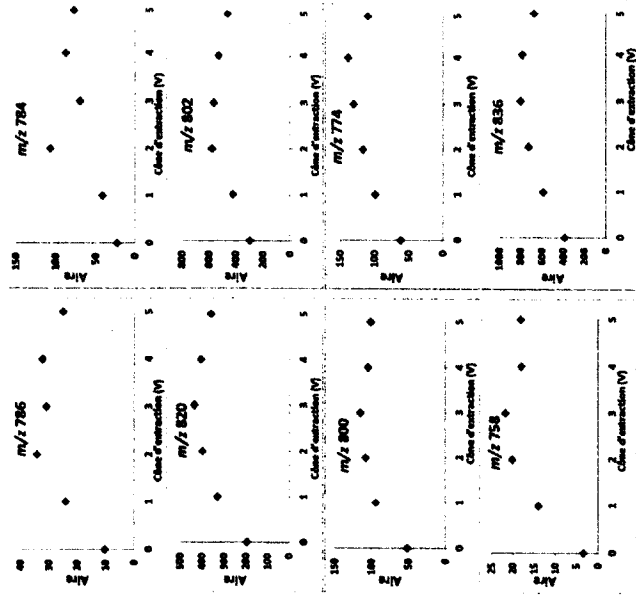
A)



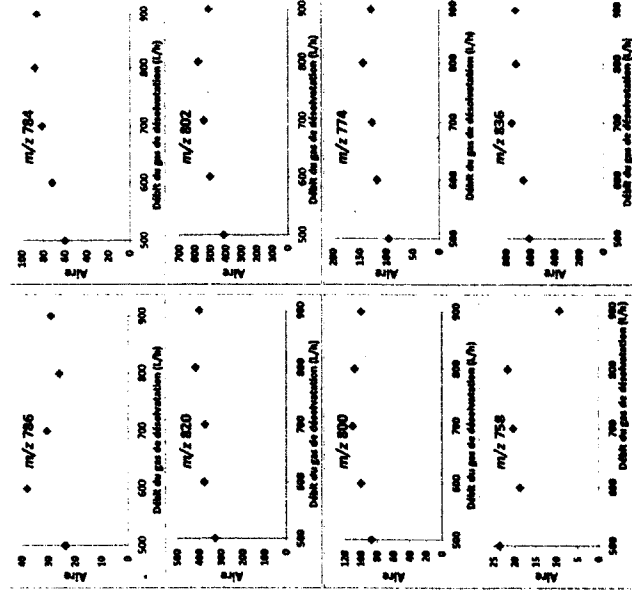
B)



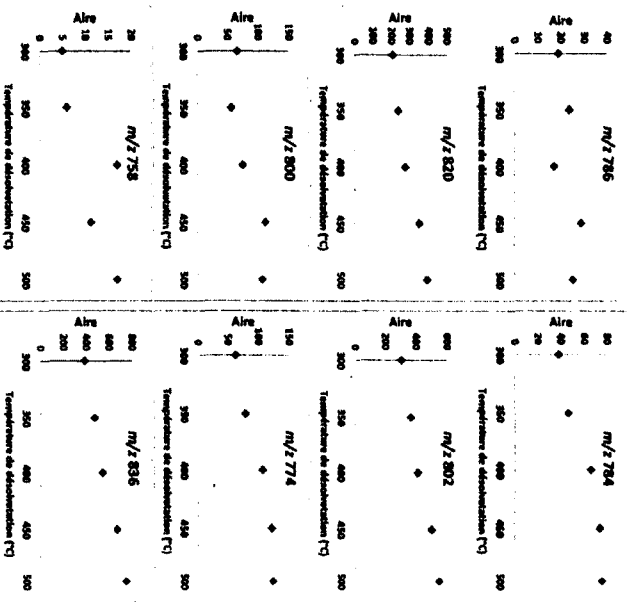
C)



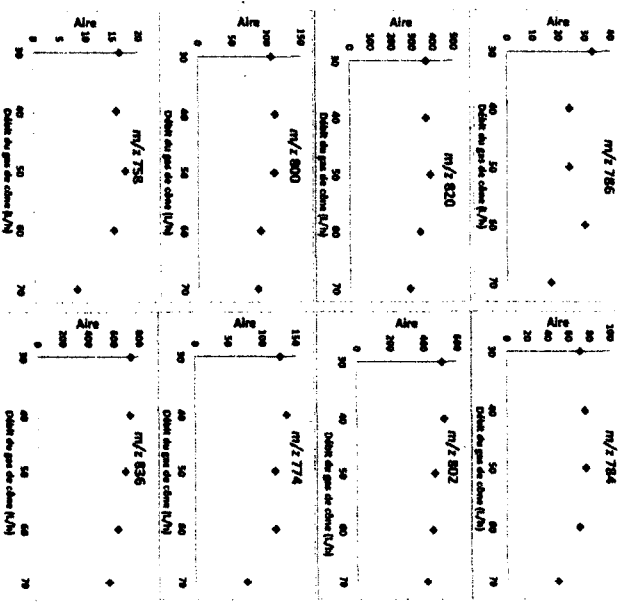
D)



E)



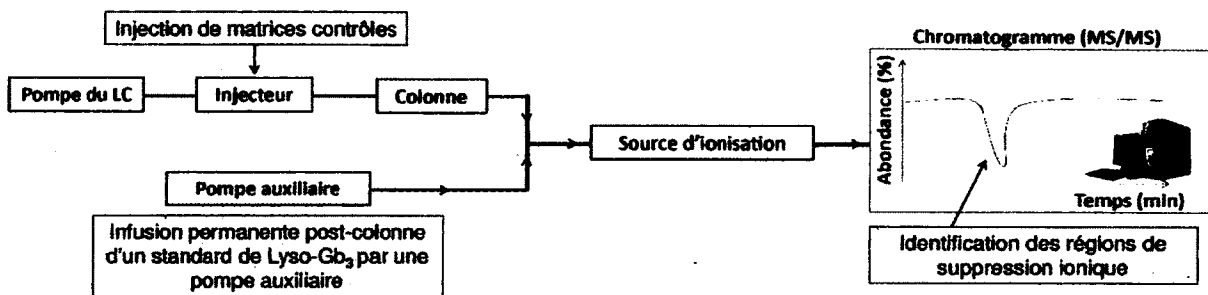
F)



1.4.4 Effet de matrice

Lors du développement de méthodologies pour des analyses quantitatives en spectrométrie de masse, une problématique majeure est reliée à la présence possible d'effets de matrice. Ces effets correspondent à la diminution ou à l'augmentation du signal d'un analyte d'intérêt causé non pas par sa concentration, mais plutôt par des composants présents dans la matrice. Ces composants co-éluent mais ne sont pas observés dans le chromatogramme (Chambers *et al.*, 2007). Si les effets de matrice ne sont pas contrôlés, la présence d'une molécule ayant la même concentration dans deux échantillons dont la composition varie peut donner deux signaux différents. Les conséquences sont notamment l'augmentation de la variabilité de la méthode d'analyse et une diminution de sa sensibilité. Les effets de matrice sont particulièrement importants lors d'analyses urinaires (Van Eeckhaut *et al.*, 2009) puisque la composition de cette matrice est difficile à contrôler et particulièrement complexe; il existe une variabilité urinaire entre les patients en raison de la diète, de la prise de médicaments, du moment de la journée où l'urine a été prise et de la concentration de celle-ci. Certains mécanismes responsables de l'effet de matrice sont proposés dans le cas d'une source fonctionnant par nébulisation électrostatique (Gosetti *et al.*, 2010). Une compétition pour les charges entre l'analyte et les composés de la matrice, dont l'issue est déterminée par leur affinité pour les protons, peut affecter l'efficacité de la formation d'ions. Par ailleurs, la formation d'adduits avec différents cations autres que les protons peut changer la masse de l'analyte et partager le signal à travers plus d'un rapport m/z ; ceci a pour conséquence de diminuer la sensibilité mais aussi la reproductibilité puisque le phénomène peut varier d'un échantillon à l'autre. La présence de molécules qui co-éluent pourrait également augmenter la viscosité et la tension de surface des gouttelettes produites et donc défavoriser leur désolvatation. Les effets de matrice doivent être évalués pour chaque analyte d'une méthode d'analyse donnée (Van Eeckhaut *et al.*, 2009). Pour se faire, la méthode de l'infusion post-colonne peut être utilisée (Figure 15). Celle-ci a été utilisée pour évaluer les effets de matrice pour le lyso-Gb₃ selon une méthodologie d'analyse dans l'urine. Le principe consiste à infuser directement un standard de la molécule d'intérêt (le lyso-Gb₃ dans l'exemple présenté) à une concentration constante directement dans le spectromètre de masse, sans passer par le système de chromatographie.

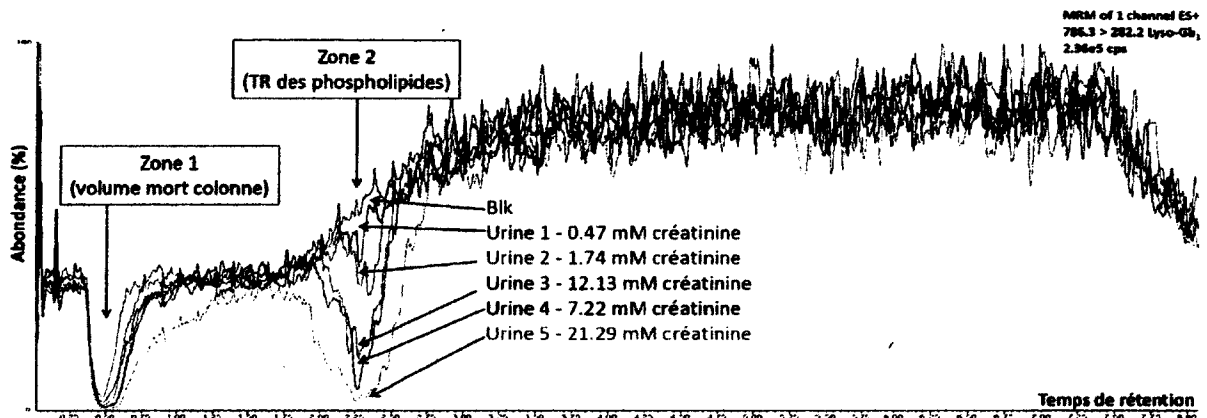
Figure 15 : Méthode d'infusion post-colonne pour la détermination des zones d'effets de matrice (Adapté de Van Eeckhaut *et al.*, 2009).



Simultanément, des échantillons d'urine d'individus contrôles sains sont injectés par le système de chromatographie, selon la méthodologie d'analyse développée. Le spectromètre de masse est en mode "*multiple reaction monitoring*" et enregistre le signal donné par le lyso-Gb₃ dans le temps, pendant l'injection des matrices. La concentration du lyso-Gb₃ infusé dans le spectromètre de masse est constante à tout moment lors des injections. Dans le chromatogramme, les temps de rétention où le signal varie sont donc des zones où les composants de la matrice affectent le signal mesuré. Au niveau de la Figure 15, le pic indiqué par une flèche représente une suppression de l'ionisation. Il est à noter que parfois, la problématique peut être inversée, c'est-à-dire qu'il y a augmentation du signal par l'effet de matrice ("ion enhancement"). La Figure 16 montre les résultats obtenus lors de l'injection de 5 matrices différentes et d'un tube de blanc pendant l'infusion d'un standard de lyso-Gb₃. Les 5 matrices étaient de concentrations très différentes, tel qu'indiqué par des valeurs de créatinine variant de 0.47 à 21.29 mM. Les chromatogrammes des 6 signaux enregistrés ont été superposés pour des fins de comparaison. Le signal suit une courbe ascendante pendant la durée de l'analyse en raison du changement de composition de la phase mobile (gradient). C'est une façon d'observer l'effet favorable du solvant organique sur la sensibilité. Deux zones sujettes aux effets de matrice ont été déterminées. Le temps de rétention (TR) de la première (zone 1) correspond au volume mort de la colonne. C'est le temps de rétention des composants de la matrice qui ne sont pas retenus par la colonne. La deuxième (zone 2) correspond au temps de rétention des phospholipides, des molécules présentes à forte concentration dans l'urine et reconnues pour causer un effet de matrice (Ghosh 2012). Suite à la détermination des zones de temps de rétention où il y a beaucoup

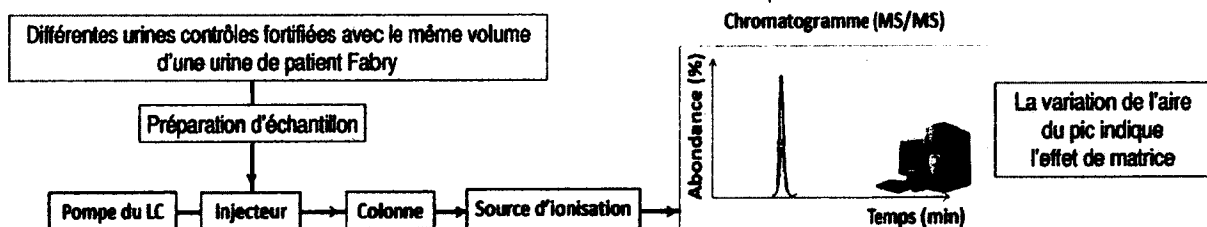
de suppression ionique, il est important d'ajuster la chromatographie pour que le temps de rétention de la molécule d'intérêt n'en fasse pas partie.

Figure 16 : Détermination des zones d'effet de matrice pour le lyso-Gb₃ selon la méthode développée d'infusion post-colonne.



Une deuxième façon pour évaluer les effets de matrice est celle de la méthode de fortification d'échantillons. C'est la méthode qui a été utilisée dans la publication faisant l'objet du présent mémoire. Cette méthode consiste à évaluer la variation de signal d'un analyte ajouté à une concentration fixe dans différentes matrices contrôles (Figure 17).

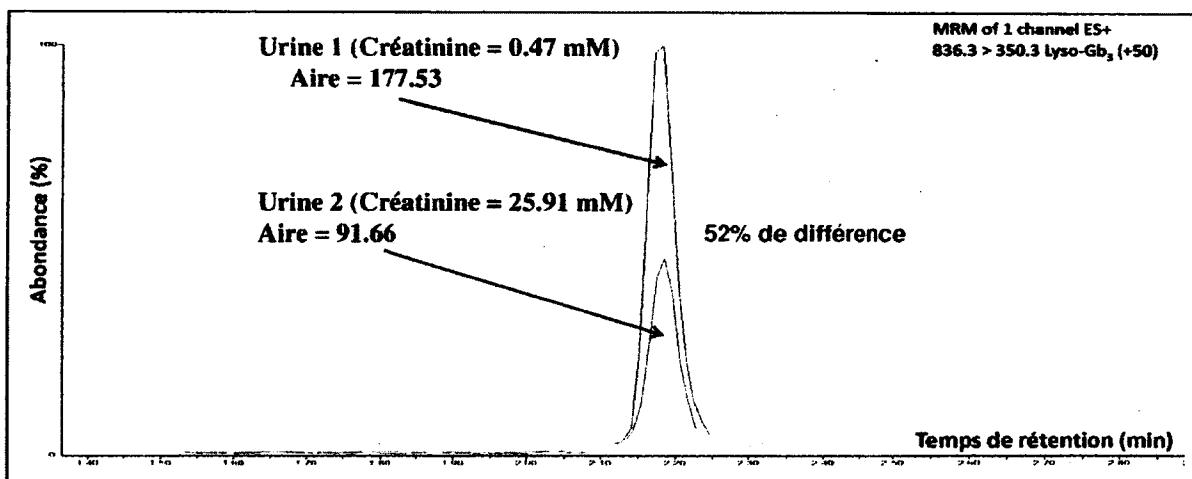
Figure 17 : Méthode de fortification d'échantillons pour l'évaluation des effets de matrice (Adapté de Van Eeckhaut *et al.*, 2009).



Étant donné que les standards des analogues du lyso-Gb₃ ne sont pas disponibles commercialement, la méthode a été adaptée en fortifiant des échantillons d'urine d'individus contrôles avec un volume fixe d'une urine d'un patient atteint de la maladie de Fabry. Les résultats obtenus pour l'analogue de m/z 836 sont présentés à la Figure 18 pour 2 urines très différentes; la première avait une créatinine de 0.47 mM, donc était très diluée

tandis que la deuxième avait une créatinine de 25.91 mM, donc très concentrée. La différence de signal entre les deux urines pour l'analogue m/z 836 était de 52% ce qui démontre bien des effets de matrice importants.

Figure 18 : Méthode de fortification d'échantillons. Variation du signal pour le lyso-Gb₃ (+50) (ayant un m/z 836) à la même concentration dans deux urines.



Une fois l'effet de matrice évalué, plusieurs moyens peuvent être utilisés pour l'éliminer le plus possible ou au moins, le réduire au maximum (Chambers *et al.*, 2007). Une des stratégies possibles est de mieux purifier l'échantillon. Plusieurs méthodes de purification existent telles que la purification par extraction en phase liquide, par extraction en phase solide ("Solid phase extraction, SPE") selon différentes affinités ou encore par précipitation des protéines. Si le traitement de l'échantillon ne réduit pas les effets de matrice, il est toujours possible d'améliorer la méthode chromatographique. Lorsque les zones de suppression ionique sont déterminées, il suffit d'ajuster la méthode en chromatographie pour que les molécules d'intérêt sortent à des temps de rétention qui se trouvent à l'extérieur de ces zones. Pour se faire, des essais avec des colonnes de sélectivités différentes ou différents gradients en chromatographie peuvent être tentés. En dépit d'éliminer les effets de matrice par des stratégies de purification d'échantillon ou de sélectivité chromatographique, il est toujours possible de le corriger par l'utilisation d'un standard interne. Toutefois, étant donné que les effets de matrice dépendent du temps de rétention, il faut s'assurer que le standard interne ait le même temps de rétention que les molécules d'intérêt et ce, pour apporter une meilleure correction de l'effet de matrice.

1.5 Validation de méthodes

Après le développement d'une méthode d'analyse, une validation rigoureuse est de mise dans le but de s'assurer que les résultats obtenus soient reproductibles. La sélectivité de la méthode doit être évaluée en faisant l'analyse de plusieurs échantillons provenant d'individus contrôles sains. Il faut s'assurer que des interférences ne sont pas présentes dans le chromatogramme pour une transition donnée, au temps de rétention de l'analyte. La précision (capacité d'une mesure à être reproduite) et l'exactitude (proximité des résultats avec la vraie valeur) de la méthode de quantification doivent être mesurées et ce, pour des analyses intra-jour et inter-jour. Habituellement, la variation intra-jour et inter-jour est répétée au moins 5 fois. Le recouvrement de l'analyte doit également faire l'objet d'une étude et consiste à évaluer le pourcentage de l'analyte restant après le traitement de l'échantillon par rapport à la quantité d'analyte présente avant le traitement. Le recouvrement est parfois diminué par un traitement comprenant plusieurs étapes successives telles que des extractions, des évaporations et des transferts. Si une courbe de calibration est utilisée, le signal donné par l'instrument devrait être proportionnel à la concentration de l'analyte présent dans les points de calibration. Les limites de quantification (LOQ) et de détection (LOD) devraient être établies et correspondent respectivement à 10 fois et 3 fois l'écart-type de la réponse de l'analyte, à basse concentration, divisé par la pente de la courbe de calibration. Pour les échantillons contenant des quantités inférieures aux limites de quantification ou de détection, une note devrait l'indiquer.

