

Le dépistage néonatal des maladies de surcharge lysosomiales

Quelles possibilités techniques ?

Dr David Cheillan

Hospices Civils de Lyon

Service des Maladies Héréditaires du Métabolisme et Dépistage Néonatal

Groupement Hospitalier Est, BRON, France

Le Dépistage Néonatal - définition



■ L'objectif de tout dépistage :

Repérer les personnes à risque de développer une maladie dans une population en l'absence de tout risque individuel identifié

■ Dans le cadre du dépistage néonatal :

- Tri entre les Nnés indemnes et ceux potentiellement malades
- Ce dépistage n'a d'intérêt que pour des maladies graves dont le diagnostic précoce peut conduire à un traitement efficace avant l'apparition de lésions irréversibles

Critères OMS de Wilson et Jungner

J. Wilson et G. Jungner, Publ Health Pap. Who. 1968 n°34

Pour qu'une maladie puisse bénéficier d'un dépistage, elle doit :

1. Correspondre à un problème important de santé publique

Incidence > 1/15 000

2. Conduire à un traitement efficace

3. Être validable par des tests spécifiques

4. Être effectué à un stade pré-symptomatique

5. Être réalisable par une méthode fiable comportant peu de faux-positifs et de faux-négatifs ;

6. Être accepté de la population ;

7. Correspondre à une maladie connue et bien comprise ;

8. Comporter un bon rapport coût-bénéfice ;

9. Être accompagné d'un protocole thérapeutique précis ;

10. Être pérenne.



Le programme de dépistage néonatal français

Programme financé par la CNAMTS et coordonné par l'AFDPHE

5 Maladies bénéficient d'un dépistage néonatal
systématique en France

LA PHENYLACETONURIE (1/15000)

L'HYPOTHYROIDIE CONGENITALE (1/4000)

L'HYPERPLASIE CONGENITALE DES SURRENALES (1/18000)

LA DREPANOCYTOSE (pop à risque)

LA MUCOVISCIDOSE (1/4000)

850 000 naissances / an en France

Le prélèvement de guthrie



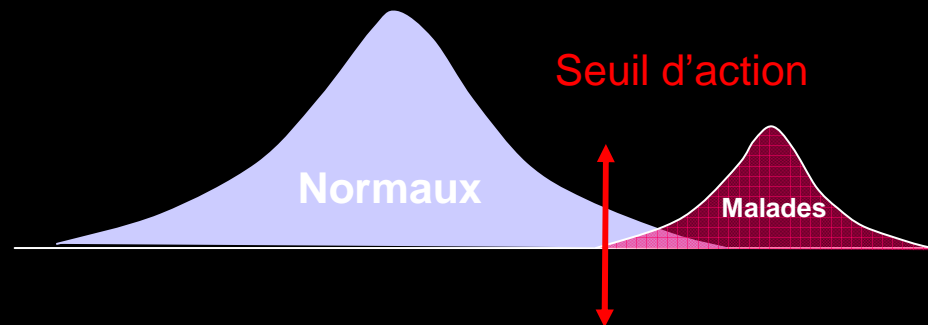
| | | | | | | | | |
|---|---|---|--|--|---|------|---|--|
| Remplir les 7 cercles | | | | | | | A remplir uniquement si N-Né à risque de Drépano. | |
| 1 | 2 | 0807040377 | | | 4 | 414F | | |
| NOM : ESSAI | | Né(e) le : 01/01/01 | | N-Né à risque de Drépanocytose : OUI <input type="checkbox"/> | | | | |
| Prénom : DAVID | | Prélevé(e) le : 04/01/01 | | Terme (SA) : 40 | | | | |
| Sexe : M <input checked="" type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> | | Nom J.F. Mère : | | Si prématurité : Poids (g) : 3760 | | | | |
| Lieu (établissement) du prélèvement et Code : | | Lieu de l'accouchement et Code : | | n° d'accouchement : | | | | |
| Adresse des parents : | | Médecin à contacter si nécessaire : | | Transfusé ? oui <input type="checkbox"/> non <input checked="" type="checkbox"/> | | | | |
| Tél : | | Ville : | | | | | | |

