



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>



Université Claude Bernard  Lyon 1

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1
FACULTE DE PHARMACIE
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

THESE n°221-2022

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 1^{er} septembre 2022 par

Mme ROCHAT Julie

Née le 2 octobre 1995

à Istanbul

APPORT DU DOSAGE DE LA DEOXYSPHINGANINE TOTALE PLASMATIQUE PAR LC/MS-MS DANS LE DIAGNOSTIC DES NEUROPATHIES HEREDITAIRES SENSITIVES ET AUTONOMES DE TYPE 1

JURY

Président du jury : M. Jérôme GUITTON, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

Directeur de thèse : M. David CHEILLAN, Praticien Hospitalier

Autres membres du jury : Mme Nathalie BONELLO, Praticien Hospitalier

Mme Françoise BOUHOUB, Praticien Hospitalier

M. Philippe LATOUR, Praticien Hospitalier

Serment des Pharmaciens Au moment d'être reçu Docteur en Pharmacie,

En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances*
- *D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement*
- *De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité*
- *En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*
- *De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession*
- *De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens*
- *De coopérer avec les autres professionnels de santé.*



L'Apothicaire

(Musée des Hospices Civils de Lyon)

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Date :

Signatures de l'étudiant et du Président du jury

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

- Président
- Président du Conseil Académique
- Vice-Président du Conseil d'Administration
- Vice-Président de la Commission Recherche
- Vice-Président de la Formation et de la Vie Universitaire

Frédéric FLEURY
Hamda BEN HADID
Didier REVEL
Petru MIRONESCU
Céline BROCHIER

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTE

UFR de Médecine Lyon Est	Directeur : Gilles RODE
UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux	Directrice : Carole BURILLON
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Claude DUSSART
UFR d'Odontologie	Directrice : Dominique SEUX
Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation (ISTR)	Directeur : Xavier PERROT

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

UFR Faculté des Sciences (Chimie, Mathématique, Physique)	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI
UFR Biosciences (Biologie, Biochimie)	Directrice : Mme Kathrin GIESELER
Département composante Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département composante Génie Electrique et des procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département composante Mécanique	Directeur : M. Marc BUFFAT
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Polytech Lyon	Directeur : M. Emmanuel PERRIN
I.U.T. LYON 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle. DANIEL

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
ISPB -Faculté de Pharmacie Lyon

LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUES ET PHARMACIE
GALENIQUE**

- **CHIMIE GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**
Monsieur Raphaël TERREUX (PR)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)

- **CHIMIE ANALYTIQUE**
Madame Anne DENUZIERE (MCU)
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU-HDR)
Madame Christelle MACHON (MCU-PH)
Monsieur Waël ZEINYEH (MCU)

- **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**
Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (PR)
Madame Stéphanie BRIANCON (PR)
Monsieur Fabrice PIROT (PU-PH)
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Danielle CAMPIOL ARRUDA (MCU)
Madame Ghania HAMDI-DEGOBERT (MCU-HDR)
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
Madame Giovanna LOLLO (MCU)
Madame Jacqueline RESENDE DE AZEVEDO (MCU)
Monsieur Damien SALMON (MCU-PH)
Madame Eloïse THOMAS (MCU)

- **BIOPHYSIQUE**
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (PR)
Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU-PH-HDR)
Madame Sophie LANCELOT (MCU-PH)
Madame Elise LEVIGOUREUX (MCU-PH)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

- **DROIT DE LA SANTE**
Madame Valérie SIRANYAN (PR)
Madame Maud CINTRAT (MCU)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**
Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU-HDR)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU-HDR)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**
Monsieur Pascal BADOR (MCU-HDR)

- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**
Monsieur Xavier ARMOIRY (PU-PH)
Madame Claire GAILLARD (MCU)

- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**
 Madame Alexandra CLAYER-MONTEBAULT (MCU-HDR)
 Monsieur Vincent GROS (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
 Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH -HDR)
 Madame Pascale PREYNAT (MCU-enseignant contractuel temps partiel)

- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**
 Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU-PH-HDR)
 Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)
 Madame Marie-Paule GUSTIN (MCU-HDR)

- **SANTE PUBLIQUE**
 Monsieur Claude DUSSART (PU-PH)
 Madame Chloë HERLEDAN (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**
 Monsieur Pascal NEBOIS (PR)
 Madame Nadia WALCHSHOFER (PR)
 Madame Amanda GARRIDO (MCU)
 Madame Christelle MARMINON (MCU)
 Madame Sylvie RADIX (MCU-HDR)
 Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU-HDR)

- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**
 Monsieur Marc LEBORGNE (PR)
 Monsieur Thierry LOMBERGET (PR)
 Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU-HDR)
 Monsieur François HALLE (MCU)
 Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)

- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**
 Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (PR)
 Madame Anne-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)
 Madame Isabelle KERZAON (MCU)
 Monsieur Serge MICHALET (MCU)

- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**
 Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (PU-PH)
 Madame Catherine RIOUFOL (PU-PH)
 Madame Magali BOLON-LARGER (MCU-PH)
 Monsieur Teddy NOVAIS (MCU-PH)
 Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)
 Madame Florence RANCHON (MCU-PH)
 Madame Delphine HOEGY (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**
 - Monsieur Jérôme GUITTON (PU-PH)
 - Madame Léa PAYEN (PU-PH)
 - Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)
- **PHYSIOLOGIE**
 - Monsieur Christian BARRES (PR)
 - Madame Kiao Ling LIU (MCU)
 - Monsieur Ming LO (MCU-HDR)
- **PHARMACOLOGIE**
 - Monsieur Sylvain GOUTELLE (PU-PH)
 - Monsieur Michel TOD (PU-PH)
 - Monsieur Luc ZIMMER (PU-PH)
 - Monsieur Roger BESANCON (MCU)
 - Monsieur Laurent BOURGUIGNON (MCU-PH)
 - Madame Evelyne CHANUT (MCU)
 - Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
 - Madame Dominique MARCEL CHATELAIN (MCU-HDR)
- **COMMUNICATION**
 - Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)
- **ENSEIGNANTS CONTRACTUELS TEMPS PARTIEL**
 - Madame Aline INIGO PILLET (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
 - Madame Pauline LOUBERT (MCU-enseignant contractuel temps partiel)

 - Madame Ievgeniia CHICHEROVA (ATER)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**
 - Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)
 - Madame Morgane GOSSEZ (MCU-PH)
 - Monsieur Sébastien VIEL (MCU-PH)
 - Monsieur David GONCALVES (AHU)
- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**
 - Madame Christine VINCIGUERRA (PU-PH)
 - Madame Sarah HUET (MCU-PH)
 - Monsieur Yohann JOURDY (MCU-PH)
 - Madame Amy DERICQUEBOURG (AHU)
- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES**
 - Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH)
 - Madame Florence MORFIN (PU-PH)
 - Madame Veronica RODRIGUEZ-NAVA (PR)
 - Monsieur Didier BLAHA (MCU-HDR)
 - Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)
 - Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH-HDR)
 - Madame Emilie FROBERT (MCU-PH)

- Monsieur Jérôme JOSSE (MCU)
- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**
 - Monsieur Philippe LAWTON (PR)
 - Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
 - Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU-HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**
 - Madame Pascale COHEN (PR)
 - Madame Caroline MOYRET-LALLE (PR)
 - Madame Emilie BLOND (MCU-PH)
 - Monsieur Karim CHIKH (MCU-PH)
 - Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU-PH-HDR)
 - Monsieur Anthony FOURIER (MCU-PH)
 - Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)
 - Monsieur Alexandre JANIN (MCU-PH)
 - Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)
 - Monsieur Olivier MEURETTE (MCU-HDR)
 - Madame Angélique MULARONI (MCU)
 - Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
 - Monsieur Jordan TEOLI (AHU)
- **BIOLOGIE CELLULAIRE**
 - Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)
 - Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU-HDR)

INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (PR)
 Monsieur Philippe LAWTON (PR)
 Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
 Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
 Madame Alexandra MONTEMBault (MCU)
 Madame Angélique MULARONI (MCU)
 Madame Marie-Françoise KLUCKER (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
 Madame Valérie VOIRON (MCU-enseignant contractuel temps partiel)

PR : Professeur des Universités
PU-PH : Professeur des Universités-Praticien Hospitalier
MCU : Maître de Conférences des Universités
MCU-PH : Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier
HDR : Habilitation à Diriger des Recherches
AHU : Assistant Hospitalier Universitaire
ATER : Attaché temporaire d'enseignement et de recherche

Remerciements

A M. le Professeur Jérôme Guitton, Président du jury,

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse d'exercice. Je vous suis reconnaissante de l'intérêt que vous portez à mon travail, et serais ravie de bénéficier de votre expertise sur ce sujet.

A M. le Docteur David Cheillan, directeur de thèse,

Pour m'avoir confié ce travail qui vous tenait à cœur, et permis de m'épanouir et d'explorer tout le sujet des déoxysphingolipides sur cette dernière année. Je vous remercie de m'avoir transmis la passion de la recherche et la curiosité et l'ouverture d'esprit scientifique qui l'accompagne. Merci pour votre confiance.

A Mme le Docteur Nathalie Bonello,

Je vous suis reconnaissante d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse, même de loin. Je vous remercie de votre disponibilité au cours de nos nombreux échanges, de vos conseils avisés et de votre confiance sur la pertinence de mon travail pour vos patients.