La stabilité des molécules analysées dans la matrice devrait être évaluée pour les conditions auxquelles celle-ci risque d'être soumise. Par exemple, il faut vérifier la stabilité des molécules dans la matrice laissée à différentes températures pour des périodes de temps données. Des températures de 25°C, 4°C, -20°C et -80°C sont habituellement vérifiées pour des périodes de temps pouvant aller d'un jour à 3 mois et plus, tout dépendant de l'analyte et du but visé par la méthode. Il faut également vérifier la stabilité des molécules d'intérêt après quelques cycles de gel et de dégel des échantillons, s'il y a lieu. Finalement, l'effet de matrice doit être évalué et réduit au minimum, tel que décrit dans la section précédente.

Chapitre II

Multiplex Analysis of Novel Urinary Lyso-Gb₃-Related Biomarkers for Fabry Disease by Tandem Mass Spectrometry

Pamela Lavoie, Michel Boutin, Christiane Auray-Blais

Article publié dans *Analytical Chemistry*

Pamela Lavoie a réalisé tout le travail de laboratoire nécessaire pour cet article. Elle a effectué la conception et l'élaboration de la majorité des recherches et expériences. Elle a analysé tous les échantillons faisant partie de l'article avec la méthodologie développée et procédé à l'analyse statistique et à la présentation des résultats sous forme de figures et de tableaux. Elle a rédigé l'article et a reçu de l'aide de ses co-auteurs pour les corrections et les ajouts nécessaires.

Résumé

La maladie de Fabry est une maladie lysosomale causée par l'absence ou la diminution de l'activité enzymatique de l' α -galactosidase A. Le déficit enzymatique engendre une altération du catabolisme des sphingolipides neutres présentant un galactose terminal de conformation α et leur accumulation subséquente dans plusieurs tissus. Il y a un besoin important de trouver des biomarqueurs reflétant la sévérité de la maladie, sa progression, la réponse à l'intervention thérapeutique et les détails de la pathogénèse. Jusqu'à maintenant, deux sphingolipides ont été ciblés comme biomarqueurs dans l'urine et le plasma des patients Fabry: le globotriaosylcéramide (Gb₃) et le globotriaosylsphingosine (lyso-Gb₃). À l'aide d'une approche en métabolomique, notre groupe a récemment découvert sept nouveaux biomarqueurs urinaires de la maladie de Fabry, reliés au lyso-Gb₃, ayant des rapports masse sur charge (m/z) de 758, 774, 784, 800, 802, 820 et 836. Tous ces biomarqueurs résultent de modifications au niveau de la partie sphingosine du lyso-Gb₃. Les objectifs de la présente étude étaient d'élaborer et de valider une méthodologie d'analyse en multiplex spécifique pour la quantification relative de ces sept analogues et d'évaluer leurs niveaux d'excrétion urinaire dans des échantillons provenant de 164 patients atteints de la maladie de Fabry et de 96 contrôles sains. Il n'y avait pas de quantité détectable des analogues dans les contrôles sains, à l'exception de traces de l'analogue de m/z 836. Des corrélations significatives ont été établies entre les niveaux des analogues du lyso-Gb₃ dans l'urine et le sexe ($p < 0.001$) des patients. Les hommes atteints de la maladie de Fabry avaient des niveaux d'excrétion plus élevés comparés aux femmes. Les niveaux des analogues du lyso-Gb₃ corrélaient bien avec la thérapie enzymatique de remplacement (TER) chez les hommes ($p < 0.05$). La distribution urinaire des analogues varie au sein des patients atteints de la maladie de Fabry. Toutefois, les analogues de m/z 802, 820 et 836 étaient généralement plus abondants chez la majorité des patients. Les analogues du lyso-Gb₃ sont des biomarqueurs urinaires prometteurs pour la maladie de Fabry.

Multiplex Analysis of Novel Urinary Lyso-Gb₃-Related Biomarkers for Fabry Disease by Tandem Mass Spectrometry

*Pamela Lavoie, Michel Boutin, Christiane Auray-Blais**

Service of Genetics, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, 3001, 12th Avenue North, Sherbrooke (Québec), Canada J1H5N4

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

ABSTRACT

Fabry disease is a lysosomal storage disorder caused by the absence or reduction of α -galactosidase A enzyme activity. The enzymatic deficiency results in the impaired catabolism of neutral sphingolipids with terminal α -galactosyl residues and subsequent accumulation in several tissues. Biomarkers reflecting disease severity and progression, the response to therapeutic intervention, and details of molecular pathogenesis are needed. Until now, two sphingolipids were targeted as biomarkers in urine and plasma of Fabry patients: globotriaosylceramide (Gb₃) and globotriaosylsphingosine (lyso-Gb₃). Using metabolomic approaches, our group recently discovered seven novel urinary lyso-Gb₃-related Fabry disease biomarkers with mass-to-charge ratios (m/z) of 758, 774, 784, 800, 802, 820, and 836. All these biomarkers exhibited modifications of the lyso-Gb₃ sphingosine moiety. The aims of the present study were to devise and validate a specific tandem mass spectrometry multiplex methodology for the relative quantification of these seven analogues and to evaluate their urinary excretion levels in samples from 164 Fabry patients and 94 healthy controls. We found no detectable analogues in healthy controls, except for trace amounts of the analogue with m/z 836. Significant correlations were

established between lyso-Gb₃ analogue levels in urine and gender ($p < 0.001$). Fabry males had higher excretion levels compared to females with the disease. Lyso-Gb₃ analogue levels correlated well with enzyme replacement therapy (ERT) status in males ($p < 0.05$). The urinary analogue distributions varied among Fabry patients. However, the analogues with m/z 802, 820 and 836 were generally more abundant in the majority of patients. Lyso-Gb₃ analogues are promising urinary biomarkers for Fabry disease.

INTRODUCTION

Fabry disease (OMIM no. 301500) is an X-linked lysosomal storage disorder (LSD) (estimated prevalence of 1:3000-1:117 000 newborn males^{1, 2}) caused by the absence or reduction of α -galactosidase A enzyme activity.³ The enzymatic deficiency results in the impaired catabolism of neutral sphingolipids with terminal α -galactosyl residues, mainly globotriaosylceramide (Gb₃)⁴⁻⁹ and globotriaosylsphingosine (lyso-Gb₃),¹⁰⁻¹⁵ and subsequent accumulation in different organs, tissues, and biological fluids. The clinical manifestations of Fabry disease are progressive and heterogeneous. Symptoms first appear during childhood or adolescence and include angiokeratomas, acroparesthesia, hypohidrosis and cornea verticillata.^{16, 17} Organ involvement develops in adulthood and includes impaired renal function, cardiomyopathy, transient ischemic attacks and stroke^{18, 19} which can result in premature death.^{18, 20, 21} Female Fabry patients are also affected, and in some cases as severely as men.^{21- 25} They experience a wide range of disease expression and tend to develop symptoms at a later age.^{26, 27}

Enzyme replacement therapy (ERT) of the disease has been available since 2001.^{17, 28-30} Numerous studies support the clinical benefit of ERT with respect to the quality of life, disease progression and stabilization of end organ structure and function.^{29, 31, 32} Research on other treatment possibilities including substrate reduction, pharmacological chaperone and gene therapy is in progress.³³⁻³⁵ In order to evaluate the effects of treatment reliably, non-invasive biomarker measurements reflecting disease severity, prognosis, response to therapeutic intervention, and molecular pathogenesis are needed.³⁶ Thurberg et al. evaluated ERT treatment efficacy by studying the clearance of Gb₃ from several renal cell

types 11 months after the beginning of treatment in 48 Fabry patients.⁹ It was also later shown that urinary Gb₃ excretion normalized to creatinine correlates well with gender, ERT status and mutation types.³⁷ However, other studies demonstrated the incomplete relationship between plasma and urinary Gb₃ levels and disease manifestations.^{5, 38} More recently, Aerts et al.¹⁰ postulated that Gb₃ metabolites could play a role in the Fabry pathogenesis and reported the presence of a deacylated form of Gb₃, globotriaosylsphingosine (lyso-Gb₃) (Figure 1, Part A) in plasma. Elevated lyso-Gb₃ levels were found in plasma of Fabry patients and concentrations were reduced after ERT.^{10, 12} Subsequent studies showed that plasma lyso-Gb₃ excretion levels correlate significantly with cerebrovascular white matter lesions in males and left ventricular mass in females³⁹, and that urinary lyso-Gb₃ levels correlate with mutation types, gender and ERT status.¹¹

Our group recently published the results of a metabolomic mass spectrometry approach aiming to find new Fabry urinary biomarkers.⁴⁰ Seven novel Fabry biomarkers were detected. Fragmentation studies, using a time-of-flight mass spectrometer, revealed that they were structurally similar to lyso-Gb₃, but with modifications on their sphingosine moieties (See Figure 1, Part B). The empirical formulas of these modifications were determined by exact mass measurements.⁴⁰ Mass spectrometry has proven to be a tool of choice for biomarker analysis due to its high sensitivity, specificity, and robustness.⁴¹⁻⁴⁴ The objectives of the present study were: 1) To develop and validate a tandem mass spectrometry methodology for the relative quantification of these seven novel urinary lyso-Gb₃ analogues; 2) To evaluate their excretion in four Fabry patient sample groups: untreated Fabry males, treated Fabry males, untreated Fabry females and treated Fabry females compared to controls; 3) To evaluate correlations between each urinary lyso-Gb₃ analogue levels and gender, ERT status, and urinary Gb₃ levels of excretion.

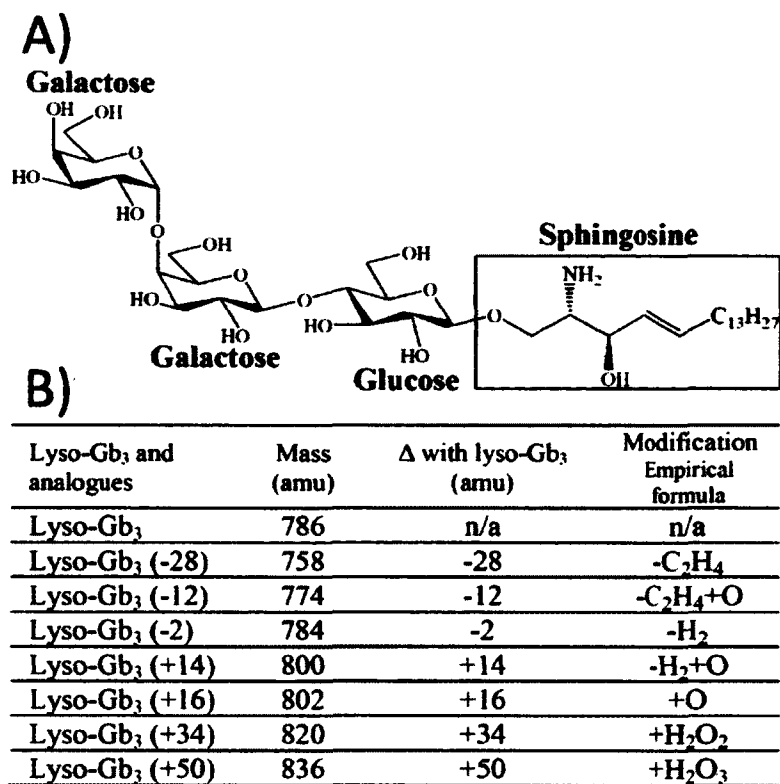


Figure 1. A) Chemical structure of globotriaosylsphingosine (lyso-Gb₃); B) Lyso-Gb₃ and its seven analogue masses (m/z) and the sphingosine modifications; n/a: not applicable.

EXPERIMENTAL SECTION

Ethics approval

This project was approved by the Research Ethics Board (REB) of the Faculty of Medicine and Health Sciences and the Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke (CHUS) and the institutional-REBs of all the collaborators.

Urine collection from patients and controls

After informed consent was obtained, random urine samples, not filtered nor centrifuged, were collected from Fabry patients in whom the diagnosis was confirmed by demonstrating marked enzyme deficiency in leucocytes or by mutation analysis. Urine samples from 164 Fabry patients were analyzed: 72 males (age range: 1 to 62 years, median age: 35 years),

and 92 females (age range: 4 to 72 years, median age: 42 years). Forty-nine males and 34 females were treated with agalsidase α , 0.2 mg/kg/2 weeks (Replagal[®], Shire Human Genetic Therapies) or agalsidase β , 1.0 mg/kg/2 weeks (Fabrazyme[®], Genzyme Corporation, a Sanofi Company).

The effect of ERT on urinary lyso-Gb₃ and analogue levels was evaluated for two Fabry patients: one male and one female. First, urine samples from a 35 year-old male Fabry patient hemizygous with the nonsense mutation c.1024C>T (p.Arg342X, R342X) were obtained before starting ERT (7 months and 1 month before), and 5, 11, 17, 25, and 30 months after the beginning of treatment. It is noteworthy to mention that this patient was treated with agalsidase β for urine samples collected at 5, 11 and 17 months after ERT, and on agalsidase α for samples collected at 25 and 30 months after ERT, owing to a shortage of agalsidase β .⁴⁵ The α -galactosidase A enzyme activity in leucocytes for this patient was 4 nmol/h/mg of proteins (healthy control range is 34-128 nmol/h/mg)⁴⁶ and his Mainz Severity Score Index (MSSI) was considered to be of moderate severity at 23.⁴⁷ He presented Fabry-like symptoms with hypohidrosis, angiokeratomas, tinnitus, fatigue, proteinuria, abdominal and musculoskeletal pain, ischemic cerebrovascular disease and he suffered from a stroke. Secondly, urine samples from a 35 year-old female Fabry patient heterozygous for the c.1241T>C (p.Leu414Ser, L414S) missense mutation were evaluated to determine the levels of analogue excretion. The α -galactosidase A activity in leucocytes for this patient was in the normal range at 68 nmol/h/mg proteins and she presented with a MSSI of mild severity at 14. This patient had fatigue, proteinuria, angiokeratomas, left ventricular hypertrophy and heart failure class II according to the New York Heart Association (NYHA) Functional Classification. Urine samples were obtained at 23, 9 and 3 months before the beginning of ERT and at 3 and 9 months after the first administration of agalsidase α .

Urine samples were obtained from 39 healthy reference control males (age range: 2 to 57 years, median age: 14 years) and 55 healthy reference control females (age range: 2 to 59 years, median age: 20 years) in order to evaluate the selectivity of the method and to

establish normal reference values for each analogue. All samples were stored at -20°C until analysis.

Reagents

HPLC grade water (H_2O), ACS grade ammonium hydroxide (NH_4OH) 29%, and ammonium formate were from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ). HPLC grade methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), isopropyl alcohol (IPA), and chloroform (CHCl_3) were from EMD Chemicals Inc. (Darmstadt, Germany). Formic acid (FA) 99% purity was from Acros Organics (Fair Lawn, NJ), and ACS grade hydrochloric acid (HCl) 36.5-38% purity was from Anachemia Canada (Montreal, Quebec). Trifluoroacetic acid (TFA) 99% purity, triethyl ammonium bicarbonate (TEAB) buffer 1M, Boc-glycine N-hydroxysuccinimide ester (BOC-Gly-NHS), and creatinine were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Creatinine- d_3 (99.8 atom % D) standard was purchased from CDN Isotopes (Pointe-Claire, Quebec). Finally, lyso- Gb_3 was from Matreya (Pleasant Gap, PA).

Lyso- Gb_3 stock solution

A 5 mg aliquot of lyso- Gb_3 was weighed into a glass flask and dissolved in 325 mL of $\text{ACN:H}_2\text{O}$ 50:50 +0.1% FA solution with the aid of sonication for 30 s. Care was taken to ensure that dissolution was complete. The lyso- Gb_3 stock solution was stable at 4°C for at least 5 months.

Lyso- Gb_3 standard curve working solutions

Working solutions were prepared by diluting the lyso- Gb_3 stock solution in volumetric flasks with $\text{ACN:H}_2\text{O}$ 50:50 + 0.1% FA to obtain the following concentrations: 0, 10, 25, 50, 100, 200, 350, 500, and 700 nmol/L. Working solutions were stable at 4°C for at least 10 weeks.

Lyso-Gb₃-Gly internal standard (IS) stock solution

The synthesis and purification of the internal standard, a glycine lyso-Gb₃ derivative, were performed with minor modifications of the method developed by Krüger et al.⁴⁸ This IS had the advantage of having a primary amine function similar to the analogues. Consequently, the IS and the analogues exhibited comparable extraction and ionization properties. Briefly, a quantity of 250 μ L of a BOC-Gly-NHS 0.1M solution in solvent mixture A (CHCl₃:MeOH:TEAB 1M 2:1:0.05) was added to a lyso-Gb₃ (1.7 mg lyso-Gb₃/2.1 mL solvent A) solution and shaken for 5 hours at room temperature (22°C). After the reaction was completed, 750 μ L of TFA were added in order to cleave the BOC protective group, and the reaction ended after incubation for 18 hours at 50°C. After evaporation of the reaction solvent under a nitrogen flow, the residue was resuspended in 1 mL MeOH for purification. Purification of lyso-Gb₃-Gly was performed on an Alliance 2795 HPLC (Waters) using a Sunfire C₈ 4.6 x 100 mm and 3.5 μ m particle size column (Waters). The flow rate was 0.7 mL/min, the column temperature was 50°C using mobile phase A (ACN:IPA 60:40 + 0.2%FA) and mobile phase B (H₂O:ACN 95:5 +0.2%FA). The gradient run was: 0 to 8 min at isocratic solvent composition using 35% mobile phase A and 65% mobile phase B, followed by 3 min using 100% mobile phase A, then immediate return to initial conditions for 4 min. The injection volume was 25 μ L and the divert valve was used for fraction collection from 5.7 to 6.1 min. Pure fractions containing lyso-Gb₃-Gly were combined and the solvent was evaporated using a rotary evaporator. After lyophilisation and weighting, the residue was redissolved in ACN:H₂O 50:50 solvent mixture giving a lyso-Gb₃-Gly stock solution of 95 μ mol/L. This solution was kept at -80°C and showed no sign of degradation for at least 9 months.

Lyso-Gb₃-Gly IS working solution

A working solution of lyso-Gb₃-Gly IS was prepared by diluting an aliquot of the 95 μ mol/L stock solution with methanol to a working solution concentration of 20 nmol/L. This solution was kept at 4°C and showed no sign of degradation for at least 3 months.

Sample preparation

Calibration curve

Prior to solid phase extraction (SPE), 500 μL of homogenized healthy control urine was mixed with 500 μL of the lyso-Gb₃-Gly IS working solution. Each calibrator was spiked with 20 μL of its corresponding lyso-Gb₃ standard working solution. Samples were then acidified with 100 μL of HCl 1 mol/L, vortexed for 10 seconds and loaded on conditioned (1200 μL of MeOH followed by 1200 μL of HCl 1 mol/L in water) Oasis MCX cartridges (30 mg, 60 μm , Waters Corp., Milford, MA). Following the loading step, cartridges were washed successively with 1200 μL of H₂O + 2%FA and 1200 μL MeOH + 0.2%FA. Elution was performed using 600 μL of MeOH + 2%NH₄OH. After evaporation to dryness under nitrogen flow, residues were reconstituted with 200 μL of a ACN:H₂O 70:30 + 0.1%FA solution and 25 μL were injected onto the LC-MS/MS system for analysis.

Processing urine samples from Fabry patients and controls

Urine samples from Fabry patients and controls were prepared in a manner similar to that used to generate the calibration curve except 20 μL of a ACN:H₂O 50:50 + 0.1%FA solution was added instead of the lyso-Gb₃ standard curve working solution in order to mimic the calibration curve.