- Prélèvement au talon de sang déposé sur buvard réalisé à 3 jours de vie
- Après séchage, transport à température ambiante
- Excellente conservation : métabolites, enzymes, acides nucléiques
- Utilisation d'un spot de 3mm de diamètre (environ 2.5µl sang total)

Le choix du marqueur

- Sensibilité : reconnaître tous les malades (*pas de faux négatifs*)
- Spécificité : Ne reconnaître que les malades (*peu de faux positifs*)
- Discrimination : + grande différence possible entre les normaux et les malades

Choix de la valeur
seuil souvent difficile



- Valeur seuil déterminée pour un âge fixe et une méthode donnée
- Marqueur mesurable et conservable sur du sang séché sur buvard

MSL - dépistage néonatal et critères OMS

■ MSL > 45 Maladies génétiques distinctes dont l'incidence est comprise entre 1/ 50 000 et 1 / 1 000 000

➔ Incidence totale cumulée entre 1/ 5 000 et 1 / 10 000

■ MSL : maladies très invalidantes en l'absence de prise en charge + **dvpt de possibilités thérapeutiques** (*Gaucher, Fabry, MPS I, II, Pompe,*)

■ Depuis une 10^{aine} d'années, développements de marqueurs biologiques offrant des possibilités techniques de dépistage néonatal

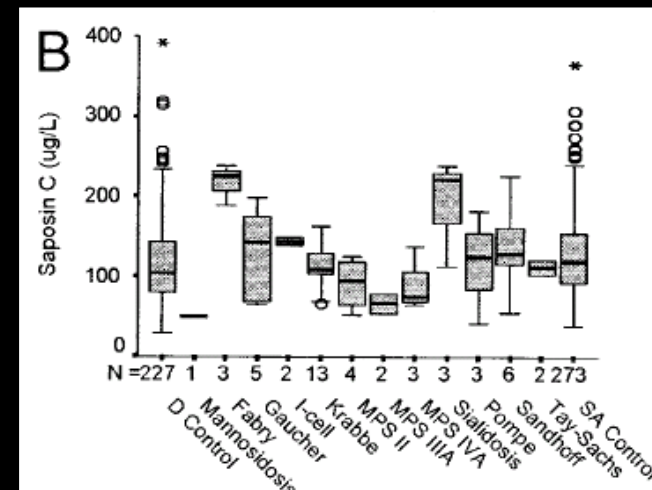
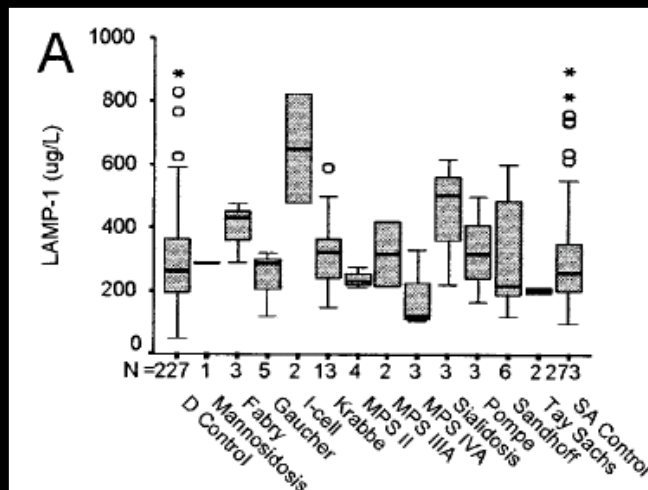
Recherche d'un marqueur unique des MSL

(Meikle et al 1997, Hua et al 1998, Chang et al 2000, Meikle et al 2004)

Recherche d'un marqueur unique des MSL

(Meikle et al 1997, Hua et al 1998, Chang et al 2000, Meikle et al 2004)

- Dans la plupart des MSL, augmentation du volume des lys = augmentation des protéines de la membrane du lys libérées dans le plasma
- Dosages des LAMP et Saposines par méthodes immunofluorimétriques
- Mesure de LAMP-1 / SapC sur 227+273 NN contrôles / 47 MSL



Marqueurs très peu discriminants entre NN normaux et malades = Abandon

De nouveaux outils multiplex

- Application au dépistage néonatal de nouvelles technologies permettant le dosage simultané de nombreux paramètres = analyses multiplex

- 2 principaux outils appliqués au dépistage des MSL :
 - La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)
 - Immunoquantification par suspension de microbilles (μB)