A Mme le Docteur Françoise Bouhour,

Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté de faire partie de mon jury et de vous être intéressé à ce sujet de thèse pour y porter un regard clinique et une expertise médicale.

A M. le Docteur Philippe Latour,

Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, et de votre intérêt pour mon travail. Je serai ravie de bénéficier de votre point de vue et de votre expérience en neurogénétique.

A Michèle et Séverine, pour m'avoir initiée et formée aux joies des extractions lipidiques et de la LC-MS/MS, et pour vos précieux conseils techniques.

A toutes l'équipe des Maladies Héritaires du Métabolisme, biologistes et techniciens, merci pour mon intégration dans le service des MHM, et pour ce que vous apportez à ma formation d'interne, tant du point de vue humain que théorique et technique.

Table des matières

Table des figures.....	15
Table des tableaux.....	16
Tables des annexes.....	16
Table des abréviations.....	17
1 Introduction.....	19
2 Contexte scientifique.....	20
2.1 Sphingolipides.....	20
2.1.1 Structure et fonction.....	20
2.1.2 Synthèse et dégradation.....	23
2.2 Pathologies du métabolisme des sphingolipides.....	24
2.2.1 Catabolisme.....	24
2.2.2 Anabolisme.....	27
2.3 L'enzyme SPT.....	29
2.4 Neuropathies Héréditaires Sensitives et Autonomes.....	35
2.5 Neuropathie Héréditaire Sensitive et Autonome de type 1.....	36
2.5.1 Physiopathologie de HSAN1A et HSAN1C.....	39
2.5.2 Génétique de HSAN1A et HSAN1C.....	42
2.5.3 Diagnostic et traitement.....	45
2.6 Autres pathologies liées au métabolisme de SPT.....	48
2.6.1 Anomalies génétiques.....	48
2.6.2 Pathologies acquises.....	50
2.7 Spectrométrie de masse en tandem.....	51
3 Matériels et méthodes.....	53
3.1 Echantillons biologiques.....	53
3.2 Bases sphingoïdes étudiées.....	54
3.3 Réactifs utilisés.....	55
3.4 Spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).....	55
3.5 Chromatographie liquide (LC).....	55
3.6 Préparation des échantillons.....	55
3.7 Mise en place de la méthode.....	56
3.8 Validation technique.....	56
3.9 Analyse statistique.....	56
4 Résultats.....	57

4.1	Mise en place de la méthode	57
4.1.1	Chromatographie liquide (LC)	57
4.1.2	Spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).....	58
4.1.3	Préparation des échantillons.....	59
4.2	Validation de méthode.....	60
4.2.1	Gamme externe.....	60
4.2.2	Contrôles internes de qualité et fidélité intermédiaire	60
4.2.3	Répétabilité	61
4.2.4	Contamination inter-échantillons	61
4.2.5	Limite de détection, de quantification et de linéarité	62
4.3	Valeurs normales.....	63
4.4	Patients avec suspicion de HSAN1	66
4.4.1	Renseignements cliniques.....	66
4.4.2	Génétique moléculaire.....	68
4.4.3	Dosage de la dSA totale plasmatique.....	68
5	Discussion.....	71
	Bibliographie.....	81

Table des figures

Figure 1 : Structure chimique générale des sphingolipides	20
Figure 2 : Synthèse des sphingolipides, d'après Lahiri et al. (2).....	21
Figure 3 : Diversité structurale et fonctionnelle des sphingolipides, d'après Proia (4)	22
Figure 4 : Synthèse de novo des sphingolipides.....	23
Figure 5 : Modèle théorique de la structure de la SPT d'après Hornemann et al. (45)	31
Figure 6 : Structures chimiques de la sphinganine et de la sphingosine	33
Figure 7 : Structure théorique du complexe SPT avec les différentes sous unités protéiques, d'après Li et al. (54).....	34
Figure 8 : Structure chimique des premières bases déoxysphingoïdes découverts dans un contexte de HSAN1.....	39
Figure 9 : Synthèse de novo des déoxysphingolipides.....	40
Figure 10 : Ulcérations distales et amputations retrouvées chez des patients HSAN1 (69,118)...	46
Figure 11 : Laboratoires référencés réalisant la recherche des variants de <i>SPTLC1</i> et <i>SPTLC2</i> par biologie moléculaire en France	47
Figure 12 : Principe d'un spectromètre de masse en tandem, d'après Cheillan (134)	51
Figure 13 : Hydrolyse acide des déoxy-dihydrocéramides.....	54
Figure 14 : Bases sphingoïdes étudiées.....	54
Figure 15 : Profil de la dSA totale plasmatique d'un patient contrôle et de son SI en LC-MS/MS	58
Figure 16 : Courbe d'Horwitz pour la détermination graphique de la limite de quantification	62
Figure 17 : Détermination graphique de la limite haute de linéarité	62
Figure 18 : Répartition des patients contrôles par sexe et par catégorie d'âge	63
Figure 19 : Concentration de dSA totale plasmatique en fonction de l'âge chez les patients contrôles.....	64
Figure 20 : Histogramme de fréquence des concentrations plasmatiques de dSA totale chez les patients contrôles et comparaison à une répartition gaussienne	65
Figure 21 : Répartition des concentrations en dSA totale en fonction du sexe chez les patients contrôles.....	65
Figure 22 : Répartition de la concentration en dSA totale plasmatique chez les patients contrôles et avec suspicion de HSAN1	70