Instrumentation and parameters

The analysis of lyso-Gb₃ and its 7 analogues was performed simultaneously on a Quattro micro tandem quadrupole mass spectrometer (MS/MS) coupled to a high performance liquid chromatography (HPLC) Alliance 2795XE system (Waters) by positive electrospray ionization (ESI+). Lyso-Gb₃ and its analogue signals were acquired during a multiple reaction monitoring (MRM) experiment. The chromatography column was an Atlantis HILIC Silica of 2.1X 50 mm and 3 μm particle size (Waters) with an on-line pre-filter (0.5 μm). The method run-time and the total analysis time between injections were 10 and 11

min, respectively. Liquid chromatography and mass spectrometry parameters are presented in Table 1.

HPLC method		ESI-MS/MS method				
column	Atlantis Silica HILIC	operating mode	multiple reaction monitoring			
i.d. x length	2.1mm x 50 mm	ionization mode	ESI+			
particle size	3 μ m	capillary voltage	3 kV			
temperature	30 °C	extraction cone voltage	3 V			
mobile phase A	ACN + 0.2% FA	source temperature	120 °C			
mobile phase B	ACN-H ₂ O 5:95 + 0.2% FA	desolvation temperature	500 °C			
	gradient	cone gas flow	50 L/h			
		desolvation gas flow	800 L/h			
flow rate	mobile phases %	acquisition parameters				
0.3 mL/min	0-1 min \rightarrow 10-35% B	compound	transition	dwel time	cone voltage	collision energy
0.3 mL/min	1-4 min \rightarrow 35% B			(s)	(V)	(eV)
0.4 mL/min	4-6 min \rightarrow 35-50% B	Lyso-Gb ₃	786.3>282.3	0.06	40	35
0.4 mL/min	6-8.5 min \rightarrow 50-10% B	Lyso-Gb ₃ (-28)	758.3>254.3	0.06	35	30
0.3 mL/min	8.5-10 min \rightarrow 10% B	Lyso-Gb ₃ (-12)	774.3>252.3	0.06	40	35
		Lyso-Gb ₃ (-2)	784.3>280.3	0.06	40	35
strong wash	MeOH-H ₂ O 50:50 + 0.2% FA	Lyso-Gb ₃ (+14)	800.3>278.3	0.06	40	40
weak wash	ACN-H ₂ O 90:10 + 0.2% FA	Lyso-Gb ₃ (+16)	802.3>280.3	0.06	45	35
injection vol	25 μ L	Lyso-Gb ₃ (+34)	820.3>334.3	0.06	45	35
injection mode	partial loop	Lyso-Gb ₃ (+50)	836.3>350.3	0.06	45	35
autosampler	20 °C	Lyso-Gb ₃ -Gly	843.3>339.3	0.06	40	30
solvent delay	0-2.5 min and 5-10 min	interscan	0.01 s			
		interchannel delay	0.01 s			

Table 1. HPLC and ESI-MS/MS parameters used for the urinary analysis of lyso-Gb₃ and its analogues.

Relative quantification of Fabry disease biomarkers

Since individual lyso-Gb₃ analogue standards are not commercially available, the relative quantification of the compounds was achieved using a nine-point lyso-Gb₃ calibration curve measured over an extended concentration range: 0, 400, 1000, 2000, 4000, 8000, 14 000, 20 000, and 28 000 pmol/L. The need for a 9-point calibration curve stems from the different magnitude orders among the analogue relative levels. Response factors of similar magnitudes are expected, considering the structural similarities between lyso-Gb₃ and its analogues, including the presence of a primary amine function providing similar ionization, three sugar units and a sphingosine backbone. The lyso-Gb₃ calibration curve allowed comparison of urinary lyso-Gb₃ and analogue levels between the four different patient groups under study. The best results were obtained using a quadratic calibration curve with weighting 1/x and calibration origin excluded. Lyso-Gb₃ analogue data were acquired over

a time window of 2.5 min and quantified using the lyso-Gb₃ response factor for relative quantification. Data processing was achieved with Quanlynx software (Waters).

Creatinine analysis

Urinary creatinine concentration levels were measured by mass spectrometry as described previously by our group.⁴⁰ We minimized variations in urine concentration by normalizing lyso-Gb₃ and its analogue levels as ratios to creatinine.⁴⁹ In a previous study, our group found a tremendous variability in the urinary Gb₃ excretion levels for healthy children from 0 to 6 months of age compared to older children and adults.⁵⁰ We emphasize the importance of using Fabry patient urine samples which are age-matched to healthy reference controls for comparison purposes.

Evaluation of matrix effects

It is important to consider matrix effects in the development of mass spectrometry methodologies in order to prevent the suppression or enhancement of the analyte signal caused by co-eluting components which are not observed in the chromatogram.⁵¹ Matrix effect corrections were evaluated by using the lyso-Gb₃-Gly IS and by spiking 5 healthy control urine samples (1 000 µL) of different creatinine concentrations with the same amount of a Fabry patient urine specimen (500 µL). Data obtained were processed with and without the IS and precision was calculated.

Method validation

Intraday (4 replicates in a day) and interday (5 different days) precisions were assessed using urine samples from an untreated Fabry heterozygote and from an untreated Fabry hemizygote for low and high quality controls. Intraday and interday accuracy and precision were also assessed using control urine specimens spiked with lyso-Gb₃ at three concentration levels (low = 1 500, medium = 11 000, and high = 24 000 pmol/L). The linearity of the lyso-Gb₃ nine-point calibration curve was evaluated (0-28 000 pmol/L). In the absence of lyso-Gb₃ analogue standards, lyso-Gb₃ and its 7 analogue recoveries were

measured using a homogenized urine sample from a male Fabry patient: two 500 μ L urine aliquots (each in triplicates) were processed as described previously, but 500 μ L of MeOH was added instead of the lyso-Gb₃-Gly IS working solution. At the reconstitution step, the first aliquot was reconstituted with a ACN:H₂O 70:30 + 0.1%FA solution containing 50 nM lyso-Gb₃-Gly IS. The second aliquot was reconstituted with 500 μ L of water to mimic the urine sample and the extraction process was repeated. The final reconstitution was performed in the same manner as the first aliquot. Lyso-Gb₃ and its analogue responses stemming from these two aliquots were compared to evaluate the percentage of recovery. The addition of lyso-Gb₃-Gly IS at the beginning of the process (as previously described) was not feasible due to the double processing of the second aliquot. Therefore, lyso-Gb₃-Gly IS was added in the reconstitution solution with a 2.5x SPE concentration factor to correct possible matrix effects during mass spectrometry analysis. Limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) were defined relative to lyso-Gb₃ concentrations and were: three and ten times the standard deviation of the analyte response (n=7), respectively, at low concentration (averaging 400 pM) divided by the lyso-Gb₃ calibration curve slope. The stability of lyso-Gb₃ and its seven analogues was evaluated in Fabry patient urine samples, aliquoted and analyzed after 3 hours at room temperature (22°C), 6 hours in a refrigerator (4°C) and 8 weeks in a freezer (-20°C). The stability of lyso-Gb₃ and its analogue concentration levels in urine matrix after three freeze/thaw cycles, and in reconstituted solutions left in the HPLC autosampler (20°C) for 24 hours was also evaluated.

Statistical analysis

Predictive Analytics Software (PASW) Statistics 18 version 18.0.0 (Chicago, IL) was used for statistical analyses. Correlations were established between analogues (including lyso-Gb₃) urinary levels (dependant variables) and gender or ERT status (independent variables) in 164 Fabry patient urine samples using the Mann-Whitney U-test. The Spearman rank correlation coefficient was used to compare lyso-Gb₃ analogues with Gb₃ urinary levels of excretion in 57 treated and untreated males and in 74 treated and untreated female Fabry patients. The percentage of distribution of lyso-Gb₃ and its analogues were separately

evaluated in treated and untreated Fabry patients divided by gender, and more specifically in two untreated Fabry patients (one male, one female).

RESULTS AND DISCUSSION

Matrix effects

Precautions were taken to reduce matrix effects, considering they may lead to ion suppression or enhancement, and have a strong negative impact on the overall method robustness and sensitivity. Solid phase extraction procedures using mixed-mode cation exchange cartridges have a high selectivity for basic compounds, thus helped to reduce significantly potential interferences from the matrix, including neutral and acidic compounds, as well as salts. The lyso-Gb₃-Gly IS was used to correct for variability due to sample processing, but more importantly, to compensate for matrix effects. Figure 2 shows typical LC-MS/MS chromatograms for lyso-Gb₃, its 7 analogues and lyso-Gb₃-Gly IS obtained from an untreated Fabry male urine sample analysis. After evaluating various parameters and different column possibilities, a HILIC phase column was chosen over a reverse phase chromatography. This strategy provided a better alignment of lyso-Gb₃ and its analogues with the lyso-Gb₃-Gly IS retention time and a better correction of the mass spectrometry response alterations. These results are shown by the vertical line in Figure 2.

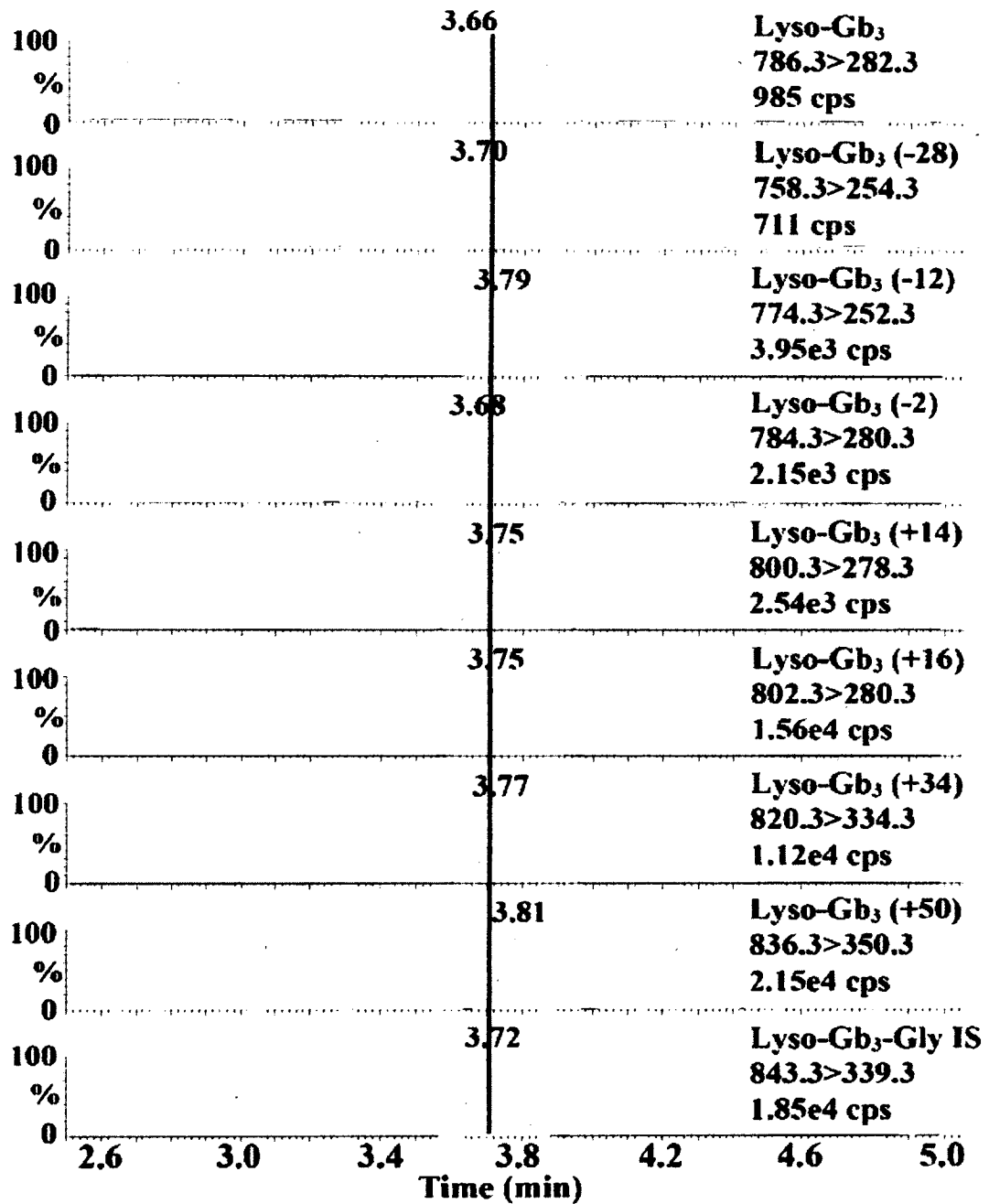


Figure 2. MRM chromatograms of lyso-Gb₃, its 7 analogues and lyso-Gb₃-Gly IS in a urine sample from an untreated Fabry male. Lyso-Gb₃ and each analogue is shown with the transition (parent ion > daughter ion) and the peak intensity in counts per second (CPS).

Figure 3 shows the results obtained in order to assess matrix effects using a “spiking method”. We noticed that upon analysis of different urine samples, precision was improved when data processing was performed with the lyso-Gb₃-Gly IS (Figure 3, Part A) in comparison to data processing without the IS (Figure 3 Part C). In fact, coefficients of variation were reduced considerably for all analogues while using the internal standard: 36 to 7% for lyso-Gb₃, 35 to 9% for lyso-Gb₃ (-28), 34 to 6% for lyso-Gb₃ (-12), 31 to 2% for lyso-Gb₃ (-2), 31 to 2% for lyso-Gb₃ (+14), 32 to 2% for lyso-Gb₃ (+16), 33 to 4 for lyso-Gb₃ (+34) and finally 37 to 9 for lyso-Gb₃ (+50). In order to confirm that sample processing variations obtained without the IS were mainly caused by matrix effects, and not a lack of method reproducibility, we opted to evaluate the precision on 5 different extractions of the same Fabry patient urine sample (Figure 3, Part B). The results obtained showed that all CVs were below 10%.

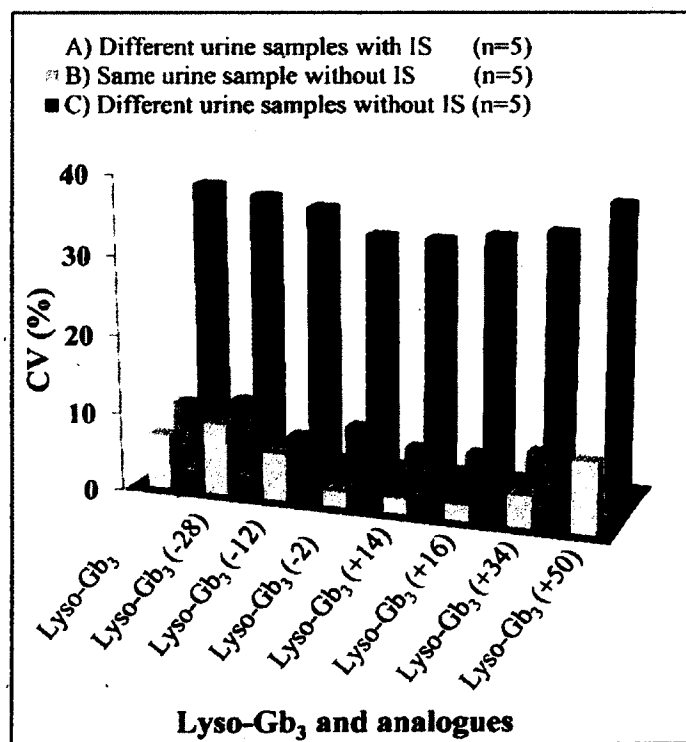


Figure 3. Method precision for lyso-Gb₃ and its analogues determined in: (A) Five different healthy control urine samples spiked with the same volume of a Fabry patient urine sample and processed with the lyso-Gb₃-Gly IS; (B) The same Fabry patient urine sample processed without the lyso-Gb₃-Gly IS; (C) Five different healthy control urine samples spiked with the same volume of a Fabry patient urine sample and processed without the lyso-Gb₃-Gly IS.

Method validation

The precisions for intraday (n=4) and interday (n=5) of lyso-Gb₃ and 7 analogue assays using Fabry patient urine samples at low and high QCs were assessed. The intraday precision results showed CVs (%) for low and high QCs at ≤13% and ≤5%, respectively. Regarding interday precision, CVs (%) for low and high QCs were ≤20% and ≤13%, respectively (See Supporting Information Table S-1 for all precision assays). Since a commercially available lyso-Gb₃ standard was used, intraday (n=4) and interday (n=5) precision and accuracy were specifically assessed in control urine samples spiked at 3 levels of concentration (1 500, 11 000 and 24 000 pM). The lyso-Gb₃ precision and accuracy results were good with all CVs (%) and bias (%) <8% (See Supporting Information Table S-2). The lyso-Gb₃ response was linear from 0 to 28 000 pmol/L with a mean coefficient of regression at 0.9985 (n=10).

Recoveries of lyso-Gb₃ and its analogues from sample processing varied from 81 to 98% and LODs and LOQs ranged from 85 to 247 pM and from 282 to 824 pM, respectively (See Supporting Information Table S-3). We previously published an assay for the analysis of urinary lyso-Gb₃¹¹ where LOD and LOQ were considerably lower (10 and 20 pM). The differences in LODs and LOQs with this methodology are mostly due to an increase of the MRM acquisition channel numbers (9 channels with this method *versus* only 2 channels in the lyso-Gb₃ method¹¹) which decreased the overall sensitivity. In order to resolve this issue, we plan to transfer this assay to a UPLC Xevo TQ-S tandem mass spectrometer (Waters Corp.) which offers higher sensitivity and acquisition speed. Lyso-Gb₃ and its analogues were stable in urine matrix after 3 freeze/thaw cycles and for 3 hours at 22°C, 6 hours at 4°C and at least 8 weeks at -20°C. Reconstituted solutions left for 24 hours in the HPLC autosampler were also stable. All CVs were ≤15%.

Analysis of Fabry lyso-Gb₃ analogues in urine

Figure 4 shows the results of analyses of urine samples from 164 Fabry patients and 94 controls analyzed by LC-MS/MS. Samples were subdivided into 6 groups: untreated Fabry males (UFM), treated Fabry males (TFM), untreated Fabry females (UFF), treated Fabry females (TFF), control males (CM) and females (CF). Median (M) and ranges (minimum-maximum values) are given for each group. All urine concentration levels for each analogue were normalized to creatinine. The Supporting Information Table S-4 presents the age, gender, and mutations of Fabry patients and controls, as well as the relative concentrations for each analogue.