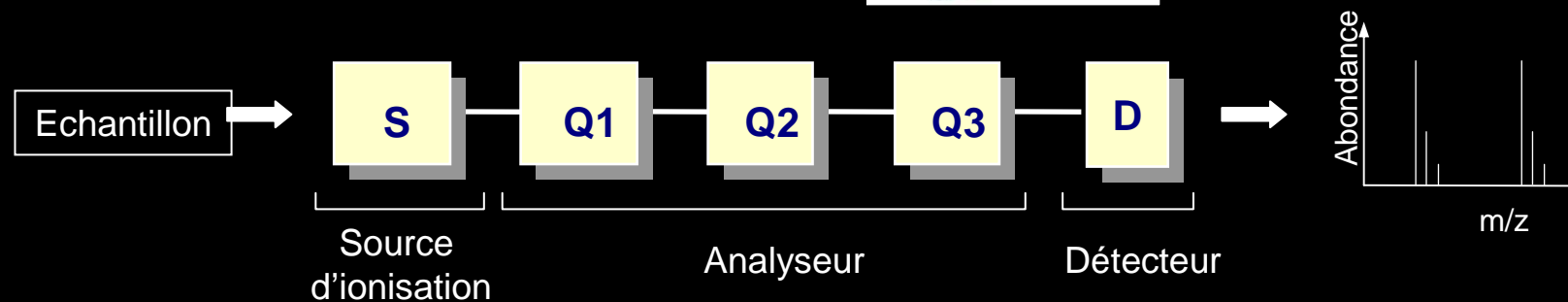
- Trois applications développées sur taches de sang :
 - Dosages de métabolites spécifiques / MSL (MS/MS)
 - Quantification de la protéine enzymatique déficitaire / MSL (μB)
 - Mesures des activités enzymatiques / MSL (MS/MS)

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

■ Analyse qualitative et quantitative d'un mélange complexe en séparant les molécules en fonction de leur masse et de leur charge sans étape préalable de chromatographie



■ Schéma d'un MS/MS :



Avantages :

- Analyse multiple sur une tache de sang
- Analyse de nombreux échantillons
- Rapidité de l'analyse (2-3 min)
- Lecture semi-automatisée

Inconvénients :

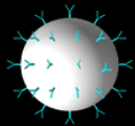
- Etapes pré-analytiques
- Coût de l'appareil et des réactifs
- Formation des personnels

Immunoquantification par suspension de microbilles (μ B)

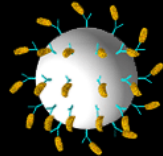
■ Principe : cytométrie en flux + microbilles fluorescentes sur lesquelles sont fixées des Ac spécifiques



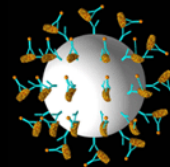
1 – Billes fluorescentes rouges coatées



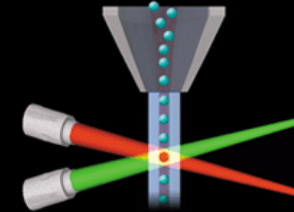
2 - Capture de l'Ag



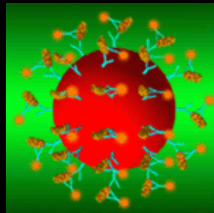
3 - Ajout de l'Ac *



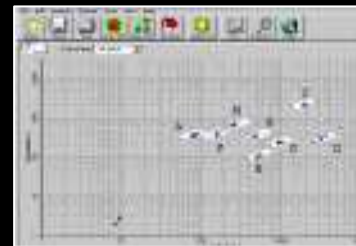
4 - Passage de la suspension dans un cytomètre de flux



5 – Mesure de la fluorescence



6 - Traitement des données



Possibilités d'un panel de 100 billes différentes = 100 dosages simultanés

Avantages :

- Analyse multiple sur une tache de sang
- Analyse de nombreux échantillons
- Lecture automatisée

Inconvénients :

- Système peu développé
- Coût ?
- Praticabilité ?