Table des tableaux

Tableau 1 : Principales caractéristiques des sphingolipidoses, d’après Vanier et al. (19,20).....	26
Tableau 2 : Principales caractéristiques des pathologies de l’anabolisme des sphingolipides	28
Tableau 3 : Récapitulatif des différents sous-types de HSAN1	37
Tableau 4 : Principaux variants décrits de <i>SPTLC1</i> et <i>SPTLC2</i> dans HSAN1.....	44
Tableau 5 : Impact de la composition de la colonne de chromatographie liquide sur le temps de rétention et la quantification de dSA totale	57
Tableau 6 : Transitions retenues pour le dosage des bases déoxysphingoides étudiées, mode d’ionisation sélectionné et temps de rétention chromatographiques	59
Tableau 7 : Impact de la sonication et de l'hydrolyse acide sur la quantification de dSA totale plasmatique.....	60
Tableau 8 : Validation de la méthode : résultats de l’étude de la contamination inter-échantillon, domaine de mesure, répétabilité (variabilité intra série) et fidélité intermédiaire (variabilité inter séries)	61
Tableau 9 : Valeurs normales établies de dSA totale plasmatique.....	64
Tableau 10 : Principales caractéristiques cliniques des patients avec suspicion de HSAN1.....	67
Tableau 11: Variants identifiés chez les douze patients avec suspicion de HSAN1 et apport des résultats du test fonctionnel dans leur classification.....	69

Tables des annexes

Annexe 1 : Formulaire de recueil des données cliniques.....	93
Annexe 2 : Protocole de dosage de la déoxysphinganine totale plasmatique par LC-MS/MS.....	95

Table des abréviations

HSAN1 Neuropathie Héréditaire Sensitive et Autonome de type 1 – *type 1 Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathy*

SPT Sérine Palmitoyl Transférase

SL Sphingolipide

dSL déoxysphingolipide

dSA déoxysphinganine

LC-MS/MS Spectrométrie de Masse en tandem couplée à de la Chromatographie Liquide