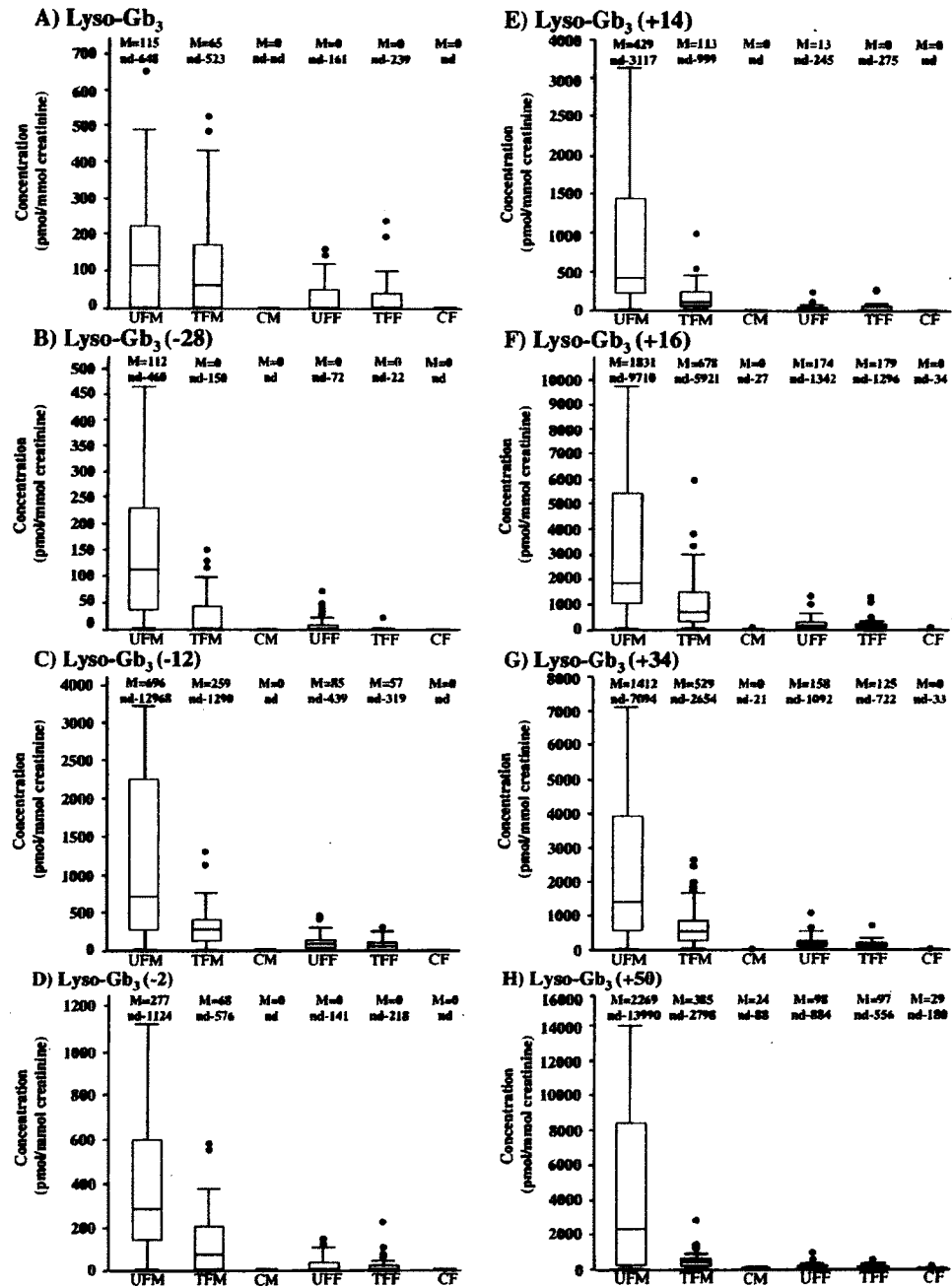


Figure 4. Lyso-Gb₃ and its 7 related analogue abundances: (1) Urine samples from untreated Fabry males (UFM), n=23; (2) Urine samples from treated Fabry males (TFM), n=49; (3) Urine samples from control males (CM), n=39; (4) Urine samples from untreated Fabry females (UFF), n=58; (5) Urine samples from treated Fabry females (TFF), n=34; (6) Urine samples from control females (CF), n=55; Median (M) with minimum and maximum urinary excretion ranges; nd: non detected. The lower and upper limits shown by the boxplots are the 25th and 75th percentiles and the horizontal line is the median. The ends of the whiskers represent the lowest value within 1.5 interquartile range of the 25th quartile and the highest value within 1.5 interquartile range of the 75th quartile. Circles represent outlier values.

The effect of the gender of each Fabry patient on the urinary excretion of lyso-Gb₃ and its analogues was assessed by comparing urinary analogue levels from UFM with those from UFF. Medians and p-values for each biomarker are summarized in Table 2. A Mann-Whitney U-test showed a strong correlation between each analogue level and patients gender ($p < 0.001$). These results corroborate well with results obtained from previous studies on Gb₃ and lyso-Gb₃ performed by our group^{11, 37} and others.^{5, 52} Fabry females excrete less Gb₃, lyso-Gb₃ and related analogues than their male counterparts, which may be meaningful in regard to disease severity. Some analogue excretions were less abundant than others, as shown with the UFF medians at 0 pmol/mmol creatinine for lyso-Gb₃, lyso-Gb₃ (-28) and lyso-Gb₃ (-2). Several patient urine samples showed small peaks for these analogues but a 0 value was assigned since the concentration was below the LOD.

Lyso-Gb ₃ and analogues	impact of gender			impact of ERT (males)			impact of ERT (females)		
	medians (pmol/mmol creat.)		p	medians (pmol/mmol creat.)		p	medians (pmol/mmol creat.)		p
	UFM	UFF		UFM	TFM		UFF	TFF	
Lyso-Gb ₃	115	0	<0.001	115	65	0.496	0	0	0.993
Lyso-Gb ₃ (-28)	112	0	<0.001	112	0	<0.001	0	0	<0.05
Lyso-Gb ₃ (-12)	696	85	<0.001	696	259	<0.05	85	57	0.153
Lyso-Gb ₃ (-2)	277	0	<0.001	277	68	<0.05	0	0	0.075
Lyso-Gb ₃ (+14)	429	13	<0.001	429	113	<0.05	13	0	0.711
Lyso-Gb ₃ (+16)	1831	174	<0.001	1831	678	<0.05	174	179	1.000
Lyso-Gb ₃ (+34)	1412	158	<0.001	1412	529	<0.05	158	125	0.327
Lyso-Gb ₃ (+50)	2269	98	<0.001	2269	385	<0.001	98	97	0.777

Table 2. Effect of gender and ERT status on the urinary excretion of lyso-Gb₃ and its analogues in male and female Fabry patients using the Mann-Whitney U-test.

Correlations were also calculated to evaluate the impact of ERT of male and female Fabry patients as shown in Table 2. For Fabry males, a Mann-Whitney U-test between analogue excretion levels and ERT status showed a strong correlation ($p < 0.001$) for lyso-Gb₃ (-28) and lyso-Gb₃ (+50) and a good correlation (< 0.05) for lyso-Gb₃ (-12), lyso-Gb₃ (-2), lyso-Gb₃ (+14), lyso-Gb₃ (+16) and lyso-Gb₃ (+34). These results suggest that ERT reduces considerably the urinary concentration of the 7 analogues in Fabry males. However, the statistical test for lyso-Gb₃ levels showed no significant correlation ($p = 0.496$) with ERT despite a UFM/TFM median ratio of 1.8. A UFM/TFM median ratio of 2.4 was found in a previous study with fewer patients.¹¹ The impact of ERT on Fabry females was also evaluated. A Mann-Whitney U-test between analogue excretion levels and ERT status

showed a statistically significant correlation ($p < 0.05$) for only one analogue: lyso-Gb₃ (-28). This suggests that ERT has little to no effect in Fabry females on the excretion of lyso-Gb₃ and the other analogues. These results may be explained by the fact that treated Fabry females are usually more severely affected than untreated Fabry females and thus, may present higher analogue levels before treatment. In order to test this hypothesis, urine samples from a Fabry female were collected over a period of 23 months before ERT and 9 months after administration of ERT, with measurements of lyso-Gb₃ and its analogue levels of excretion (Figure 5, Part A). Analogues at m/z 784, 800 and 836 were detectable in urine samples taken before ERT, whereas their levels were undetectable after treatment. This female patient had a missense mutation with a classic phenotype c.1241T>C (p.Leu414Ser, L414S) and her leucocyte α -galactosidase A enzyme activity was in the normal range, which is not unusual for Fabry females.⁵³ Mean urinary Gb₃ excretion by this patient was 545 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ creatinine ($n=3$) before ERT and 298 $\mu\text{g}/\text{mmol}$ creatinine after ERT ($n=2$). A more dramatic biochemical response to ERT might be expected from a female with a nonsense mutation or a lower α -galactosidase A enzyme activity.

A similar analysis was performed with urine samples from a male Fabry patient collected 7 months prior to ERT and 30 months after the beginning of treatment (Figure 5, Part B). Results show that the excretion of lyso-Gb₃ and its analogue was markedly reduced during 2.5 years of ERT treatment. Thus, although the correlation between lyso-Gb₃ urinary levels of excretion and ERT status in Fabry males as a group was not statistically significant (Table 2), it is noteworthy to mention that for this patient, the mean urinary lyso-Gb₃ concentration went from 395 pM/mM creatinine before ($n=2$) to 97 pM/mM creatinine ($n=5$) after ERT, a 4/1 ratio (Figure 5).

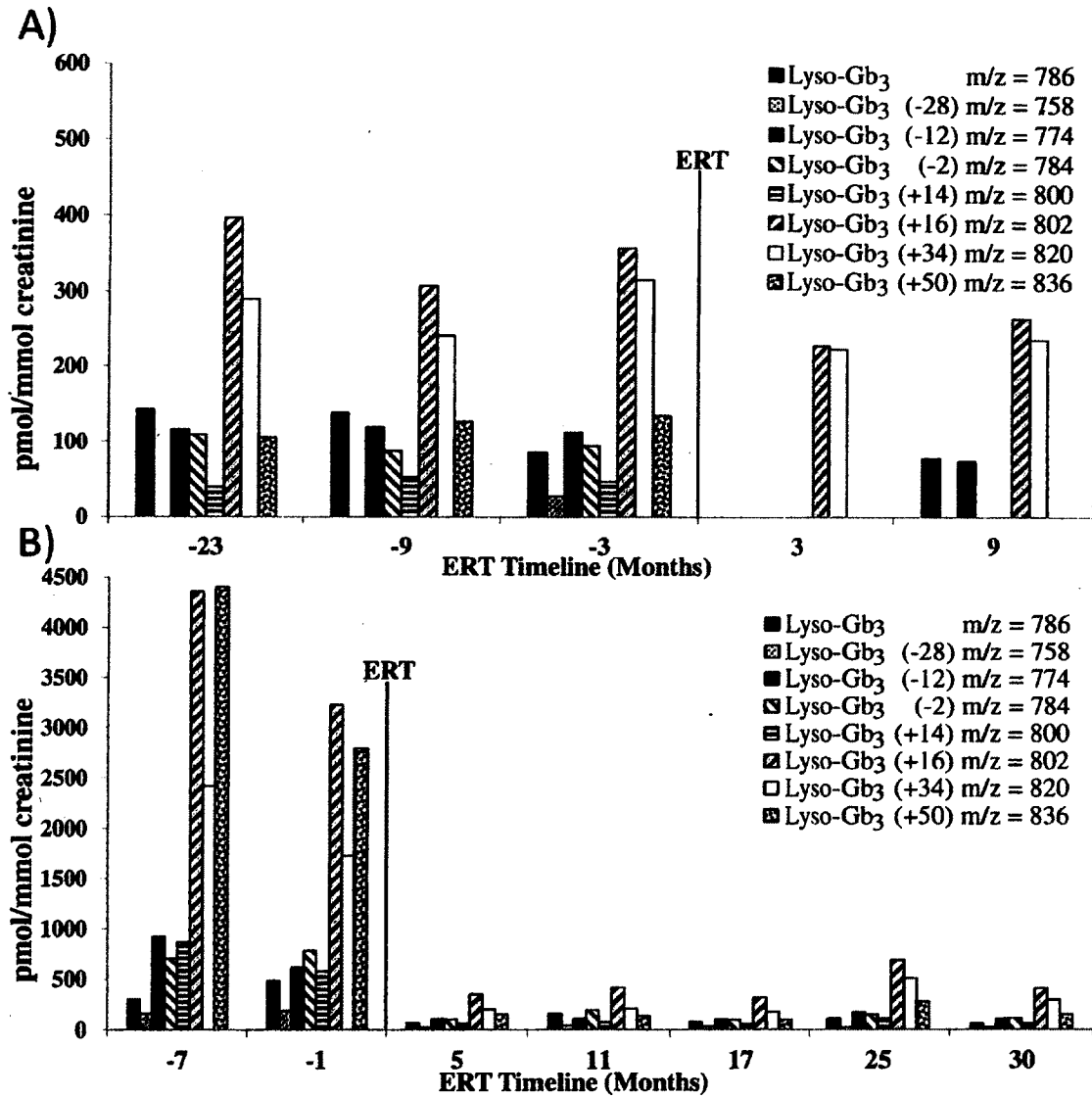


Figure 5. Concentration of lyso-Gb₃ and its analogues before and after ERT treatment: (A) Urine samples from a 35 year-old female Fabry patient heterozygous for a missense mutation; (B) Urine samples from a 35 year-old male Fabry patient hemizygous for a nonsense mutation. The vertical line corresponds to the beginning of ERT treatment. Concentrations were measured with the lyso-Gb₃ calibration curve.

The percentage distributions of urinary lyso-Gb₃ and its 7 analogues were evaluated for 23 untreated and 49 treated male Fabry patients (See Figure 6, Parts A and B) and also for 58 untreated female Fabry patients and 34 treated female Fabry patients separately (See Figure 6, Parts D and E). These results show that lyso-Gb₃ represents only a small fraction of all the analogues excreted in Fabry patient urine samples. The entire profile of molecules would appear to be more informative than the analysis of lyso-Gb₃ alone. Furthermore, using the lyso-Gb₃ urinary LC-MS/MS analysis without evaluating the other analogues might lead to false negative results since some patients do not excrete detectable lyso-Gb₃ levels, but excrete increased amounts of different analogues. This was observed in part C, where lyso-Gb₃ was undetected, but the lyso-Gb₃ (+50) analogue had a high percentage distribution of 42% (which is almost half of all excreted analogues). Moreover, despite slightly different recoveries and considering that similar mass spectrometry response factors are expected for lyso-Gb₃ and the analogues, it is reasonable to assume that three lyso-Gb₃ analogues (at *m/z* 802, 820, 836) are excreted in greater quantities than the others in Fabry patients. The percentage distribution of lyso-Gb₃ (+50) was noticeably reduced in treated male Fabry patient urine samples compared to untreated male Fabry patients, suggesting that this analogue might be more responsive to ERT than the other analogues. Figure 6 (Parts C and F) shows lyso-Gb₃ and its analogue distribution in urine samples from a 7 year-old untreated Fabry male (with the p.Ala143Pro, A143P mutation) and a 38 year-old untreated Fabry female (with the p.Gln321Arg, Q321R mutation). The comparison of these two diagrams illustrates well that lyso-Gb₃ and its analogue distributions may vary substantially among individuals. Our results also show that the percentage distributions of the lyso-Gb₃ analogues in Parts B (n=49) and E (n=34) are quite similar for Fabry treated males and treated females, respectively. Also, the percentage distributions of untreated Fabry females (Part D) are more similar to treated Fabry patients (Parts B and E) than the untreated males (Part A).

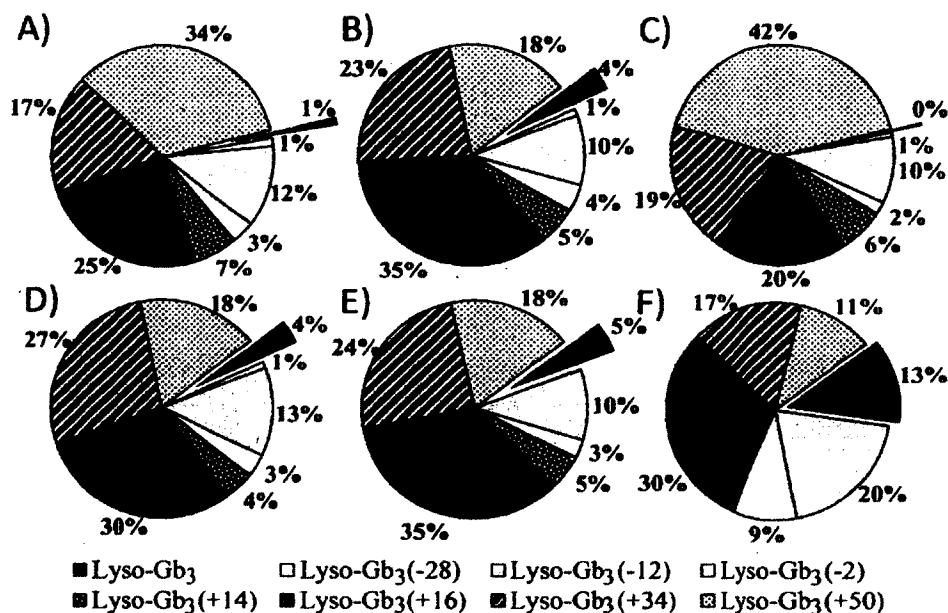


Figure 6. Distribution of lyso-Gb₃ and its analogues: (A) Urine samples from untreated male Fabry patients (n=23); (B) Urine samples from treated male Fabry patients (n=49); (C) Urine sample from a 7 year-old untreated Fabry male; (D) Urine samples from untreated female Fabry patients (n=58); (E) Urine samples from treated female Fabry patients (n=34); (F) Urine sample from a 38 year-old untreated Fabry female. Concentrations were measured with the lyso-Gb₃ calibration curve.

Correlations between urinary lyso-Gb₃ and related analogues and urinary Gb₃

The correlation between urinary Gb₃ excretion (expressed in $\mu\text{g}/\text{mmol}$ creatinine) and the excretion of lyso-Gb₃ analogues (expressed in pmol/mmol creatinine) was examined using the Spearman rank correlation coefficient in Fabry male and female urine samples (See Supporting Information Table S-5). Interestingly, for treated and untreated Fabry males (n=57), strong correlations ($p < 0.001$) between each individual analogue level and Gb₃ excretion were observed. For treated and untreated Fabry females (n=74), there were strong correlations ($p < 0.001$) between Gb₃ urinary excretion and analogues with m/z 758, 784, 820 and good correlations ($p < 0.05$) for analogues with m/z 774, 786, 800, and 802. However, there was no correlation between urinary Gb₃ excretion and the excretion of the analogue with m/z 836 for Fabry females ($p = 0.063$). This might be explained by the fact that female Fabry patients excrete reduced levels of all analogues, and that this m/z 836 analogue was also detected in relatively small concentration in control females.

Method selectivity

The results of the evaluation of the selectivity of the analytical method are presented in Table 3. Concentrations were not normalized to creatinine to allow comparison with LOD and LOQ methodologies. No traces of lyso-Gb₃ or lyso-Gb₃ analogues with *m/z* 758, 774, 784 and 800 were found in controls and very few controls excreted traces (below or slightly above LOQ) of analogues with *m/z* 802 and 820. The selectivity was therefore considered to be very good for these molecules. The majority of controls (53/94) excreted lyso-Gb₃ (+50) at a concentration above LOD. However, only 8 controls excreted lyso-Gb₃ (+50) at a concentration above LOQ. Three untreated Fabry males (n=23) and one untreated Fabry female (n=58) presented no traces of urinary lyso-Gb₃ nor its analogues. Two of these Fabry males had a p.Arg118Cys (R118C) mutation known to be associated with late-onset variants of the disease.² One Fabry male and the Fabry female had the p.Asn205Thr (N205T) and p.Arg363His (R363H) missense mutations, respectively. Unfortunately, no other information on these patient conditions was available. All the other patients (n=160) excreted at least one lyso-Gb₃-related analogue at a concentration above LOD. These results suggest, therefore, that evaluation of the global urinary biomarker profile, including Gb₃, lyso-Gb₃ and its analogues, is important in the evaluation of patients with Fabry disease.