I - Mesure de métabolites spécifiques

(Meikle et al. Pediatrics 2004)

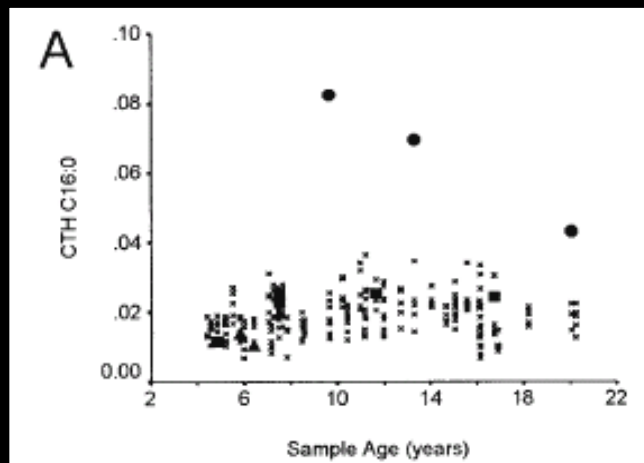
Mesure de métabolites spécifiques - 1

(Meikle et al. Pediatrics 2004)

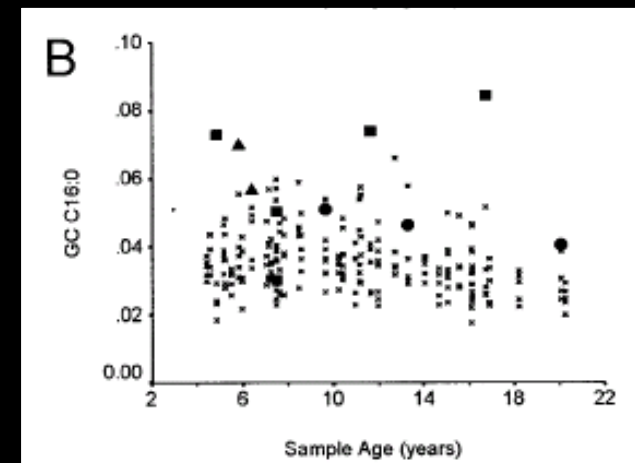
- Mesure de différents paramètres sur échantillons de sang déposés sur buvard CTL et MSL par MS/MS (+ Lamp-1/SapC) :
 - Glycosphingolipides
 - Oligosaccharides

■ Résultats :

Fabry – GB3



Gaucher - Glucosylcéramide



Mesure de métabolites spécifiques - 2

(Meikle et al. Pediatrics 2004)

■ Résultats

TABLE 2. Sensitivity and Specificity of Selected Markers for the Identification of LSDs

| Disorder | <i>n</i> | Markers | Mann-Whitney <i>U</i> Values | Sensitivity/Specificity |
|-------------------|----------|--------------------------|------------------------------|-------------------------|
| α-Mannosidosis | 1 | H2-HNAc | 1† | 100/99.6 |
| Fabry disease | 3 | CTH C16:0/saposin C | 0/41‡ | 100/100 |
| Gaucher disease | 5 | GC C16:0 | 174‡ | 60/100 |
| Krabbe disease* | 13 | UA/GC C16:0 | 548/844‡ | - |
| MPS II* | 4 | HNS-UA | 164 | - |
| MPS IIIA | 2 | HNAc-UA-HNAc-UA/LC C16:0 | 5/0† | 100/100 |
| MPS IVA | 3 | HNAcS | 1† | 100/99.6 |
| I-cell disease | 2 | GC/LC/LAMP-1 | 7†/16†/21† | 100/100 |
| Sialidosis | 3 | HNS-UA/CTH C16:0 | 150/65† | 67/100 |
| Pompe disease* | 3 | - | - | - |
| Sandhoff disease* | 6 | UA-HNAc-UA | 296† | - |
| Tay-Sachs disease | 2 | HNAc-UA | 1† | 100/99.6 |

■ Approche :

- validée pour certaines MSL : Fabry, MPSIIIA
- Insuffisante pour d'autres : Gaucher
- Absente pour certaines : Pompe, MPSII

■ Technique assez fastidieuse difficile à mettre en œuvre en systématique = bonne approche mais en seconde intention

■ Accumulation de substrats faible à 3 j de vie

II – Quantification des protéines déficitaires

(Meikle et al. Mol Genet Metab 2006)

Quantification des protéines déficitaires - 1

(Meikle et al. Mol Genet Metab 2006)