HCL Hospices Civils de Lyon

Palmitoyl-CoA palmitoyl-Coenzyme A

AR Autosomique Récessif

AD Autosomique Dominant

AOS α -Oxoamine Synthases

Acyl-CoA acyl-Coenzyme A

PLP phosphate de pyridoxal

SPTLC1 Serine Palmitoyl Transferase Long Chain base subunit 1

SPTLC2 Serine Palmitoyl Transferase Long Chain base subunit 2

SPTLC3 Serine Palmitoyl Transferase Long Chain base subunit 3

ssSPTa small subunit Serine Palmitoyl Transferase a

ssSPTb small subunit Serine Palmitoyl Transferase b

ORMDL Orosomucoïde-like protein

HMN Neuropathies Héréditaires Motrices

HMSN Neuropathies Héréditaires Motrices et Sensitives

CMT Charcot-Marie-Tooth

HSAN Neuropathies Héréditaires Sensitives et Autonomes

HSN Neuropathies Héréditaires Sensitives

CMT2B Charcot-Marie-Tooth de type 2B

HPLC Chromatographie Liquide à Haute Performance

LC-MS Spectrométrie de Masse couplée à de la Chromatographie Liquide

dSO déoxisphingosine

Km Constante de Michaelis

Vmax Vitesse initiale maximale

SLA Sclérose Latérale Amyotrophique

VUS variants de pathogénicité incertaine

ACMG *American College of Medical Genetics and Genomics*

AMP *Association for Molecular Pathology*

SNV *Single Nucleotide Variants*

NGS *Next Generation Sequencing*

CMTNS *Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Score*

NAFLD *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*

NASH *Non Alcoholic SteatoHepatitis*

MS/MS Spectrométrie de Masse en tandem

MRM Multiple Reaction Monitoring

SI Standard Interne

D3-dSA D3-1-déoxysphinganine

LC Chromatographie Liquide

ACN acétonitrile

COFRAC Comité Français d'Accréditation

DP Declustering Potentiel

CE Collision Energy

PM Poids Moléculaire

[ESI+] Positive ElectroSpray Ionisation

RT temps de rétention

CV Coefficient de Variation

LoQ Limite de Quantification

MI Membres Inférieurs

MS Membres Supérieurs

1 Introduction

Les Neuropathies Héréditaires Sensitives et Autonomes de type 1, ou *type 1 Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathy* (HSAN1) sont la cause la plus fréquente de neuropathies sensibles héréditaires de transmission autosomique dominante (AD). Elles sont caractérisées par une perte de sensibilité distale, pouvant se compliquer d'ulcérations chroniques. Cette atteinte sensitive peut être accompagnée de troubles moteurs ou autonomes variables. HSAN1 est associée à l'existence de variants des gènes *SPTLC1* et *SPTLC2*, qui codent pour les deux sous-unités qui composent la Sérine Palmitoyl Transférase (SPT). Cette enzyme réalise la première étape de la synthèse de novo des sphingolipides (SL). Les variants entraînent une modification du substrat préférentiel de l'enzyme, qui aboutit à l'accumulation de déoxysphingolipides, des SL atypiques et cytotoxiques. Actuellement, le diagnostic de cette pathologie est réalisé par confrontation de l'histoire familiale et de la clinique aux résultats de l'analyse génétique. Grâce aux nouvelles données d'exome, de nouveaux variants des gènes *SPTLC1* et *SPTLC2* sont mis en évidence, sans que leur caractère délétère soit établi. La mise en place d'un test fonctionnel pour caractériser ces variants et établir un diagnostic devient donc indispensable. Cette caractérisation fonctionnelle s'appuie sur l'impact des variants sur le métabolisme des SL, l'accumulation de dSL étant un biomarqueur de la maladie.

Ce travail de thèse est donc centré sur la mise en place du dosage de déoxysphinganine (dSA) totale plasmatique par spectrométrie de masse en tandem couplée à de la chromatographie liquide (LC-MS/MS) dans l'Unité Médicale Pathologies métaboliques, érythrocytaires et dépistage périnatal du Service de Biochimie et Biologie Moléculaire des Hospices Civils de Lyon (HCL). Les résultats de ce dosage serviront à étayer le faisceau d'arguments servant au diagnostic de HSAN1, et à conclure quant à la pathogénicité de nouveaux variants étudiés.

2 Contexte scientifique

2.1 Sphingolipides

Les SL sont une catégorie de lipides complexes, que ce soit du point de vue structurel ou fonctionnel. Ils ont été découverts à la fin du 19^{ème} siècle par Johann Ludwig Wilhelm Thudichum, un médecin et biochimiste d'origine allemande. (1) Au cours de ses nombreuses études sur la composition du cerveau, il isole et identifie différents composants dont la sphingomyéline, qu'il nomme ainsi en référence au sphinx, animal aussi énigmatique que la structure et la fonction du composé à l'époque.

2.1.1 Structure et fonction

Les SL sont caractérisés par leur base sphingoïde. Celle-ci est associée par une liaison amide à un acide gras à très longue chaîne ($C \geq 14$), saturé ou monoinsaturé, pour former un céramide. Les céramides sont des intermédiaires métaboliques à partir desquels vont être synthétisés les SL complexes. En effet, l'association de la base sphingoïde et de l'acide gras va former la partie apolaire du SL, sur laquelle va venir se greffer la queue polaire. (Figure 1)

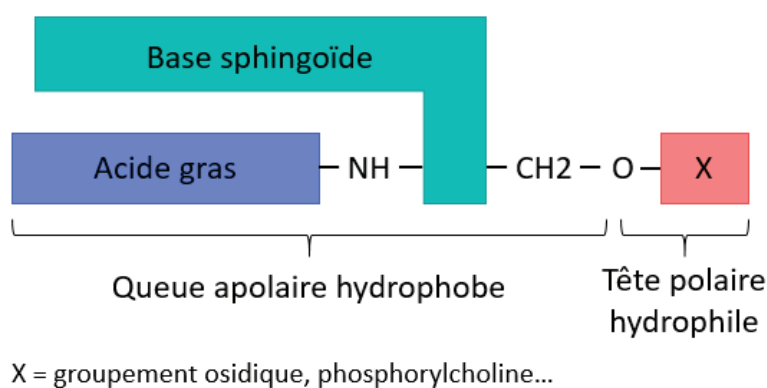


Figure 1 : Structure chimique générale des sphingolipides

En fonction de la nature de cette queue polaire, on va distinguer différentes classes de SL, divisées en 2 grandes catégories : les phosphosphingolipides et les glycosphingolipides. Les phosphosphingolipides sont représentés par la sphingomyéline, composée d'un céramide lié à un résidu choline par une liaison phosphodiester. Les glycosphingolipides ont une queue polaire présentant un ou plusieurs résidus osidiques.