Lyso-Gb ₃ and analogues	UFM N=23		CM N=39		UFF N=58		CF N=55	
	n	Mean (min-max) (pM)	n	Mean (min-max) (pM)	n	Mean (min-max) (pM)	n	Mean (min-max) (pM)
Lyso-Gb ₃	15	1351 (345-4340)	0	0	23	209 (158-1184)	0	0
Lyso-Gb ₃ (-28)	18	1091 (326-3819)	0	0	17	68 (128-424)	0	0
Lyso-Gb ₃ (-12)	19	8492 (193-30 792)	0	0	45	783 (202-3040)	0	0
Lyso-Gb ₃ (-2)	18	3267 (359-12 696)	0	0	28	185 (148-860)	0	0
Lyso-Gb ₃ (+14)	18	6576 (1378-35 339)	0	0	31	263 (146-1794)	0	0
Lyso-Gb ₃ (+16)	19	23 678 (544-96 041)	3	20 (220-350)	50	1688 (198-8170)	3	22 (223-729)
Lyso-Gb ₃ (+34)	19	17 663 (431-63 796)	3	20 (241-329)	52	1585 (88-6647)	4	20 (179-340)
Lyso-Gb ₃ (+50)	20	34 733 (313-137 048)	21	321 (278-1703)	52	1070 (271-5382)	32	345 (259-1883)

Table 3. Selectivity of the analytical method and diagnostic performance. Only patients or controls with urinary concentrations above LOD were included. N: total number of patients, n: number of patients excreting the corresponding analogue, min: minimum non zero value. UFM: untreated Fabry males, CM: control males, UFF: untreated Fabry females, CF: control females.

CONCLUSIONS

A methodology was devised for the relative multiplex quantification analysis of lyso-Gb₃ and 7 structurally related-analogues. The internal standard was prepared by a user-friendly method, necessitating material commonly available in laboratories. This IS preparation did not require complex synthesis by experts in organic chemistry. The methodology allowed the comparison of urinary excretion levels between 4 different Fabry patient groups. We found that all urinary analogue levels were reduced after ERT in males, supporting their potential use for monitoring current and future therapies. Urine samples from a Fabry female patient taken before and after ERT treatment showed that three analogues (with *m/z* 784, 800, 836) were specifically reduced. Since Fabry females, generally exhibiting milder symptoms, excreted lower concentrations of analogues compared to their male counterparts, the results of our studies suggest that the urinary excretion of lyso-Gb₃ analogues might be related to disease severity and symptoms. Also, lyso-Gb₃ represents only a small fraction of all the analogues excreted in Fabry patient urine samples. Therefore, the entire profile of molecules would appear to be more informative than the analysis of lyso-Gb₃ alone. Moreover, the urinary analogue distribution seemed to vary between individuals, suggesting that some analogues might more specifically reflect the clinical manifestations and progression of the disease. Future investigations are needed to examine these possibilities.

ACKNOWLEDGMENT

This research was funded by a grant-in-aid of research from Genzyme and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). We are grateful to the Stars Foundation/Fondation des étoiles for providing grants in support of this study. We would like to acknowledge Waters Corporation for their continued scientific support and partnership. We would like to thank Dr Joe T. R. Clarke for his expertise and insights on Fabry disease. We thank Félix O. Dupont, Kaye LeMoine and colleagues in the Canadian Fabry Disease Initiative (CFDI) for their cooperation. We are grateful to all Fabry patients for their cooperation because without them this study would not have been possible.

ASSOCIATED CONTENT

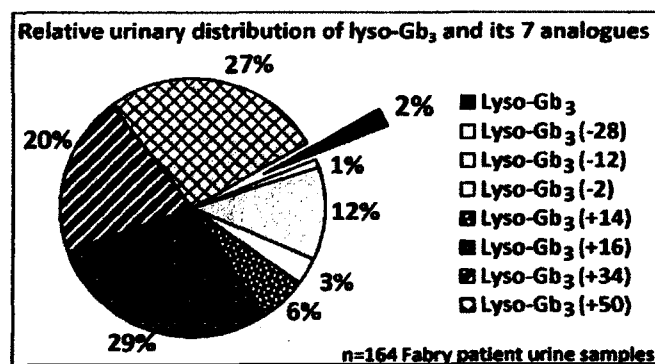
Supporting Information. Additional information as noted in text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Fax : +1-819-564-5217. E-mail: christiane.auray-blais@usherbrooke.ca

For TOC only



REFERENCES

- 1 Meikle, P. J.; Hopwood, J. J.; Clague, A. E.; Carey, W. F. *JAMA*. 1999, 281, 249-254.
- 2 Spada, M.; Pagliardini, S.; Yasuda, M.; Tukel, T.; Thiagarajan, G.; Sakuraba, H.; Ponzzone, A.; Desnick, R. J. *Am.J.Hum.Genet.* 2006, 79, 31-40.
- 3 Brady, R. O.; Gal, A. E.; Bradley, R. M.; Martensson, E.; Warshaw, A. L.; Laster, L. *N.Engl.J.Med.* 1967, 276, 1163-1167.
- 4 Sweeley, C. C.; Kliensky, B. *J.Biol.Chem.* 1963, 238, 3148-3150.
- 5 Vedder, A. C.; Linthorst, G. E.; van Breemen, M. J.; Groener, J. E.; Bemelman, F. J.; Strijland, A.; Mannens, M. M.; Aerts, J. M.; Hollak, C. E. *J.Inherit.Metab.Dis.* 2007, 30, 68-78.
- 6 Shen, J. S.; Meng, X. L.; Moore, D. F.; Quirk, J. M.; Shayman, J. A.; Schiffmann, R.; Kaneski, C. R. *Mol.Genet.Metab.* 2008, 95, 163-168.
- 7 Park, S.; Kim, J. A.; Joo, K. Y.; Choi, S.; Choi, E. N.; Shin, J. A.; Han, K. H.; Jung, S. C.; Suh, S. H. *Cardiovasc.Res.* 2011, 89, 290-299.
- 8 Biancini, G. B.; Vanzin, C. S.; Rodrigues, D. B.; Deon, M.; Ribas, G. S.; Barschak, A. G.; Manfredini, V.; Netto, C. B.; Jardim, L. B.; Giugliani, R.; Vargas, C. R. *Biochim.Biophys.Acta.* 2012, 1822, 226-232.
- 9 Thurberg, B. L.; Rennke, H.; Colvin, R. B.; Dikman, S.; Gordon, R. E.; Collins, A. B.; Desnick, R. J.; O'Callaghan, M. *Kidney Int.* 2002, 62, 1933-1946.
- 10 Aerts, J. M.; Groener, J. E.; Kuiper, S.; Donker-Koopman, W. E.; Strijland, A.; Ottenhoff, R.; van Roomen, C.; Mirzaian, M.; Wijburg, F. A.; Linthorst, G. E.; Vedder, A. C.; Rombach, S. M.; Cox-Brinkman, J.; Somerharju, P.; Boot, R. G.; Hollak, C. E.; Brady, R. O.; Poorthuis, B. J. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2008, 105, 2812-2817.
- 11 Auray-Blais, C.; Ntwari, A.; Clarke, J. T.; Warnock, D. G.; Oliveira, J. P.; Young, S. P.; Millington, D. S.; Bichet, D. G.; Sirrs, S.; West, M. L.; Casey, R.; Hwu, W. L.; Keutzer, J. M.; Zhang, X. K.; Gagnon, R. *Clin.Chim.Acta.* 2010, 411, 1906-1914.
- 12 Togawa, T.; Kawashima, I.; Kodama, T.; Tsukimura, T.; Suzuki, T.; Fukushige, T.; Kanekura, T.; Sakuraba, H. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2010, 399, 716-720.
- 13 Rombach, S. M.; van den Bogaard, B.; de Groot, E.; Groener, J. E.; Poorthuis, B. J.; Linthorst, G. E.; van den Born, B. J.; Hollak, C. E.; Aerts, J. M. *Hypertension.* 2012, 60, 998-1005.

- 14 Namdar, M.; Gebhard, C.; Studiger, R.; Shi, Y.; Mocharla, P.; Schmied, C.; Brugada, P.; Luscher, T. F.; Camici, G. G. *PLoS One*. **2012**, *7*, e36373.
- 15 Boutin, M.; Gagnon, R.; Lavoie, P.; Auray-Blais, C. *Clin.Chim.Acta*. **2012**, *414*, 273-280
- 16 Ries, M.; Ramaswami, U.; Parini, R.; Lindblad, B.; Whybra, C.; Willers, I.; Gal, A.; Beck, M. *Eur.J.Pediatr*. **2003**, *162*, 767-772.
- 17 Borgwardt, L.; Feldt-Rasmussen, U.; Rasmussen, A.; Ballegaard, M.; Meldgaard Lund, A. *Clin.Genet*. **2012**, DOI: 10.1111/j.1399-0004.2012.01947.x
- 18 Clarke, J. T. *Ann.Intern.Med*. **2007**, *146*, 425-433.
- 19 Germain, D. P. *Orphanet J.Rare Dis*. **2010**, *5*, 30.
- 20 MacDermot, K. D.; Holmes, A.; Miners, A. H. *J.Med.Genet*. **2001**, *38*, 750-760.
- 21 MacDermot, K. D.; Holmes, A.; Miners, A. H. *J.Med.Genet*. **2001**, *38*, 769-775.
- 22 Whybra, C.; Kampmann, C.; Willers, I.; Davies, J.; Winchester, B.; Kriegsmann, J.; Bruhl, K.; Gal, A.; Bunge, S.; Beck, M. *J.Inherit.Metab.Dis*. **2001**, *24*, 715-724.
- 23 Giacomini, P. S.; Shannon, P. T.; Clarke, J. T.; Jaigobin, C. *Can.J.Neurol.Sci*. **2004**, *31*, 112-114.
- 24 Maier, E. M.; Osterrieder, S.; Whybra, C.; Ries, M.; Gal, A.; Beck, M.; Roscher, A. A.; Muntau, A. C. *Acta Paediatr.Suppl*. **2006**, *95*, 30-38.
- 25 Verocai, F.; Clarke, J. T.; Iwanochko, R. M. *J.Inherit.Metab.Dis*. **2010**, DOI: 10.1007/s10545-010-9194-3.
- 26 Deegan, P. B.; Baehner, A. F.; Barba Romero, M. A.; Hughes, D. A.; Kampmann, C.; Beck, M.; European FOS Investigators. *J.Med.Genet*. **2006**, *43*, 347-352.
- 27 Bouwman, M. G.; Rombach, S. M.; Schenk, E.; Sweeb, A.; Wijburg, F. A.; Hollak, C. E.; Linthorst, G. E. *J.Inherit.Metab.Dis*. **2012**, *35*, 891-898.
- 28 Schiffmann, R.; Kopp, J. B.; Austin, H. A.,3rd; Sabnis, S.; Moore, D. F.; Weibel, T.; Balow, J. E.; Brady, R. O. *JAMA*. **2001**, *285*, 2743-2749.
- 29 Pisani, A.; Visciano, B.; Roux, G. D.; Sabbatini, M.; Porto, C.; Parenti, G.; Imbriaco, M. *Mol.Genet.Metab*. **2012**, *107*, 267-275
- 30 Keating, G. M. *BioDrugs*. **2012**, *26*, 335-354.

- 31 Kampmann, C.; Kalkum, G.; Beck, M.; Whybra, C. *Clin.Genet.* **2012**, DOI:10.1111/j.1399-0004.2012.01916.x.
- 32 Motwani, M.; Banypersad, S.; Woolfson, P.; Waldek, S. *Mol.Genet.Metab.* **2012**, *107*, 197-202.
- 33 Marshall, J.; Ashe, K. M.; Bangari, D.; McEachern, K.; Chuang, W. L.; Pacheco, J.; Copeland, D. P.; Desnick, R. J.; Shayman, J. A.; Scheule, R. K.; Cheng, S. H. *PLoS One.* **2010**, *5*, e15033.
- 34 Ishii, S. *Proc.Jpn.Acad.Ser.B.Phys.Biol.Sci.* **2012**, *88*, 18-30.
- 35 Lee, C. J.; Fan, X.; Guo, X.; Medin, J. A. *J.Cardiol.* **2011**, *57*, 115-122.
- 36 Cox, T. M. In *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS* Mehta,A., M. Beck, G. Sunder-Plassmann; Oxford PharmaGenesis:Oxford, 2006;
- 37 Auray-Blais, C.; Cyr, D.; Ntwari, A.; West, M. L.; Cox-Brinkman, J.; Bichet, D. G.; Germain, D. P.; Laframboise, R.; Melancon, S. B.; Stockley, T.; Clarke, J. T.; Drouin, R. *Mol.Genet.Metab.* **2008**, *93*, 331-340.
- 38 Young, E.; Mills, K.; Morris, P.; Vellodi, A.; Lee, P.; Waldek, S.; Winchester, B. *Acta Paediatr.Suppl.* **2005**, *94*, 51-4; discussion 37-8.
- 39 Rombach, S. M.; Dekker, N.; Bouwman, M. G.; Linthorst, G. E.; Zwinderman, A. H.; Wijburg, F. A.; Kuiper, S.; Vd Bergh Weerman, M. A.; Groener, J. E.; Poorthuis, B. J.; Hollak, C. E.; Aerts, J. M. *Biochim.Biophys.Acta.* **2010**, *1802*, 741-748.
- 40 Auray-Blais, C.; Boutin, M.; Gagnon, R.; Dupont, F. O.; Lavoie, P.; Clarke, J. T. *Anal.Chem.* **2012**, *84*, 2745-2753.
- 41 Huang, J. T.; Leweke, F. M.; Oxley, D.; Wang, L.; Harris, N.; Koethe, D.; Gerth, C. W.; Nolden, B. M.; Gross, S.; Schreiber, D.; Reed, B.; Bahn, S. *PLoS Med.* **2006**, *3*, e428.
- 42 Ackermann, B. L.; Hale, J. E.; Duffin, K. L. *Curr.Drug Metab.* **2006**, *7*, 525-539.
- 43 Esther, C. R.,Jr; Boysen, G.; Olsen, B. M.; Collins, L. B.; Ghio, A. J.; Swenberg, J. W.; Boucher, R. C. *Am.J.Physiol.Lung Cell.Mol.Physiol.* **2009**, *296*, L987-93.
- 44 Liu, R.; Bi, K.; Jia, Y.; Wang, Q.; Yin, R.; Li, Q. *J.Mass Spectrom.* **2012**, *47*, 1341-1346.
- 45 Sirrs, S. *Mol.Genet.Metab.* **2011**, *102*, 4-5.
- 46 Winchester, B. and Young, E. In *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS* Mehta,A., M. Beck, G. Sunder-Plassmann; Oxford PharmaGenesis:Oxford, 2006;

- 47 Whybra, C., Bahner, F. and Baron, K. In *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS* Mehta, A., M. Beck, G. Sunder-Plassmann; Oxford PharmaGenesis:Oxford, 2006;
- 48 Kruger, R.; Tholey, A.; Jakoby, T.; Vogelsberger, R.; Monnikes, R.; Rossmann, H.; Beck, M.; Lackner, K. J. *J.Chromatogr.B.Analyt Technol.Biomed.Life.Sci.* **2012**, 883-884, 128-135.
- 49 Auray-Blais, C.; Millington, D. S.; Barr, C.; Young, S. P.; Mills, K.; Clarke, J. T. *Mol.Genet.Metab.* **2009**, 97, 237.
- 50 Barr, C.; Clarke, J. T.; Ntwari, A.; Drouin, R.; Auray-Blais, C. *Mol.Genet.Metab.* **2009**, 97, 278-283.
- 51 Van Eeckhaut, A.; Lanckmans, K.; Sarre, S.; Smolders, I.; Michotte, Y. *J.Chromatogr.B.Analyt Technol.Biomed.Life.Sci.* **2009**, 877, 2198-2207.
- 52 Durant, B.; Forni, S.; Sweetman, L.; Brignol, N.; Meng, X. L.; Benjamin, E. R.; Schiffmann, R.; Shen, J. S. *J.Lipid Res.* **2011**, 52, 1742-1746.
- 53 Linthorst, G. E.; Vedder, A. C.; Aerts, J. M.; Hollak, C. E. *Clin.Chim.Acta.* **2005**, 353, 201-203.

Supporting Information

Page S-1

Multiplex Analysis of Novel Urinary Lyso-Gb₃-Related Biomarkers for Fabry Disease by Tandem Mass Spectrometry

Pamela Lavoie, Michel Boutin, Christiane Auray-Blais

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

Table of contents

- Table S-1** Interday and intraday precision of urinary lyso-Gb₃ and its analogues. Urine samples from an untreated Fabry heterozygote and from an untreated Fabry hemizygote were used as low (L) and high (H) quality controls (QCs).
- Table S-2** Interday and intraday precision and accuracy in control urine samples spiked at low (L) (1 500 pM), medium (M) (11 000 pM) and high (H) (24 000 pM) concentrations of lyso-Gb₃.
- Table S-3** Recovery, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for lyso-Gb₃ and its 7 analogues.
- Table S-4** Supplementary Table presents the patients age, gender, mutation and measured urinary concentration of lyso-Gb₃ and its 7 analogues in Fabry patient and control urine samples analyzed in the study.
- Table S-5** Statistical analysis of Gb₃ and lyso-Gb₃ analogue excretion in male and female urine samples using the Spearman rank correlation.

Table S-1. Interday and intraday precision of urinary lyso-Gb₃ and its analogues. Urine samples from an untreated Fabry heterozygote and from an untreated Fabry hemizygote were used as low (L) and high (H) quality controls (QCs). Concentrations were measured with the lyso-Gb₃ calibration curve.

Lyso-Gb ₃ + analogues	Concentration (pM)		Precision (% CV)			
			Intraday n=4		Interday n=5	
	L QC	H QC	L QC	H QC	L QC	H QC
Lyso-Gb ₃	1143	1845	13.0	5.0	17.4	12.5
Lyso-Gb ₃ (-28)	357	1051	11.4	2.2	12.5	13.0
Lyso-Gb ₃ (-12)	1532	4759	4.5	1.7	12.2	6.9
Lyso-Gb ₃ (-2)	725	3780	4.4	2.0	8.2	7.0
Lyso-Gb ₃ (+14)	692	3753	8.3	4.4	5.2	8.0
Lyso-Gb ₃ (+16)	4574	19031	4.3	2.7	9.9	6.9
Lyso-Gb ₃ (+34)	4513	13234	3.7	2.7	12.4	9.2
Lyso-Gb ₃ (+50)	1639	23620	7.2	1.0	20.1	7.2

Table S-2 Interday and intraday precision and accuracy in control urine samples spiked at low (L) (1 500 pM), medium (M) (11 000 pM) and high (H) (24 000 pM) concentrations of lyso-Gb₃.

Concentration (pM)	Lyso-Gb ₃		
	L QC 1500	M QC 11 000	H QC 24 000
Precision (% CV)			
Intraday n=4	6.2	2.8	1.6
Interday n=5	2.9	3.3	2.7
Accuracy (% BIAS)			
Intraday n=4	2.4	2.6	7.9
Interday n=5	4.1	0.5	4.4

Table S-3 Recovery, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for lyso-Gb₃ and its 7 analogues. Concentrations were measured with the lyso-Gb₃ calibration curve.