- Principe : Mutation dans un gène = déficit enzymatique mais aussi une baisse de la quantité de protéine produite
- Plutôt que de mesurer l'activité de l'enzyme déficiente, mesure de la quantité de protéine par suspension de microbilles / 3mm
- Sélection de 9 protéines enzymatiques + Lamp-1/Sap C

| | |
|-------------------------------------|---------------------|
| ➤ Acid sphingomyelinase | : NP A/B + MLII/III |
| ➤ α -Galactosidase | : Fabry |
| ➤ α -Glucosidase | : Pompe |
| ➤ α -Iduronidase | : MPSI |
| ➤ ArylsulfataseA | : MLD |
| ➤ β -Glucosidase | : Gaucher |
| ➤ Iduronate-2-sulfatase | : MPSII |
| ➤ N-acetylgalactosamine-4-sulfatase | : MPSVI + MSD |
| ➤ Sulfamidase | : MPSIIIA + MSD |

Quantification des protéines déficitaires - 2

(Meikle et al. Mol Genet Metab 2006)

■ Résultats

| | Adult ^a | | | Newborn ^b | | | Danish newborn ^c | | |
|-----------------------------------|--------------------|-----------|-----------|----------------------|-----------|----------|-----------------------------|-----------|----------|
| | Median | 5–95% | Range | Median | 5–95% | Range | Median | 5–95% | Range |
| LAMP-1 | 120 | 135–164 | 76.1–202 | 213 | 113–314 | 100–356 | 189 | 120–283 | 64.3–419 |
| Saposin C | 19.5 | 9.5–30.5 | 0–46.6 | 60.7 | 20.6–108 | 19.6–135 | 39.1 | 19.5–77.8 | 8.0–140 |
| Acid sphingomyelinase | 11.5 | 10.2–26.3 | 4.5–54.7 | 18.9 | 5.2–39.4 | 5.7–71.7 | 16.2 | 11.5–34.7 | 0.6–55.4 |
| α-Galactosidase | 52.1 | 44.5–80.9 | 17.2–124 | 81.7 | 35.9–178 | 29.2–256 | 74.7 | 52.1–160 | 23.5–314 |
| α-Glucosidase | 24.4 | 22.3–36.3 | 4.6–41 | 46.8 | 21.3–81.5 | 10.2–114 | 45.7 | 24.4–94.5 | 11.3–256 |
| α-Iduronidase | 13.3 | 7.1–24.3 | 3.5–33.2 | 12.3 | 5.3–20.1 | 5.0–30.3 | 12.7 | 13.3–22 | 2.9–45.2 |
| Arylsulfatase A | 77.8 | 81.6–133 | 29.4–188 | 149 | 75.4–226 | 25–319 | 137 | 77.8–226 | 41.9–747 |
| β-Glucosidase | 8.6 | 7–12.2 | 4.6–19.9 | 12.4 | 6.1–20 | 4.0–41.7 | 11.7 | 8.6–21.3 | 3.0–62.3 |
| Iduronate-2-sulfatase | 34.6 | 42.4–51.1 | 21.1–71.8 | 63.1 | 33.5–94.5 | 33.7–129 | 53.2 | 34.6–80.4 | 18.7–142 |
| N-Acetylgalactosamine-4-sulfatase | 4.3 | 4.4–8.4 | 1.1–14.8 | 9.9 | 3.6–18.9 | 2.3–23.3 | 8.3 | 4.3–18.1 | 2.3–26.8 |
| Sulfamidase | 8.2 | 4.7–15.4 | 2.6–21.5 | 11.0 | 5.8–21.4 | 2.9–26.6 | 10.0 | 8.2–23.1 | 3.3–48.2 |

^a Adult (*n* = 173).
^b Newborn (*n* = 185).
^c Danish newborn (*n* = 241).