On distingue : les sulfatides, chez lesquels un des oses de la queue polaire est sulfaté, les cérébrosides (glucosylcéramides et lactosylcéramides), chez lesquels la queue polaire est composée d'un ou plusieurs oses neutres, et enfin les gangliosides, avec un groupement polaire composé de deux résidus osidiques ou plus, dont au moins un estérifié par un acide sialique. (Figure 2)

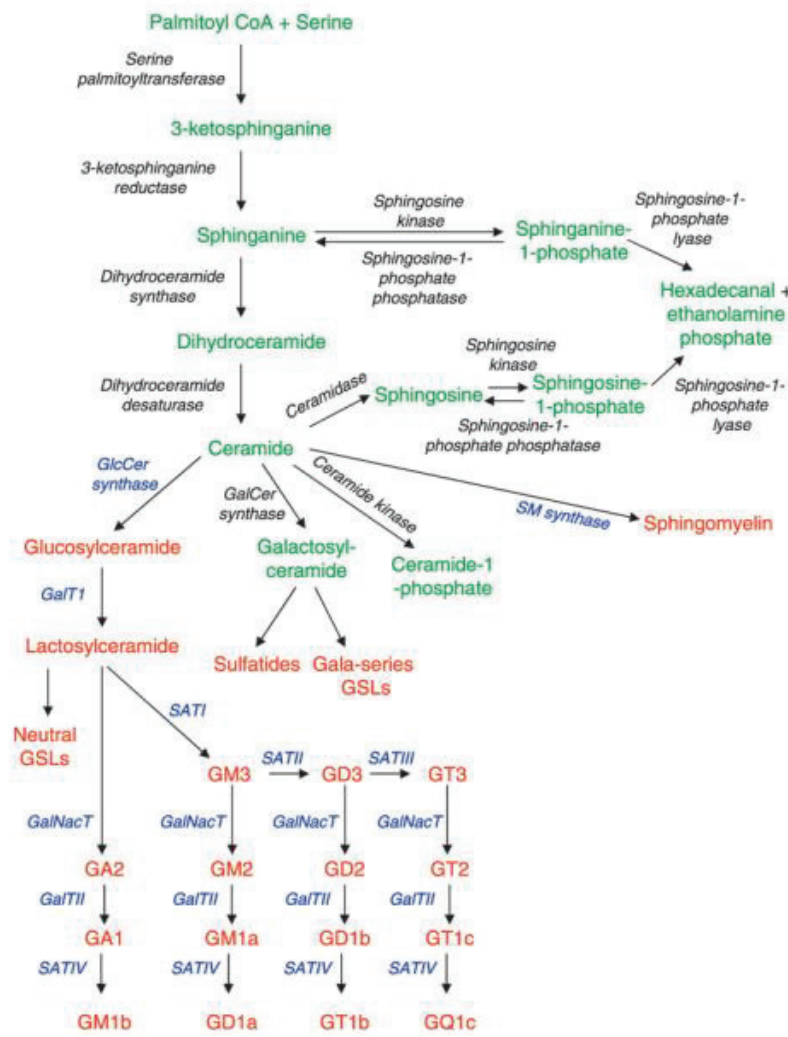


Figure 2 : Synthèse des sphingolipides, d'après Lahiri et al. (2)

Les SL présentent donc une très grande variabilité structurale puisque la base sphingoïde peut varier, la longueur et l'état de saturation de l'acide gras permettant la formation du céramide également, et il existe une très grande variabilité au niveau de la composition du groupement polaire. Actuellement plus de deux cents espèces de SL différentes ont été identifiées, avec des fonctions cellulaires très variées. (3) (Figure 3)