Lyso-Gb ₃ and analogues	Recovery (%)	LOD (pM)	LOQ (pM)
Lyso-Gb ₃	81	143	477
Lyso-Gb ₃ (-28)	86	115	384
Lyso-Gb ₃ (-12)	98	140	466
Lyso-Gb ₃ (-2)	86	124	412
Lyso-Gb ₃ (+14)	91	132	440
Lyso-Gb ₃ (+16)	97	192	659
Lyso-Gb ₃ (+34)	87	85	282
Lyso-Gb ₃ (+50)	89	247	824

Table S-4. Supplementary data on the analysis of urine samples divided in 6 sample groups: A) Untreated Fabry males; B) Treated Fabry males; C) Control males; D) Untreated Fabry females; E) Treated Fabry females; F) Control females

A) Untreated Fabry males											
Sample	Patient mutation	Patient Age years	Creatinine mM	Lyso-Gb ₃ pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₃ (-28) pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₃ (-12) pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₃ (-2) pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₃ (+14) pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₃ (+16) pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₃ (+34) pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₃ (+50) pmol/mmol creat
1	p.Arg112cys	1	0.71	nd	460	12968	506	2079	9710	3901	4980
2	p.Gln107x	3	2.70	128	234	2353	582	1535	5441	5023	13990
3	N215S	3	1.68	nd	nd	115	nd	nd	nd	nd	186
4	N205T	6	0.78	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
5	A143P	6	8.99	272	230	2903	1124	3117	9470	7094	12777
6	A143P	7	3.53	163	203	3167	594	2078	6441	6157	13599
7	P205T	7	7.50	nd	111	747	236	448	1793	1228	1807
8	A143P	9	13.05	311	138	1490	449	1414	3928	4242	8666
9	R49S	10	13.81	314	277	2230	919	2559	6954	4040	9924
10	A143P	12	9.12	223	365	2371	1106	1446	4830	3014	8336
11	A143P	14	6.57	nd	203	819	223	210	1026	597	287
12	R363H	17	12.38	nd	nd	nd	nd	nd	44	35	77
13	R220X	18	21.86	106	112	615	141	262	1148	1197	2106
14	C.1042G>C	21	12.52	82	56	303	207	233	1377	1412	2269
15	C.961C>G	24	23.09	151	39	248	156	261	1550	898	1956
16	L106fs	26	4.38	648	329	1396	1042	1016	5412	3182	6036
17	A348P	34	13.11	133	102	430	277	396	1831	1110	1763
18	R342X	35	2.81	488	188	618	784	579	3231	1733	2800
19	A348P	35	17.71	115	75	696	193	316	1815	1324	2067
20	C.1042G>C	39	8.74	212	81	602	361	429	2330	1992	2890
21	A143P	40	5.69	105	153	953	504	575	2750	2355	2277
22	pR118C	48	5.78	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
23	pR118C	60	3.88	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Mean		21	8.71	150	146	1523	409	824	3090	2197	4295
Median		17	7.50	115	112	696	277	429	1831	1412	2269
Min		1	0.71	0	0	0	0	0	0	0	0
Max		60	23.09	648	460	12968	1124	3117	9710	7094	13990

B) Treated Fabry males												
Sample	Patient mutation	Patient Age years	Creatinine mM	Lyso-Gb ₃ pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₃ (-28) pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₃ (-12) pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₃ (-2) pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₃ (+14) pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₃ (+16) pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₃ (+34) pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₃ (+50) pmol/mmol creat	
1	T950C	4	8.28	nd	nd	375	nd	161	514	282	393	
2	A143T	8	2.29	nd	nd	216	nd	75	556	608	259	
3	A143T	9	18.67	nd	36	391	81	184	678	623	318	
4	pC94S	9	4.11	nd	nd	188	nd	208	1106	575	1056	
5	R49S	14	12.00	nd	nd	642	nd	296	1678	529	558	
6	A143P	21	5.03	nd	nd	64	36	30	170	337	163	
7	612G>A	24	6.42	174	120	355	268	95	759	468	398	
8	dupEx2.4	24	6.65	nd	nd	83	nd	58	266	363	243	
9	dup.Ex2.4	25	3.36	nd	nd	107	nd	90	215	102	188	
10	pdel239I	26	8.06	45	nd	156	nd	62	421	186	259	
11	pR220X	26	8.78	49	nd	73	nd	79	349	278	187	
12	612G>A	27	6.22	114	nd	113	45	23	241	202	127	
13	A143P	28	8.21	118	25	389	93	141	651	618	434	
14	L129P	29	14.14	282	nd	362	97	138	974	495	366	
15	A143P	31	9.64	119	27	290	121	184	1105	903	561	
16	A143P	31	3.71	433	55	703	305	457	3337	1660	1152	
17	A143P	32	9.76	181	23	475	203	452	2983	2464	1401	
18	W236X	33	8.97	156	128	701	243	327	1752	974	522	
19	C.1241T>C	33	5.20	253	150	565	347	244	1867	1071	509	
20	C.1042G>C	36	10.06	37	24	247	44	78	318	215	122	
21	C.1042G>C	36	21.60	104	26	109	68	84	608	329	201	
22	C.1042G>C	37	16.19	55	10	175	52	84	645	578	350	
23	R342X	37	6.41	110	26	174	152	113	690	510	281	
24	C.35_47del	38	11.83	28	nd	42	18	29	219	176	101	
25	A143P	38	2.92	155	nd	nd	nd	nd	nd	110	nd	
26	A143P	41	3.94	483	nd	462	365	345	2143	1488	1190	
27	W236X	41	4.09	nd	nd	273	93	176	1598	642	467	
28	c.369+5G>T	42	6.68	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
29	c.962A>G	43	8.49	17	24	150	51	27	268	236	136	
30	R227X	43	3.44	nd	nd	119	99	nd	294	264	141	
31	c.427G>C	47	3.89	64	nd	131	56	45	319	313	213	
32	A143P	48	4.30	148	60	743	202	323	2335	1910	1287	
33	A143P	48	6.59	85	68	336	59	155	1085	792	558	
34	A143P	49	10.72	57	19	259	52	77	472	631	613	
35	A143P	49	3.26	93	nd	272	120	150	855	611	517	
36	A143P	52	2.85	nd	nd	69	nd	nd	140	269	293	
37	717delAA	52	4.23	83	77	269	183	177	1107	661	469	
38	Q221X	53	6.22	nd	nd	115	59	67	424	385	264	
39	C.961C>G	53	4.42	523	28	381	230	244	1756	974	1100	
40	C.707G>T	53	8.95	17	nd	67	nd	30	198	260	369	
41	L414S	54	9.40	54	19	427	nd	255	1433	678	580	
42	R227X	55	6.94	nd	nd	186	nd	108	645	290	224	
43	A143P	56	3.16	215	97	631	311	352	2393	1757	1068	
44	C950T>C	57	3.33	228	nd	252	128	82	902	345	301	
45	A143P	57	2.78	178	55	203	244	153	1216	1099	819	
46	A143P	60	3.57	65	nd	308	74	54	348	758	1007	
47	G147RR	60	7.05	192	91	352	334	277	1277	506	385	
48	C.833dupA	61	9.04	275	117	1290	546	999	5921	2654	2798	
49	A143P	63	2.41	309	80	1105	576	545	3809	1997	1459	
Mean		39	7.11	112	28	314	122	170	1083	697	540	
Median		38	6.42	65	0	259	68	113	678	529	385	
Min		4	2.29	0	0	0	0	0	0	0	0	
Max		63	21.60	523	150	1290	576	999	5921	2654	2798	

C) Control males												
Sample	Patient mutation	Patient Age years	Creatinine mM	Lyso-Gb ₂ pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₂ (-28) pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₂ (-12) pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₂ (-2) pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₂ (+14) pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₂ (+16) pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₂ (+34) pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₂ (+50) pmol/mmol creat	
1	N/A	2	2.20	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
2	N/A	3	0.92	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
3	N/A	3	7.28	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
4	N/A	5	3.76	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
5	N/A	5	5.60	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
6	N/A	6	10.73	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	33	
7	N/A	7	12.07	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	48	
8	N/A	7	7.60	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
9	N/A	8	10.00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	88	
10	N/A	9	6.77	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	46	
11	N/A	11	2.51	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
12	N/A	11	6.60	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	86	
13	N/A	12	12.00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	28	
14	N/A	12	9.10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	75	
15	N/A	12	6.06	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
16	N/A	12	7.60	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
17	N/A	14	13.90	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	27	
18	N/A	14	9.30	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	55	
19	N/A	14	10.00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	34	
20	N/A	14	17.97	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	42	
21	N/A	14	13.00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	44	
22	N/A	14	10.10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
23	N/A	15	12.21	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
24	N/A	18	27.03	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
25	N/A	21	25.91	nd	nd	nd	nd	nd	nd	9	24	
26	N/A	22	10.81	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
27	N/A	24	6.53	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
28	N/A	30	9.67	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
29	N/A	32	11.70	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	29	
30	N/A	34	15.87	nd	nd	nd	nd	nd	17	nd	37	
31	N/A	37	10.10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	33	
32	N/A	42	7.80	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
33	N/A	44	5.10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
34	N/A	47	12.10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	52	
35	N/A	48	13.13	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	76	
36	N/A	53	15.40	nd	nd	nd	nd	nd	14	21	48	
37	N/A	54	1.90	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
38	N/A	57	14.50	nd	nd	nd	nd	nd	nd	17	19	
39	N/A	57	21.30	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	80	
Mean		22	10	0	0	0	0	0	1	1	26	
Median		14	10	0	0	0	0	0	0	0	24	
Min		2	0.92	0	0	0	0	0	0	0	0	
Max		57	27	0	0	0	0	0	27	21	88	

D) Untreated Fabry females												
Sample	Patient mutation	Patient Age years	Creatinine mol	Lyso-Gb ₃ pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₃ (-28) pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₃ (-12) pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₃ (-2) pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₃ (+14) pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₃ (+16) pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₃ (+34) pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₃ (+50) pmol/mmol creat	
1	W209X	4	8.36	nd	nd	53	nd	nd	nd	183	148	
2	A143P	6	7.73	nd	nd	nd	nd	nd	362	nd	457	
3	R301X	7	0.88	nd	nd	nd	nd	nd	nd	194	nd	
4	W209X	7	4.27	nd	nd	87	nd	26	168	151	nd	
5	A143P	8	4.76	nd	nd	233	nd	126	371	316	152	
6	R495	8	10.28	nd	nd	57	nd	nd	nd	nd	128	
7	A143P	11	5.16	nd	nd	190	nd	28	226	165	134	
8	R495	11	10.44	nd	nd	40	nd	nd	39	nd	80	
9	A143P	11	8.27	nd	nd	nd	nd	nd	18	nd	41	
10	A143P	12	12.54	nd	nd	84	nd	25	139	231	183	
11	A143P	12	13.69	nd	nd	nd	nd	nd	15	12	26	
12	c.80203-802-2 del CA	12	7.66	nd	nd	121	nd	nd	196	196	103	
13	C369TSG>T	13	10.46	nd	nd	nd	nd	nd	nd	29	69	
14	N125S	14	7.78	nd	nd	nd	nd	nd	22	46	42	
15	N125S	16	17.93	nd	nd	20	nd	nd	34	47	45	
16	C369TSG>T	16	7.42	nd	nd	nd	nd	nd	27	64	77	
17	R220X	17	35.07	nd	6	59	14	18	109	74	43	
18	g.8950 A>C	18	13.01	42	nd	106	22	28	189	159	88	
19	R220X	21	5.19	49	nd	98	nd	nd	171	147	69	
20	g8816.10263del	21	10.46	78	35	242	72	91	443	376	192	
21	A143P	26	15.07	nd	nd	147	nd	44	300	431	196	
22	Q321E	26	3.75	nd	nd	85	nd	nd	165	113	nd	
23	L414S	28	16.04	71	22	95	45	43	285	281	102	
24	A143P	29	18.00	66	20	100	39	47	178	242	134	
25	P293T	29	18.70	28	14	84	18	25	115	131	93	
26	C317_327del	30	5.42	nd	38	122	50	50	242	219	76	
27	C.877C>A	32	12.26	nd	nd	23	nd	12	72	88	36	
28	A143P	35	6.09	54	45	439	141	245	1342	1092	884	
29	A348P	36	3.13	nd	nd	nd	nd	nd	nd	81	nd	
30	A143P	38	9.03	81	22	71	27	27	254	211	165	
31	A143P	38	5.86	109	72	285	99	81	463	660	314	
32	A143P	38	3.18	nd	nd	nd	nd	nd	179	272	102	
33	Q321R	38	5.51	121	nd	186	88	nd	288	157	103	
34	R363H	40	9.37	nd	nd	nd	nd	nd	nd	36	45	
35	c.195-7547>7del	42	5.86	62	nd	189	68	90	390	298	231	
36	A143P	42	8.18	145	nd	165	40	61	355	354	267	
37	R227Q	42	5.30	59	nd	178	64	83	302	397	156	
38	C.1042G>C	43	17.68	nd	nd	23	10	nd	51	51	65	
39	c.401A>C	46	3.91	nd	nd	nd	nd	nd	nd	23	nd	
40	R220X	46	6.63	nd	30	85	32	nd	133	132	73	
41	A143P	46	3.27	48	nd	220	125	61	625	369	237	
42	P293T	46	16.46	25	18	86	17	14	84	108	57	
43	A143P	50	6.96	51	nd	136	39	89	433	554	218	
44	G12G>A	50	14.19	16	nd	97	28	43	213	129	79	
45	C.961C>G	50	2.38	161	nd	134	80	nd	436	286	166	
46	C.1042G>C	51	14.30	52	9	51	14	33	230	218	100	
47	g.8950 A>C	52	9.86	nd	16	53	25	nd	103	101	47	
48	L414S	53	4.56	86	28	113	95	48	358	316	135	
49	G9073del3	53	9.00	47	7	60	nd	23	126	102	96	
50	P293T	54	15.28	22	12	71	14	20	152	199	88	
51	A143P	55	1.14	101	nd	176	nd	nd	472	374	237	
52	G9073del3	56	18.10	nd	9	27	nd	12	58	33	54	
53	pC94S	57	7.61	nd	nd	400	67	236	991	498	468	
54	pC94S	60	3.87	nd	nd	nd	nd	nd	226	nd	185	
55	A143P	61	4.80	nd	nd	287	55	83	436	400	215	
56	R363H	62	1.46	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
57	A143P	70	3.68	nd	nd	90	40	65	245	231	107	
58	C.1042G>C	71	7.19	nd	nd	41	nd	nd	129	144	66	
Mean		34	9.04	27	7	98	25	32	224	202	132	
Median		37	7.70	0	0	85	0	13	174	158	98	
Min		4	0.88	0	0	0	0	0	0	0	0	
Max		71	35.07	161	72	439	141	245	1342	1092	884	

E) Treated Fabry females												
Sample	Patient mutation	Patient Age years	Creatinine µmol/l	Lyso-Gb ₃ pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₃ (-28) pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₃ (-12) pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₃ (-2) pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₃ (+14) pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₃ (+16) pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₃ (+34) pmol/mmol creat	Lyso-Gb ₃ (+50) pmol/mmol creat	
1	W209X	10	4.56	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	74	
2	N298H	11	5.77	nd	nd	75	nd	35	250	288	168	
3	A143P	22	9.92	44	nd	35	nd	25	90	102	110	
4	Q221X	24	8.09	nd	nd	63	nd	nd	184	117	101	
5	R227X	31	5.92	96	nd	127	nd	72	145	125	80	
6	C.548-1G>A	34	13.25	59	22	44	43	31	232	168	93	
7	Q283X	39	2.40	nd	nd	188	nd	nd	nd	nd	165	
8	A143P	39	0.71	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
9	A143P	41	1.05	239	nd	319	218	259	1138	699	490	
10	pR220X	42	4.27	nd	nd	nd	nd	nd	149	140	103	
11	C.1042G>C	46	20.55	37	nd	52	19	13	143	150	74	
12	A143P	46	3.37	nd	nd	109	nd	89	270	201	185	
13	A143P	47	4.24	41	nd	67	48	63	284	210	114	
14	Q321R	49	4.58	42	nd	91	98	73	460	187	194	
15	c.1024C>T	51	1.40	197	nd	nd	nd	nd	195	90	nd	
16	A143P	51	1.77	nd	nd	nd	nd	nd	226	107	nd	
17	c.401A>C	51	6.16	nd	nd	90	nd	31	169	140	128	
18	pR220X	52	8.92	nd	nd	nd	nd	nd	134	119	91	
19	C.1241T>C	53	1.56	nd	nd	nd	nd	nd	228	224	nd	
20	g.8950A>C	54	13.14	19	nd	49	nd	14	124	124	86	
21	pdel239I	54	3.48	104	nd	76	nd	nd	243	124	193	
22	c.878C>T	55	1.53	nd	nd	nd	nd	nd	174	99	nd	
23	A143P	56	5.40	nd	nd	190	67	nd	409	237	155	
24	c.334C>T	56	2.87	68	nd	nd	nd	nd	nd	79	nd	
25	A143P	58	10.00	nd	nd	129	35	50	298	206	110	
26	A143P	59	4.23	53	nd	249	58	275	1296	722	556	
27	C.1025G>A	61	7.50	nd	nd	nd	nd	nd	nd	56	50	
28	A143P	62	5.42	nd	nd	nd	nd	nd	78	59	67	
29	A143P	62	10.16	nd	nd	151	24	46	198	144	154	
30	C.877C>A	65	12.76	39	nd	112	nd	nd	162	321	309	
31	W236X	67	9.49	31	nd	66	nd	64	234	125	82	
32	A143P	68	1.85	nd	nd	nd	nd	nd	162	84	nd	
33	A143P	69	7.15	nd	nd	nd	nd	nd	42	32	46	
34	c.962A>G	72	5.24	nd	nd	114	nd	29	196	140	118	
Mean		49	6.14	31	1	70	18	34	233	165	121	
Median		51	5.32	0	0	57	0	0	179	125	97	
Min		10	0.71	0	0	0	0	0	0	0	0	
Max		72	20.55	239	22	319	218	275	1296	722	556	

F) Control females												
Sample	Patient mutation	Patient Age years	Creatinine μmol/l	Lyso-Gb ₂	Lyso-Gb ₂ (-28)	Lyso-Gb ₂ (-12)	Lyso-Gb ₂ (-2)	Lyso-Gb ₂ (+14)	Lyso-Gb ₂ (+16)	Lyso-Gb ₂ (+34)	Lyso-Gb ₂ (+50)	
				pmol/μmol creat	pmol/μmol creat	pmol/μmol creat	pmol/μmol creat	pmol/μmol creat	pmol/μmol creat	pmol/μmol creat		
1	N/A	2	2.83	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
2	N/A	2	2.80	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	180	
3	N/A	3	2.50	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
4	N/A	3	1.80	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
5	N/A	5	3.53	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	82	
6	N/A	6	4.52	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
7	N/A	7	2.29	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
8	N/A	8	14.30	nd	nd	nd	nd	nd	nd	22	81	
9	N/A	9	6.60	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	97	
10	N/A	9	5.90	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
11	N/A	10	1.66	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
12	N/A	12	7.30	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	82	
13	N/A	13	11.10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	31	93	
14	N/A	13	8.47	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	55	
15	N/A	13	8.70	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	44	
16	N/A	14	8.70	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	60	
17	N/A	14	2.30	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
18	N/A	14	9.90	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	26	
19	N/A	14	4.50	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
20	N/A	15	6.20	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
21	N/A	15	3.20	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
22	N/A	15	10.20	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	29	
23	N/A	15	21.70	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	26	
24	N/A	16	21.60	nd	nd	nd	nd	nd	34	nd	56	
25	N/A	16	16.99	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	27	
26	N/A	16	14.00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	18	38	
27	N/A	19	12.40	nd	nd	nd	nd	nd	23	nd	37	
28	N/A	20	10.20	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	39	
29	N/A	21	11.18	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	59	
30	N/A	26	16.90	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	21	
31	N/A	26	12.95	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	53	
32	N/A	27	5.63	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	81	
33	N/A	29	1.10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
34	N/A	30	7.42	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	48	
35	N/A	35	5.50	nd	nd	nd	nd	nd	nd	33	50	
36	N/A	36	22.11	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	85	
37	N/A	37	13.86	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
38	N/A	39	2.57	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
39	N/A	40	9.76	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	52	
40	N/A	42	1.46	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
41	N/A	42	3.23	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
42	N/A	43	5.06	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	54	
43	N/A	47	0.47	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
44	N/A	47	4.50	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	93	
45	N/A	48	4.88	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
46	N/A	49	14.37	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	67	
47	N/A	52	7.22	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	49	
48	N/A	54	1.07	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
49	N/A	55	0.30	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
50	N/A	55	11.28	nd	nd	nd	nd	nd	20	nd	43	
51	N/A	55	0.95	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
52	N/A	57	9.22	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
53	N/A	58	6.79	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	39	
54	N/A	59	2.70	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
55	N/A	59	13.50	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	97	
Mean		27	7.68	0	0	0	0	0	1	2	35	
Median		20	6.60	0	0	0	0	0	0	0	29	
Min		2	0.30	0	0	0	0	0	0	0	0	
Max		59	22.11	0	0	0	0	0	34	33	180	

Table S-5. Statistical analysis of Gb₃ and lyso-Gb₃ analogue excretion in male and female urine samples using the Spearman rank correlation.