- Quantification simultanée des 9 protéines réalisable sur taches de sang
- Technique relativement simple mais encore longue (>24h/échantillon)
- Technique répétable et reproductible (CV < 15%)

Quantification des protéines déficitaires - 3

(Meikle et al. *Mol Genet Metab* 2006)

■ Résultats ...chez les malades

| Lysosomal proteins (µg/L) in dried blood-spots from affected patients and newborns | | | | | | | | | |
|--|-----------------------------------|----------------|-------------------|-----------|----------------|--------|----------|---------------------------|-------|
| Disorder | Protein marker | Patients | | | Newborns | | | All affected ^a | |
| | | N | Median | Range | N | Median | Range | AUC ^b | p |
| Niemann-Pick type A/B | Acid sphingomyelinase | 5 | n.d. ^c | n.d.–1.5 | | | | 1.000 | 0.000 |
| Fabry disease | α-Galactosidase | 8 | 0.4 | n.d.–5.2 | 3 | 0.8 | n.d.–287 | 0.909 ^d | 0.000 |
| Pompe disease | α-Glucosidase | 27 | 0.12 | n.d.–17.9 | 3 | 0.2 | n.d.–2.6 | 0.999 | 0.000 |
| MPS I | α-Iduronidase | 4 | n.d. | n.d.–n.d. | | | | 1.000 | 0.000 |
| MLD | Arylsulfatase A | 4 | 0.49 | n.d.–2.3 | | | | 1.000 | 0.001 |
| Pseudo MLD | Arylsulfatase A | 4 | 35.1 | 28.8–43.7 | | | | 0.993 | 0.001 |
| Gaucher disease | β-Glucosidase | 7 ^e | 8.9 | 6.2–11.5 | 5 ^f | 3.5 | 0.8–13.5 | 0.847 | 0.000 |
| MPS II | Iduronate-2-sulfatase | 15 | 0.73 | n.d.–19.3 | 4 | 1.3 | 0.6–2.2 | 1.000 | 0.000 |
| MPS VI | N-Acetylgalactosamine-4-sulfatase | 2 | n.d. | n.d.–n.d. | | | | 1.000 | 0.003 |
| MPS IIIA | Sulfamidase | 11 | 0.09 | n.d.–0.4 | 2 | 0.3 | 0.1–0.4 | 1.000 | 0.000 |
| Multiple sulfatase deficiency | N-Acetylgalactosamine-4-sulfatase | 1 | 0.7 | | | | | 1.000 | 0.085 |
| Multiple sulfatase deficiency | Sulfamidase | 1 | 0.4 | | | | | 1.000 | 0.085 |
| Mucopolipidosis II/III | Acid sphingomyelinase | 8 | 962 | 802–1067 | 2 | 688 | 591–786 | 1.000 | 0.000 |
| Mucopolipidosis II/III | Arylsulfatase A | 8 | 1052 | 776–1490 | 2 | 655 | 634–677 | 1.000 | 0.000 |
| Mucopolipidosis II/III | Iduronate-2-sulfatase | 8 | 822 | 636–1024 | 2 | 493 | 473–513 | 1.000 | 0.000 |

La plupart des MSL ont un taux de protéines nul ou très bas permettant une très bonne sensibilité du test de screening

Pb : Pour quelques malades le taux de protéine est normal... MPSII, Fabry, Pompe, Gaucher = utilisation de marqueurs additionnels (ratio, etc)

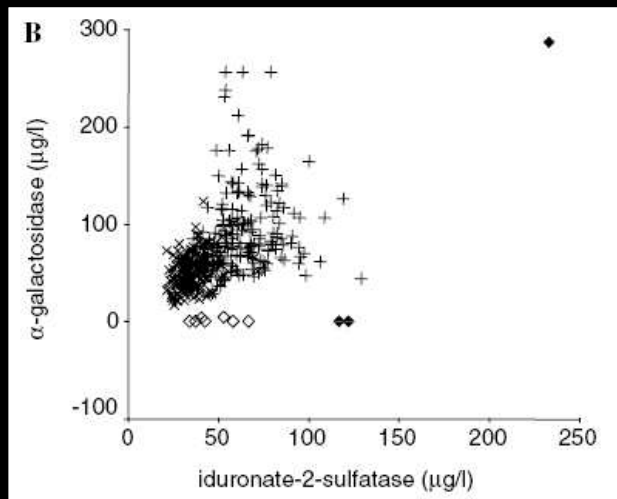
Quantification des protéines déficitaires - 4

(Meikle et al. Mol Genet Metab 2006)