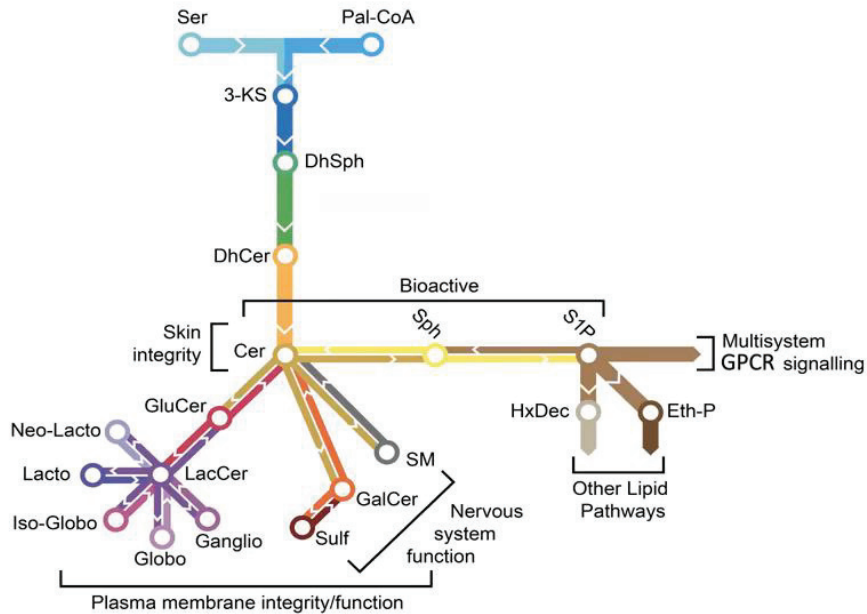


Figure 3 : Diversité structurelle et fonctionnelle des sphingolipides, d'après Proia (4)

Avec les glycérolipides et les stérols, les SL sont des composés essentiels et ubiquitaires des membranes cellulaires eucaryotes. Ils sont regroupés au sein de la couche externe de ces membranes sous forme de rafts lipidiques, également riches en cholestérol et protéines spécifiques. (5) Ces rafts ont des fonctions cellulaires majeures de signalisation/transduction de signal et de trafic membranaire. Les SL ont également des rôles d'intermédiaires dans la signalisation cellulaire, notamment dans certaines voies d'apoptose et dans la survie, la différenciation et la prolifération cellulaires. (6) Les différents types de SL peuvent avoir des fonctions spécifiques : lipides majoritaires du *stratum corneum* au niveau de l'épiderme pour les céramides, participation au système immunitaire, constituant de la gaine de myéline des axones pour la sphingomyéline... Les SL sont donc impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires et ont un rôle structurel majeur. Une dérégulation de cette voie métabolique pourrait donc avoir de nombreux impacts.

2.1.2 Synthèse et dégradation

Les SL de l'organisme peuvent être issus de trois voies : la synthèse *de novo*, l'apport exogène par l'alimentation, notamment par les produits laitiers entiers, et la voie de sauvetage à partir des SL complexes, qui est majoritaire.

La SPT catalyse la première étape de la synthèse *de novo* des SL. (7) Celle-ci correspond à la condensation de la L-sérine avec un dérivé d'acide gras, le Palmitoyl-Coenzyme A (palmitoyl-CoA), pour donner la 3-keto-sphinganine, qui est ensuite réduite en sphinganine. (8,9) Une céramide synthase permet de lier un acide gras à longue chaîne à cette base sphingoïde via une liaison amide, pour donner un dihydrocéramide, puis un céramide grâce à une désaturase. (10,11) (Figure 4) Il existe six isoformes de céramide synthase, avec chacune une répartition tissulaire différente. Chaque isoforme présente une prédilection pour une certaine longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras, participant ainsi à la diversité de structure des SL. (12)