Correlation	Males (n=57)		Females (n=74)	
Gb ₃ and Lyso-Gb ₃	p <0.001	r =0.688	p <0.05	r =0.344
Gb ₃ and Lyso-Gb ₃ (-28)	p <0.001	r =0.657	p <0.001	r =0.441
Gb ₃ and Lyso-Gb ₃ (-12)	p <0.001	r =0.646	p <0.05	r =0.330
Gb ₃ and Lyso-Gb ₃ (-2)	p <0.001	r =0.655	p <0.001	r =0.501
Gb ₃ and Lyso-Gb ₃ (+14)	p <0.001	r =0.660	p <0.05	r =0.328
Gb ₃ and Lyso-Gb ₃ (+16)	p <0.001	r =0.668	p <0.05	r =0.351
Gb ₃ and Lyso-Gb ₃ (+34)	p <0.001	r =0.663	p <0.001	r =0.492
Gb ₃ and Lyso-Gb ₃ (+50)	p <0.001	r =0.690	p =0.063	r =0.217

Chapitre III – Discussion

La spectrométrie de masse est une technique de choix pour l'analyse de biomarqueurs. Dans le cas des analogues du lyso-Gb₃ dans l'urine, ceux-ci sont à des concentrations qui relèvent de l'ordre du picomolaire, donc une technique de grande sensibilité était requise pour leur analyse. La configuration des spectromètres de masse est en constante évolution et les technologies émergentes permettent de détecter des molécules à des concentrations toujours plus basses au fil des années. La spécificité des appareils opérant en mode MRM représente un avantage majeur et permet l'obtention du chromatogramme d'une seule molécule de l'échantillon en connaissant sa masse et en choisissant judicieusement un fragment spécifique sans interférence. Les techniques développées peuvent être couplées à un système d'introduction par chromatographie avec injections automatiques, qui sont robustes et requièrent un faible volume d'échantillon. La spectrométrie de masse permet d'accéder à de hauts niveaux de reproductibilité et de précision, une nécessité dans le cas de méthodes d'analyse de biomarqueurs. Ces caractéristiques essentielles permettent de détecter des changements de concentration subtils et ainsi suivre la réponse au traitement de façon précise. Il devient aussi possible d'établir des corrélations fiables entre les niveaux d'excrétion observés de biomarqueurs et des paramètres donnés. Une validation rigoureuse est toutefois importante pour s'assurer que la méthodologie développée ainsi que les paramètres choisis tant au niveau du traitement de l'échantillon, de la chromatographie et de la détection, permettent d'exploiter ces qualités au maximum.

La maladie de Fabry est une maladie dont la pathophysiologie est, encore aujourd'hui, considérée comme très complexe. Les niveaux tissulaires, urinaires ou plasmatiques du substrat principal de l'enzyme α -galactosidase A, le globotriaosylcéramide, ne semblent pas corrélés avec la sévérité de la maladie chez les patients atteints. Une meilleure compréhension de la physiopathologie est importante, puisqu'elle permettrait notamment une meilleure prise en charge des patients et l'élaboration de nouvelles stratégies de traitement.

Les approches en métabolomique utilisant la spectrométrie de masse en temps de vol exploitées par notre groupe ont permis de découvrir l'existence de molécules s'accumulant dans les liquides biologiques des patients atteints de la maladie de Fabry. Ces molécules étaient jusque-là inconnues par les chercheurs. En effet, le Gb₃ et le lyso-Gb₃ ne sont qu'une fraction des molécules anormalement élevées chez les patients atteints de la maladie de Fabry. Quel est le rôle de ces molécules, plus particulièrement le rôle des sept analogues du lyso-Gb₃, dans la pathogénèse de la maladie? Est-ce que le profil global d'excrétion serait plus informatif au niveau de la sévérité de la maladie que l'étude du Gb₃ ou du lyso-Gb₃ évalué de façon isolée? Le présent travail de recherche a été orienté vers l'élaboration d'une méthode d'analyse permettant la quantification relative des analogues du lyso-Gb₃ en mode multiplex par spectrométrie de masse en tandem. Cette méthodologie pourrait éventuellement permettre de répondre aux questions posées ci-dessus.

Jusqu'à présent, les résultats obtenus suite à l'analyse de 164 échantillons d'urine de patients atteints de la maladie de Fabry et de 96 contrôles sains ont permis d'obtenir certaines réponses concernant le rôle qu'ils pourraient jouer comme biomarqueurs de la maladie de Fabry. Les niveaux urinaires de tous les analogues du lyso-Gb₃ ont chuté chez les hommes après un traitement par thérapie enzymatique de remplacement. Cette observation supporte leur utilité potentielle pour suivre la TER mais aussi pour évaluer les traitements futurs. Une observation intéressante est que, malgré la diminution des niveaux urinaires chez les hommes, ceux-ci n'ont pas été normalisés. Il convient de se demander la raison pour laquelle une normalisation n'est pas observée suite à l'injection par voie intraveineuse de l'enzyme déficient. Cela pourrait être dû au fait que certains types de cellules sont moins accessibles pour recevoir la TER (Van Gelder *et al.*, 2012). Il serait intéressant de vérifier si la normalisation est atteinte avec l'amélioration de la quantité ou de l'efficacité de la TER administrée ou encore lors d'essais avec d'autres traitements. Chez les femmes, chez qui un niveau enzymatique résiduel est habituellement présent, les niveaux urinaires des analogues du lyso-Gb₃ ne semblaient pas avoir diminué aussi drastiquement. Toutefois, le suivi d'une femme atteinte de la maladie de Fabry dont des échantillons urinaires avaient été prélevés avant et après le traitement par TER montre que certains analogues (*m/z* de 784, 800 et 836) semblaient avoir diminué. Fait intéressant, cette

femme exprimait une activité enzymatique de l' α -galactosidase A considérée comme normale, mais présentait des niveaux augmentés de Gb₃, du lyso-Gb₃ et de ses analogues.

L'étude a aussi démontré que les hommes atteints de la maladie de Fabry avaient des niveaux d'excrétion urinaires des sept biomarqueurs supérieurs à ceux des femmes hétérozygotes. Cette observation pourrait être reliée avec les symptômes plus modérés ressentis chez les femmes atteintes de la maladie de Fabry comparativement aux symptômes généralement plus sévères chez les hommes.

Au niveau du diagnostic, il serait important d'analyser le profil urinaire complet du lyso-Gb₃ et des 7 analogues lors d'un dépistage à haut-risque. De fait, nous avons observé que certains patients Fabry excrétaient du lyso-Gb₃ urinaire en faible quantité, mais présentait de fortes excréctions de certains analogues. Il est clairement établi qu'un diagnostic efficace est important pour permettre de dépister les patients Fabry tôt afin d'assurer une prise en charge efficace. Une étude a été réalisée en 2009 (Waldek *et al.*, 2009) et a compilé les données provenant d'une cohorte de 2848 patients. Les 87 patients de la cohorte qui étaient décédés au moment de l'étude avaient un âge moyen lors du diagnostic beaucoup plus élevé que les autres patients: 40 ans *versus* 24 ans chez les hommes et 55 *versus* 33 ans chez les femmes. Un diagnostic tardif semblerait donc être associé à une mort précoce chez les patients atteints de la maladie de Fabry.

Nous avons récemment évalué le cas intéressant d'un patient Fabry présentant une mutation N215S, soit une mutation avec variante cardiaque. Le niveau d'excrétion du Gb₃ urinaire pour ce patient était normal, comme c'est le cas pour environ 50% des patients présentant ce type de mutation (Young *et al.*, 2005). Par contre, lors de l'analyse urinaire du lyso-Gb₃ et de ses analogues par la méthodologie faisant l'objet du présent ouvrage, les analogues de *m/z* 758, 774, 800, 802, 820 et 836 ont été détectés en quantité anormale. Cet exemple démontre bien que le diagnostic biochimique pourrait être amélioré chez de nombreux patients non excréteurs du Gb₃, en procédant à l'analyse des analogues du lyso-Gb₃ comme biomarqueurs de la maladie de Fabry. Le diagnostic serait également facilité par l'absence

de ces molécules, à l'exception de traces de l'analogue de m/z 836, dans les urines de contrôles sains. Conséquemment, les cas de patients présentant des symptômes principalement au niveau cardiaque sont très intéressants pour évaluer le rôle des biomarqueurs en lien avec la sévérité de la maladie. En effet, les patients atteints de la mutation N215S ont aussi des niveaux d'excrétion du Gb₃ plasmatique normaux et tel que mentionné précédemment, seulement 50% d'entre eux présentent un niveau d'excrétion du Gb₃ urinaire anormalement élevé (Young *et al.*, 2005). Serait-ce possible que l'accumulation de Gb₃ ne soit pas la seule cause des problèmes cardiaques observés chez les patients atteints de la maladie de Fabry? Des études *in vitro* ont démontré par le passé que le lyso-Gb₃ provoquait la prolifération cellulaire des cellules du muscle lisse tandis que l'exposition au Gb₃ ne présentait pas cet effet (Aerts *et al.*, 2008). Qu'en est-il de l'excrétion des analogues du lyso-Gb₃?

La méthode d'analyse développée offre plusieurs perspectives intéressantes. L'analyse des analogues du lyso-Gb₃ chez une cohorte de patients atteints de variantes cardiaques de la maladie pourrait se révéler informative et éclairer les mécanismes de pathogénèse au niveau cardiaque.

L'étude des niveaux d'excrétion urinaire chez les enfants atteints de la maladie de Fabry pourrait également être intéressante. Est-ce que l'excrétion des analogues du lyso-Gb₃ commence avant l'arrivée des symptômes classiques de la maladie?

Des études au niveau de la détermination de la provenance des analogues sont importantes. Des tests sur des cellules provenant de tissus cardiaques et rénaux de souris Fabry sont présentement en cours. Ces tests aideront à déterminer dans quels types de cellules les analogues peuvent se retrouver et pourraient apporter de l'information sur leur implication possible au niveau de la symptomatologie.

Les patients atteints de la maladie de Fabry qui sont traités par thérapie enzymatique de remplacement ont une infusion aux deux semaines. Des études sont en cours pour vérifier la variation diurne de l'excrétion urinaire des analogues au cours de 3 cycles de thérapie enzymatique de remplacement. Est-il important de faire le prélèvement d'urine toujours au même moment de la journée chez les patients ou est-ce que l'excrétion urinaire des analogues est la même tout au long de la journée? Cette question se révèle être très importante lors d'études impliquant des corrélations entre des paramètres cliniques et l'excrétion urinaire de biomarqueurs. Étant donné que le moment de la journée où l'échantillon est prélevé n'est pas normalisé au sein des différents centres de prélèvement, cet aspect pourrait fausser les corrélations obtenues dans le cas où l'excrétion varierait au cours de la journée. Le même cheminement logique s'applique par rapport au moment où le patient a reçu l'infusion dans le cycle de thérapie de 14 jours. Le prélèvement a-t-il été pris juste après l'administration de la TER ou 14 jours après la dernière administration? Si l'excrétion urinaire diminue après l'administration de la thérapie mais augmente quelques jours après, est-ce qu'il faudrait réévaluer le délai de temps entre les deux infusions? L'étude de ces variations est primordiale et fait présentement l'objet d'une recherche plus poussée.

Chapitre IV – Conclusions

Les objectifs de la présente étude étaient de : 1) Procéder au développement d'une méthode d'analyse en mode multiplex de sept nouveaux biomarqueurs urinaires de la maladie de Fabry qui sont des analogues du lyso-Gb₃; 2) D'optimiser et de valider la méthodologie développée de façon rigoureuse par des études de précision et d'exactitude inter-jour et intra-jour, de stabilité, de recouvrement, de robustesse, de linéarité, de sélectivité, puis établir les limites de détection et de quantification; 3) Procéder à l'analyse de 164 échantillons urinaires de patients Fabry et de 96 contrôles sains selon la méthodologie développée; 4) Établir des corrélations entre les niveaux d'excrétion urinaire chez les patients atteints de la maladie de Fabry et le sexe des patients Fabry et leur statut au niveau du traitement par la thérapie enzymatique de remplacement (traité ou non traité).

La spectrométrie de masse couplée à un système de chromatographie liquide en haute performance a été choisie comme technique analytique en raison des nombreux avantages offerts : sensibilité, sélectivité, reproductibilité et possibilité d'analyse simultanée de plusieurs composés. Une molécule de lyso-Gb₃ modifiée par l'ajout d'une glycine sur sa fonction amine, le lyso-Gb₃-Gly, a été utilisée comme standard interne. Après de multiples essais avec différentes colonnes et gradients, une chromatographie sur colonne HILIC a été développée de façon à ce que les sept analogues du lyso-Gb₃ aient un temps de rétention similaire à celui du lyso-Gb₃-Gly. Le développement de cette chromatographie a permis au standard interne de fortement diminuer les effets de matrice et a amélioré la précision de la méthode analytique. L'ajustement des paramètres du spectromètre de masse au niveau des voltages, des températures et des débits de gaz, mais aussi au niveau des paramètres d'acquisition des données ont permis d'obtenir une sensibilité et une reproductibilité optimales. Suite au développement de la méthode, celle-ci fut par la suite validée et les critères d'acceptation fixés ont été rencontrés.

Lors de l'analyse des 96 échantillons d'urine d'individus contrôles de référence sains, les analogues du lyso-Gb₃ n'ont pas été détectés, à l'exception de l'analogue de *m/z* 836. Cette

sélectivité apporte un avantage important au niveau du diagnostic. L'analyse statistique a montré des corrélations significatives entre les niveaux d'excrétion urinaire des analogues du lyso-Gb₃ et le sexe des patients. En effet, les hommes atteints de la maladie de Fabry avaient des niveaux d'excrétion urinaire des analogues du lyso-Gb₃ supérieurs aux femmes atteintes. Cette corrélation suggère que les biomarqueurs découverts pourraient être reliés à la sévérité de la maladie, étant donné que les hommes présentent habituellement une symptomatologie plus sévère que leurs homologues féminins. Une étude statistique similaire a été effectuée entre les niveaux d'excrétion urinaire des analogues du lyso-Gb₃ et le statut du traitement par la thérapie enzymatique de remplacement. Chez les hommes traités par thérapie enzymatique de remplacement, les niveaux d'excrétion urinaires de tous les analogues étaient significativement inférieurs à ceux des hommes ne recevant pas de traitement. Chez les femmes atteintes de la maladie de Fabry, seulement l'analogue de *m/z* 758 était significativement plus bas dans l'urine des femmes traitées. En ce qui concerne un homme et une femme atteints de la maladie de Fabry, des échantillons d'urine avant et après le début de l'administration de la thérapie enzymatique de remplacement étaient disponibles. L'analyse de ces échantillons montre que les analogues du lyso-Gb₃ pourraient être efficaces comme biomarqueurs au niveau du suivi de traitement.

Des travaux devront être poursuivis pour évaluer les corrélations entre les niveaux urinaires de ces biomarqueurs, la sévérité des manifestations cliniques et la progression de la maladie. L'élucidation de la provenance de ces analogues du lyso-Gb₃ pourrait permettre de déterminer leurs rôles dans les mécanismes de la pathogénèse de la maladie de Fabry. Les analogues du lyso-Gb₃ semblent être des biomarqueurs prometteurs pour la maladie de Fabry et la poursuite de leur évaluation pourrait possiblement apporter un diagnostic et une prise en charge plus efficaces des patients atteints de la maladie de Fabry.

Remerciements

J'aimerais sincèrement remercier ma directrice de maîtrise, Christiane Auray-Blais. Merci Christiane de m'avoir aidé à donner le meilleur de moi-même et de m'avoir ouvert la porte à de nouvelles possibilités. Je n'oublierai pas cette grande générosité qui t'habite et dont tu laisses bénéficier les gens qui t'entourent.

Merci à mes collègues de labo, Michel, Mélanie et René qui ont toujours été présents pour moi au cours de ma maîtrise. Merci pour votre grande curiosité scientifique et votre compétence qui m'ont aidé à régler plusieurs problèmes! C'est un privilège de pouvoir travailler avec vous.

Je voudrais remercier M. Michael Huels et M. Joe T.R. Clarke d'avoir eu la gentillesse d'accepter de réviser ce mémoire.

Je voudrais également remercier Patrick Bherer, Claude Alie, Myriam Turgeon et Marthe Brideau pour leur support ainsi que les gens du Service de génétique et du Département de médecine nucléaire et de radiobiologie.

Merci aux gens de Genzyme, une Division Sanofi, de Waters Corporation, de la Fondation des Étoiles et de la Fondation Go pour leur support.

Finalement, j'aimerais remercier spécialement les patients atteints de la maladie de Fabry pour leur collaboration.