■ Marqueurs secondaires

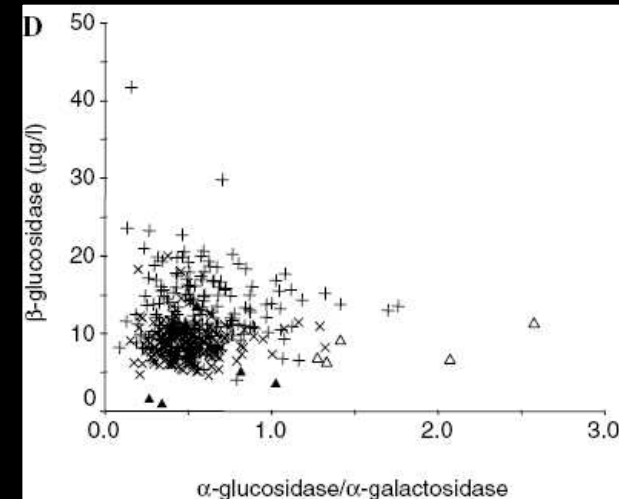
Ex 1 : Fabry

Certains patients ont un taux d'iduronate sulfatase élevé



Ex 2 : Gaucher

Certains patients ont un taux d' α -glucosidase élevé et un taux d' α -galactosidase bas = ratio discriminant



- Amélioration de la sensibilité mais encore insuffisant
- Choix des marqueurs secondaires empirique
- Nécessité de nouveaux marqueurs

Quantification des protéines déficitaires - 5

(Meikle et al. Mol Genet Metab 2006)

- Marqueur = protéine déficiente
- Technologie multiplex performante mais peu utilisée à grande échelle
- Bonne sensibilité mais certaines MSL non détectables
- Intérêt pour les pseudo déficits (MLD)
- Limites de l'approche : mutation faux sens n'entraînant pas toujours une baisse de la quantité de protéine
- Nécessité dans ces cas de marqueurs secondaires ou de ratio pas toujours simples à mettre en œuvre

III - Mesure des activités enzymatiques

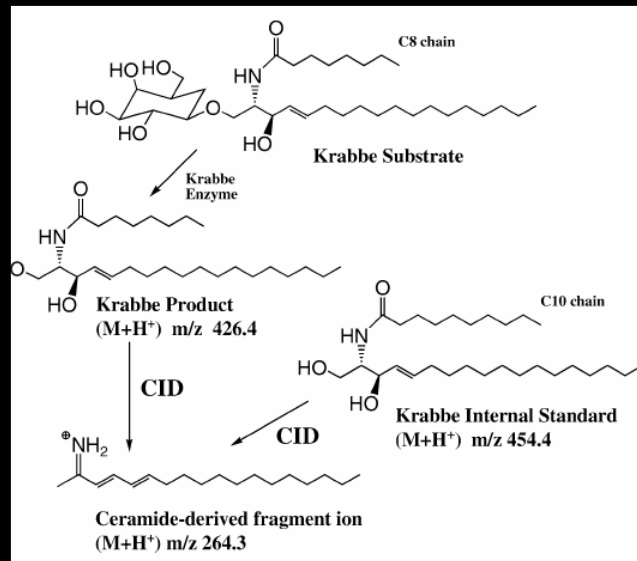
(Li et al. Clin Chem 2004; Chamoles et al. CCA, 2004; Wang et al. Clin Chem 2005;

Gelb et al. JIMD 2006; Wang et al. Clin Chem 2007)