Liste des publications

Ackermann BL, Hale JE, Duffin KL (2006) The role of mass spectrometry in biomarker discovery and measurement. *Curr. Drug Metab.* 7:525-539

Aerts JM, Hollak CE, van Breemen M, Maas M, Groener JE, Boot RG (2005) Identification and use of biomarkers in Gaucher disease and other lysosomal storage diseases. *Acta Paediatr. Suppl.* 94:43-6; discussion 37-8

Aerts JM, Groener JE, Kuiper S et al. (2008) Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:2812-2817

Aerts JM, Kallemeijn WW, Wegdam W et al. (2011) Biomarkers in the diagnosis of lysosomal storage disorders: proteins, lipids, and inhibodies. *J. Inher. Metab. Dis.* 34:605-619

Auray-Blais C, Cyr D, Ntwari A et al. (2008) Urinary globotriaosylceramide excretion correlates with the genotype in children and adults with Fabry disease. *Mol. Genet. Metab.* 93:331-340

Auray-Blais C, Millington DS, Barr C, Young SP, Mills K, Clarke JT (2009) Gb(3)/creatinine biomarkers for Fabry disease: issues to consider. *Mol. Genet. Metab.* 97:237

Auray-Blais C, Ntwari A, Clarke JT et al. (2010) How well does urinary lyso-Gb3 function as a biomarker in Fabry disease? *Clin. Chim. Acta* 411:1906-1914

Auray-Blais C, Boutin M, Gagnon R, Dupont FO, Lavoie P, Clarke JT (2012) Urinary globotriaosylsphingosine-related biomarkers for Fabry disease targeted by metabolomics. *Anal. Chem.* 84:2745-2753

Auray-Blais C, Boutin M (2012) Novel Gb₃ isoforms detected in urine of Fabry disease patients: a metabolomic study. *Curr. Med. Chem.* 19:3241-3252

Asfaw B, Ledvinova J, Dobrovolny R et al. (2002) Defects in degradation of blood group A and B glycosphingolipids in Schindler and Fabry diseases. *J. Lipid Res.* 43:1096-1104

Barbey F, Hayoz D, Widmer U, Burnier M (2004) Efficacy of enzyme replacement therapy in Fabry disease. *Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents* 2:277-286

Barr C, Clarke JT, Ntwari A, Drouin R, Auray-Blais C (2009) Fabry disease urinary globotriaosylceramide/creatinine biomarker evaluation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in healthy infants from birth to 6 months. *Mol. Genet. Metab.* 97:278-28

- Beutler E (2006) Lysosomal storage diseases: natural history and ethical and economic aspects. *Mol.Genet.Metab.* 88:208-215
- Biancini GB, Vanzin CS, Rodrigues DB et al. (2012) Globotriaosylceramide is correlated with oxidative stress and inflammation in Fabry patients treated with enzyme replacement therapy. *Biochim.Biophys.Acta* 1822:226-232
- Boutin M, Gagnon R, Lavoie P, Auray-Blais C (2012) LC-MS/MS analysis of plasma lyso-Gb(3) in Fabry disease. *Clin.Chim.Acta* 414:273-280
- Bouwman MG, Rombach SM, Schenk E et al. (2012) Prevalence of symptoms in female Fabry disease patients: a case-control survey. *J.Inherit.Metab.Dis.* 35:891-898
- Borgwardt L, Feldt-Rasmussen U, Rasmussen A, Ballegaard M, Meldgaard Lund A (2012) Fabry disease in children: agalsidase-beta enzyme replacement therapy. *Clin.Genet.* DOI: 10.1111/j.1399-0004.2012.01947.x
- Brady RO, Gal AE, Bradley RM, Martensson E, Warshaw AL, Laster L (1967) Enzymatic defect in Fabry's disease. Ceramidetrihexosidase deficiency. *N.Engl.J.Med.* 276:1163-1167
- Brady RO, Tallman JF, Johnson WG et al. (1973) Replacement therapy for inherited enzyme deficiency. Use of purified ceramidetrihexosidase in Fabry's disease. *N.Engl.J.Med.* 289:9-14
- Buda P, Wieteska-Klimczak A, Ksiazek J et al. (2011) Diagnostic problems in a 17-year-old patient with gastrointestinal manifestations of Fabry disease. *Med.Wieku Rozwoj.* 15:69-72
- Chambers E, Wagrowski-Diehl DM, Lu Z, Mazzeo JR (2007) Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *J.Chromatogr.B.Analyt Technol.Biomed.Life.Sci.* 852:22-34
- Chang MH, Bindloss CA, Grabowski GA et al. (2000) Saposins A, B, C, and D in plasma of patients with lysosomal storage disorders. *Clin.Chem.* 46:167-174
- Clarke JT (2007) Narrative review: Fabry disease. *Ann.Intern.Med.* 146:425-433
- Clarke JTR (2009) Recognition and Management of Lysosomal Storage Diseases in Adults. *Continuum : Lifelong Learning in Neurology.* 15:126-146
- Cooper G (2000) *The Cell – A Molecular Approach*, Sinauer Associates, 689 pages
- Coutinho MF, Prata MJ, Alves S (2012) Mannose-6-phosphate pathway: a review on its role in lysosomal function and dysfunction. *Mol.Genet.Metab.* 105:542-550
- Cox, TM (2006) Biomarkers in lysosomal storage diseases, In: *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*, Oxford PharmaGenesis, 438 pages

- Cox TM, Cachon-Gonzalez MB (2012) The cellular pathology of lysosomal diseases. *J.Pathol.* 226:241-254
- De Hoffmann E, Stroobant V (2007) *Mass Spectrometry : Principles and Applications*, Wiley-Interscience, 502 pages
- Deegan PB, Baehner AF, Barba Romero MA et al. (2006) Natural history of Fabry disease in females in the Fabry Outcome Survey. *J.Med.Genet.* 43:347-352
- Desnick RJ, Schuchman EH (2012) Enzyme replacement therapy for lysosomal diseases: lessons from 20 years of experience and remaining challenges. *Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.* 13:307-335
- Downard KM (2012) 1912: a Titanic year for mass spectrometry. *J.Mass Spectrom.* 47:1034-1039
- Dupont FO, Gagnon R, Boutin M, Auray-Blais C (2012) A Metabolomic Study Reveals Novel Plasma Lyso-Gb3 Analogs as Fabry Disease Biomarkers. *Curr.Med.Chem.* 19(1).
- Durant B, Forni S, Sweetman L et al. (2011) Sex differences of urinary and kidney globotriaosylceramide and lyso-globotriaosylceramide in Fabry mice. *J.Lipid Res.* 52:1742-1746
- Elstein D, Schachamov E, Beeri R, Altarescu G (2012) X-inactivation in Fabry disease. *Gene* 505:266-268
- Esther CR,Jr, Boysen G, Olsen BM et al. (2009) Mass spectrometric analysis of biomarkers and dilution markers in exhaled breath condensate reveals elevated purines in asthma and cystic fibrosis. *Am.J.Physiol.Lung Cell.Mol.Physiol.* 296:L987-93
- Filocamo M, Morrone A (2011) Lysosomal storage disorders: molecular basis and laboratory testing. *Hum.Genomics* 5:156-169
- Futerman AH, van Meer G (2004) The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 5:554-565
- Garman SC, Garboczi DN (2004) The molecular defect leading to Fabry disease: structure of human alpha-galactosidase. *J.Mol.Biol.* 337:319-335
- Gaspar P, Herrera J, Rodrigues D et al. (2010) Frequency of Fabry disease in male and female haemodialysis patients in Spain. *BMC Med.Genet.* 11:19
- Germain DP (2010) Fabry disease. *Orphanet J.Rare Dis.* 5:30
- Germain DP, Boucly C, Carlier RY et al. (2010) Enzyme replacement therapy of lysosomal storage diseases. *Rev.Med.Interne* 31 Suppl 2:S279-91
- Ghosh C, Shinde C, ChaKraborty B (2012) Influence of ionization source design on matrix effects during LC-ESI-MS/MS analysis. *J. Chromatogr. B.* 893-894:193-200

- Giacomini PS, Shannon PT, Clarke JT, Jaigobin C (2004) Fabry's disease presenting as stroke in a young female. *Can.J.Neurol.Sci.* 31:112-114
- Gieselmann V (2006) Cellular pathophysiology of lysosomal storage diseases, In: *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*, Oxford PharmaGenesis, 438 pages
- Gosetti F, Mazzucco E, Zampieri D, Gennaro MC (2010) Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J.Chromatogr.A* 1217:3929-3937
- Gritti A (2011) Gene therapy for lysosomal storage disorders. *Expert Opin.Biol.Ther.* 11:1153-1167
- Gross J (2011) *Mass Spectrometry – A Textbook*, Springer, 774 pages
- Hopwood JJ (2012) Genetics of Lysosomal Storage Disorders and Counselling, In: *Lysosomal Storage Disorders – A Practical Guide*, Wiley-Blackwell, 208 pages
- Huang JT, Leweke FM, Oxley D et al. (2006) Disease biomarkers in cerebrospinal fluid of patients with first-onset psychosis. *PLoS Med.* 3:e428
- Ishii S (2012) Pharmacological chaperone therapy for Fabry disease. *Proc.Jpn.Acad.Ser.B.Phys.Biol.Sci.* 88:18-30
- Kampmann C, Kalkum G, Beck M, Whybra C (2012) Successful long-term enzyme replacement therapy in a young adult with Fabry disease. *Clin.Genet.* DOI: 10.1111/j.1399-0004.2012.01916.x.
- Keating GM (2012) Agalsidase alfa: a review of its use in the management of fabry disease. *BioDrugs* 26:335-354
- Kebarle P (2000) A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J.Mass Spectrom.* 35:804-817
- Kitagawa T, Ishige N, Suzuki K et al. (2005) Non-invasive screening method for Fabry disease by measuring globotriaosylceramide in whole urine samples using tandem mass spectrometry. *Mol.Genet.Metab.* 85:196-202
- Kruger R, Tholey A, Jakoby T et al. (2012) Quantification of the Fabry marker lysoGb3 in human plasma by tandem mass spectrometry. *J.Chromatogr.B.Analyt Technol.Biomed.Life.Sci.* 883-884:128-135
- Lee K, Jin X, Zhang K et al. (2003) A biochemical and pharmacological comparison of enzyme replacement therapies for the glycolipid storage disorder Fabry disease. *Glycobiology* 13:305-313
- Lee CJ, Fan X, Guo X, Medin JA (2011) Promoter-specific lentivectors for long-term, cardiac-directed therapy of Fabry disease. *J.Cardiol.* 57:115-122

- Linhart A (2006) The Heart in Fabry Disease, In: *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*, Oxford PharmaGenesis, 438 pages
- Linthorst GE, Vedder AC, Aerts JM, Hollak CE (2005) Screening for Fabry disease using whole blood spots fails to identify one-third of female carriers. *Clin.Chim.Acta* 353:201-203
- Liu R, Bi K, Jia Y, Wang Q, Yin R, Li Q (2012) Determination of polyamines in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with Q-TOF mass spectrometry. *J.Mass Spectrom.* 47:1341-1346
- Lubke T, Lobel P, Sleat DE (2009) Proteomics of the lysosome. *Biochim.Biophys.Acta* 1793:625-635
- MacDermot KD, Holmes A, Miners AH (2001) Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 98 hemizygous males. *J.Med.Genet.* 38:750-760
- MacDermot KD, Holmes A, Miners AH (2001) Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 60 obligate carrier females. *J.Med.Genet.* 38:769-775
- Maier EM, Osterrieder S, Whybra C et al. (2006) Disease manifestations and X inactivation in heterozygous females with Fabry disease. *Acta Paediatr.Suppl.* 95:30-38
- Malek F (2012) The importance of NGAL and cystatin C biomarkers in cardiovascular diseases-editorial. *Vnitr.Lek.* 58:261-262
- Marshall J, Ashe KM, Bangari D et al. (2010) Substrate reduction augments the efficacy of enzyme therapy in a mouse model of Fabry disease. *PLoS One* 5:e15033
- Mehta A, Ramaswami U (2012) *Fabry Disease, In : Lysosomal Storage Disorders – A Practical Guide*, Wiley-Blackwell, 208 pages
- Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF (1999) Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* 281:249-254
- Mindell JA (2012) Lysosomal acidification mechanisms. *Annu.Rev.Physiol.* 74:69-86
- Motwani M, Banypersad S, Woolfson P, Waldek S (2012) Enzyme replacement therapy improves cardiac features and severity of Fabry disease. *Mol.Genet.Metab.* 107:197-202
- Mutoh H, Konoshita T, Onoe T et al. (2012) Angiokeratomas in Fabry Disease. *Am.J.Med.Sci.* DOI: 10.1097/MAJ.0b013e3182639555
- Namdar M, Gebhard C, Studiger R et al. (2012) Globotriaosylsphingosine accumulation and not alpha-galactosidase-A deficiency causes endothelial dysfunction in Fabry disease. *PLoS One* 7:e36373

- Parenti G (2009) Treating lysosomal storage diseases with pharmacological chaperones: from concept to clinics. *EMBO Mol.Med.* 1:268-279
- Park S, Kim JA, Joo KY et al. (2011) Globotriaosylceramide leads to K(Ca)_{3.1} channel dysfunction: a new insight into endothelial dysfunction in Fabry disease. *Cardiovasc.Res.* 89:290-299
- Pastores GM (2007) Agalsidase alfa (Replagal) in the treatment of Anderson-Fabry disease. *Biologics* 1:291-300
- Pastores GM (2010) Lysosomal storage disorders : Principles and practice, World Scientific Publishing Co Pte Ltd, 180 pages
- Pisani A, Visciano B, Roux GD et al. (2012) Enzyme replacement therapy in patients with Fabry disease: State of the art and review of the literature. *Mol.Genet.Metab.* 107:267-275
- Ries M, Ramaswami U, Parini R et al. (2003) The early clinical phenotype of Fabry disease: a study on 35 European children and adolescents. *Eur.J.Pediatr.* 162:767-772
- Rolfs A, Bottcher T, Zschiesche M et al. (2005) Prevalence of Fabry disease in patients with cryptogenic stroke: a prospective study. *Lancet* 366:1794-1796
- Rombach SM, Dekker N, Bouwman MG et al. (2010) Plasma globotriaosylsphingosine: diagnostic value and relation to clinical manifestations of Fabry disease. *Biochim.Biophys.Acta* 1802:741-748
- Rombach SM, van den Bogaard B, de Groot E et al. (2012) Vascular aspects of fabry disease in relation to clinical manifestations and elevations in plasma globotriaosylsphingosine. *Hypertension* 60:998-1005
- Ruiz de Garibay AP, Delgado D, Del Pozo-Rodriguez A, Solinis MA, Gascon AR (2012) Multicomponent nanoparticles as nonviral vectors for the treatment of Fabry disease by gene therapy. *Drug Des.Devel.Ther.* 6:303-310
- Sachdev B, Takenaka T, Teraguchi H et al. (2002) Prevalence of Anderson-Fabry disease in male patients with late onset hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 105:1407-1411
- Saito S, Ohno K, Sakuraba H (2011) Fabry-database.org: database of the clinical phenotypes, genotypes and mutant alpha-galactosidase A structures in Fabry disease. *J.Hum.Genet.* 56:467-468
- Sanchez-Nino MD, Sanz AB, Carrasco S et al. (2011) Globotriaosylsphingosine actions on human glomerular podocytes: implications for Fabry nephropathy. *Nephrol.Dial.Transplant.* 26:1797-1802

Schiffmann R, Murray GJ, Treco D et al. (2000) Infusion of alpha-galactosidase A reduces tissue globotriaosylceramide storage in patients with Fabry disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 97:365-370

Schiffmann R, Kopp JB, Austin HA,3rd et al. (2001) Enzyme replacement therapy in Fabry disease: a randomized controlled trial. *JAMA* 285:2743-2749

Schiffmann R, Waldek S, Benigni A, Auray-Blais C (2010) Biomarkers of Fabry disease nephropathy. *Clin.J.Am.Soc.Nephrol.* 5:360-364

Shen JS, Meng XL, Moore DF et al. (2008) Globotriaosylceramide induces oxidative stress and up-regulates cell adhesion molecule expression in Fabry disease endothelial cells. *Mol.Genet.Metab.* 95:163-168

Sirrs S (2011) The Fabrazyme shortage--a call to action for metabolic physicians. *Mol.Genet.Metab.* 102:4-5

Siuzdak G (2006) *The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology*, MCC Press, 257 pages

Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA (2003) *Principes d'Analyse Instrumentale*, de Boeck, 968 pages

Sodi A, Ioannidis AS, Mehta A, Davey C, Beck M, Pitz S (2007) Ocular manifestations of Fabry's disease: data from the Fabry Outcome Survey. *Br.J.Ophthalmol.* 91:210-214

Spada M, Pagliardini S, Yasuda M et al. (2006) High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. *Am.J.Hum.Genet.* 79:31-40

Sunder-Plassmann G (2006) Renal Manifestations of Fabry Disease, In: *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*, Oxford PharmaGenesis, 438 pages

Sweeley CC, Klionsky B (1963) Fabry's Disease: Classification as a Sphingolipidosis and Partial Characterization of a Novel Glycolipid. *J.Biol.Chem.* 238:3148-3150

Togawa T, Kawashima I, Kodama T et al. (2010) Tissue and plasma globotriaosylsphingosine could be a biomarker for assessing enzyme replacement therapy for Fabry disease. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 399:716-720

Torralba-Cabeza MA, Olivera S, Hughes DA, Pastores GM, Mateo RN, Perez-Calvo JI (2011) Cystatin C and NT-proBNP as prognostic biomarkers in Fabry disease. *Mol.Genet.Metab.* 104:301-307

Thurberg BL, Rennke H, Colvin RB et al. (2002) Globotriaosylceramide accumulation in the Fabry kidney is cleared from multiple cell types after enzyme replacement therapy. *Kidney Int.* 62:1933-1946

Van Eeckhaut A, Lanckmans K, Sarre S, Smolders I, Michotte Y (2009) Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. *J.Chromatogr.B.Analyt Technol.Biomed.Life.Sci.* 877:2198-2207

Van Gelder CM, Vollebregt AA, Plug I, van der Ploeg AT, Reuser AJ (2012) Treatment options for lysosomal storage disorders: developing insights. *Expert Opin.Pharmacother.* 13:2281-2299

Vedder AC, Linthorst GE, van Breemen MJ et al. (2007) The Dutch Fabry cohort: diversity of clinical manifestations and Gb3 levels. *J.Inherit.Metab.Dis.* 30:68-78

Vedder AC, Breunig F, Donker-Koopman WE et al. (2008) Treatment of Fabry disease with different dosing regimens of agalsidase: effects on antibody formation and GL-3. *Mol.Genet.Metab.* 94:319-325

Verocai F, Clarke JT, Iwanochko RM (2010) Case report: long-term outcome post-heart transplantation in a woman with Fabry's disease. *J.Inherit.Metab.Dis.* DOI: 10.1007/s10545-010-9194-3.

Young E, Mills K, Morris P et al. (2005) Is globotriaosylceramide a useful biomarker in Fabry disease? *Acta Paediatr.Suppl.* 94:51-4; discussion 37-8

Waldek S, Patel MR, Banikazemi M, Lemay R, Lee P (2009) Life expectancy and cause of death in males and females with Fabry disease: findings from the Fabry Registry. *Genet.Med.* 11:790-796

Wang RY, Bodamer OA, Watson MS, Wilcox WR, ACMG Work Group on Diagnostic Confirmation of Lysosomal Storage Diseases (2011) Lysosomal storage diseases: diagnostic confirmation and management of presymptomatic individuals. *Genet.Med.* 13:457-484

Warnock DG, Ortiz A, Mauer M et al. (2012) Renal outcomes of agalsidase beta treatment for Fabry disease: role of proteinuria and timing of treatment initiation. *Nephrol.Dial.Transplant.* 27:1042-1049

Watson JT, Sparkman OD (2007) *Introduction to Mass Spectrometry : Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation*, Wiley, 862 pages

West M, Dyack S, Riddell C, LeMoine K, Camfield C, Camfield PA (2002) Nova Scotia kindred with Fabry disease. *Acta Paed.* 91:439S-116.

Whybra C, Kampmann C, Willers I et al. (2001) Anderson-Fabry disease: clinical manifestations of disease in female heterozygotes. *J.Inherit.Metab.Dis.* 24:715-724

Whybra, C, Bahner, F, Baron, K (2006) Measurement of disease severity and progression in Fabry disease. In: *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. Eds. Mehta, A, Beck, M, Sunder-Plassmann, G. Oxford: Oxford PharmaGenesis

Wilcox WR (2004) Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. J.Pediatr. 144:S3-14

Winchester B, Vellodi A, Young E (2000) The molecular basis of lysosomal storage diseases and their treatment. Biochem.Soc.Trans. 28:150-154

Winchester B, Young E (2006) Biochemical and Genetic Diagnosis of Fabry Disease, In: Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS, Oxford PharmaGenesis, 438 pages

Winchester B (2012) Classification of Lysosomal Storage Diseases, In : Lysosomal Storage Disorders – A Practical Guide, Wiley-Blackwell, 208 pages

Wraith JE, Beck M (2012) Clinical Aspects and Clinical Diagnosis, In : Lysosomal Storage Disorders – A Practical Guide, Wiley-Blackwell, 208 pages