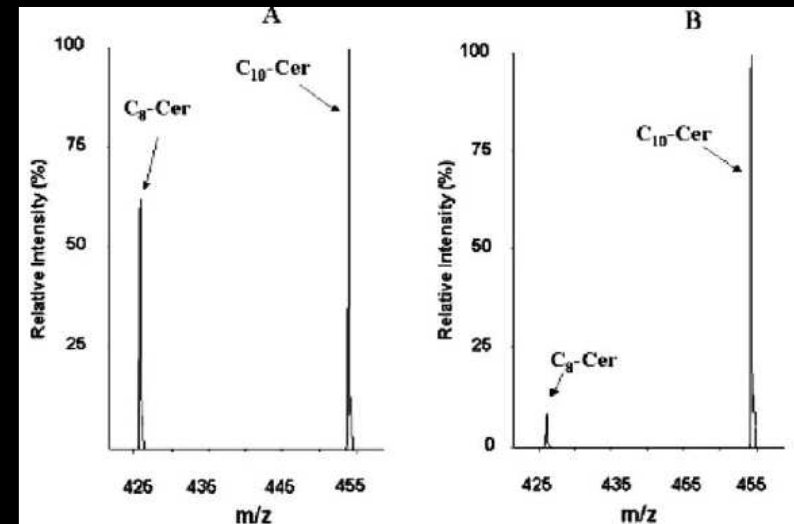
Mesures activités enzymatiques - 1

- Principe : Mesure d'activités enzymatiques / taches de sang adaptée pour la MS/MS
- Développement de substrat spécifiques très proches des substrats naturels + Etalons internes proches du produit de la réaction avec une masse légèrement différente

Exemple : maladie de Krabbe



MS/MS

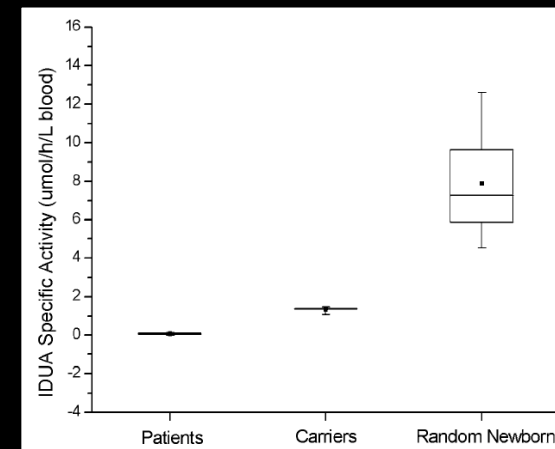
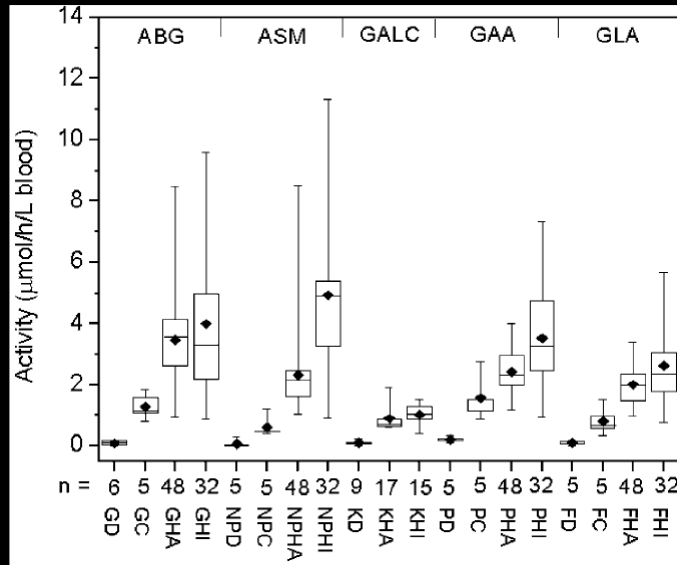


Mesures activités enzymatiques - 2

■ Substrats développés pour :

- Gaucher
- Fabry
- Pompe
- NP A/B
- Krabbe
- MPS I
- MPS II

Chaque produit de réaction
ayant une masse spécifique,
il est possible d'analyser
toutes les activités
enzymatiques simultanément



Mesures activités enzymatiques – 3

- Technique adaptée au dépistage néonatal : volume échantillon, rapide et robuste
- Technique multiplex permettant la mesure simultanée de plusieurs activités enzymatiques
- Excellente sensibilité et spécificité (?)
- Programme en cours pour la maladie de Krabbe
- Limites des pseudo déficits (ajout de marqueur secondaires)
- Toutes les MSL ne sont pas encore développées

Conclusion

- Incidence des MSL entre 1 / 5 000 et 1 / 10 000
- Traitement disponibles + marqueurs disponibles
- Difficultés liées au prélèvement (sang séché, faible vol)
- Dvpt de technologies multiplex : MS/MS – Microbilles
- Nouvelles approches intéressantes : (combinaison?)
 - Dosage métabolites +/-
 - Dosage des protéines enzymatiques ++
 - Mesure activités enzymatiques +++
- Difficulté du pronostic devant un malade dépisté
- Nécessité de projet de recherche prospectifs pour étudier la faisabilité de tels programmes