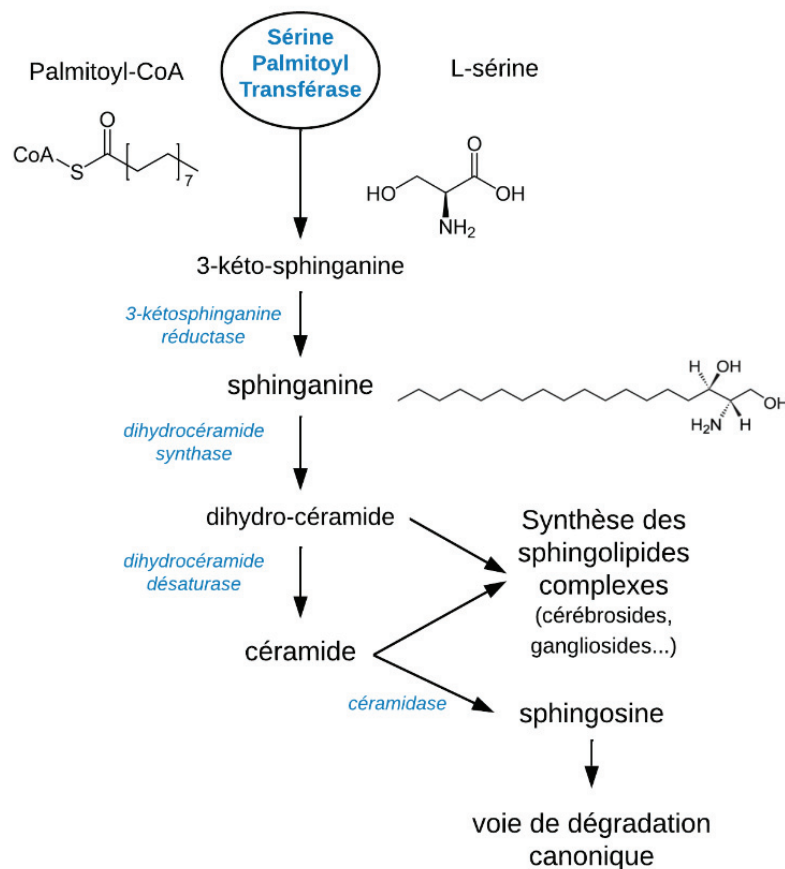


Figure 4 : Synthèse *de novo* des sphingolipides

Cette synthèse *de novo* des céramides se réalise au niveau de la membrane cytosolique du réticulum endoplasmique. Les céramides synthétisés sont ensuite transportés jusqu'à l'appareil de Golgi, où ils vont être métabolisés en SL complexes par addition d'un groupement polaire. (13)

Les céramides sont des intermédiaires métaboliques à partir desquels vont être synthétisés les SL complexes, mais qui permettent aussi d'accéder à la voie de dégradation canonique des SL. En effet, les SL complexes peuvent perdre leur groupement polaire par l'action d'enzymes majoritairement lysosomales (sphingomyélinase, glucocérébrosidase...), et ainsi redonner un céramide. Celui-ci peut être dégradé en sphingosine par l'action d'une céramidase, qui va rompre la liaison amide entre la base sphingoïde et l'acide gras à longue chaîne. Cette sphingosine peut soit être de nouveau métabolisée en céramide et permettre la synthèse de nouveaux SL complexes, ce qui correspond à la voie de sauvetage des SL, (14) soit former un intermédiaire catabolique par l'action de la sphingosine-1-kinase. Celle-ci phosphoryle la sphingosine pour donner la sphingosine-1-phosphate. C'est le métabolite final de la voie de dégradation des SL, qui peut être déphosphorylé ou irréversiblement clivé par la sphingosine-1-phosphate lyase. (15)

Le métabolisme des SL est donc complexe, et comprend de nombreuses enzymes, à la fois pour la synthèse ou le catabolisme de ces composés. Des pathologies sont associées à ces différentes étapes du métabolisme.

2.2 Pathologies du métabolisme des sphingolipides

2.2.1 Catabolisme

Les principales pathologies touchant le métabolisme des SL sont des défauts de catabolisme, appelées sphingolipidoses. (16) Elles font partie, avec notamment les mucopolysaccharidoses, les mucolipidoses et les oligosaccharidoses, de la grande famille des maladies de surcharge lysosomale. (17) Le lysosome est un organe cellulaire qui a pour rôle la dégradation des macromolécules intra et extracellulaires qui y pénètrent, que

ce soit par phagocytose, endocytose ou autophagie. Cette dégradation est réalisée par de nombreuses enzymes qui peuvent nécessiter l'intervention de cofacteurs.

Les sphingolipidoses sont des maladies génétiques causées par un défaut des gènes codant pour les protéines impliquées dans le catabolisme des SL. Ces protéines peuvent être les enzymes lysosomales en elles-mêmes, ou les protéines activatrices de SL. Ces dernières sont des cofacteurs qui activent directement l'enzyme ou favorisent l'interaction entre les SL et les enzymes hydrosolubles. A chaque étape de la dégradation lysosomale des SL complexes correspond un ou plusieurs défauts génétiques identifiés et caractérisés, qui permettent de définir les différentes sphingolipidoses. (Tableau 1) Ces sphingolipidoses présentent un spectre clinique large, touchant notamment le système nerveux central mais également d'autres organes (foie, reins, cœur, ...). L'apparition clinique de la maladie et la sévérité de celle-ci sont directement corrélées à l'activité enzymatique résiduelle. De manière générale, ce sont des pathologies progressives et plurisystémiques.

Le diagnostic des sphingolipidoses peut être réalisé à différents niveaux : biochimique, enzymatique ou génétique. Il est possible de doser le produit de surcharge et ses dérivés, dans les urines ou le plasma, pour identifier l'étape du catabolisme qui fait défaut. L'analyse de l'activité enzymatique est réalisée majoritairement sur leucocytes ou à partir de sang déposé sur buvard. La confirmation de la maladie par analyse génétique permet d'identifier le ou les variant(s) impliqué(s), et par la suite de réaliser du conseil génétique dans la famille.

Les traitements étiologiques des sphingolipidoses visent à restaurer l'activité enzymatique déficiente (17,18). La thérapie substitutive par remplacement enzymatique est la stratégie la plus répandue, mais il existe des alternatives comme les protéines chaperonnes, les thérapies à médiation cellulaire ou dans le meilleur des cas la thérapie génique. La réduction de substrat est une stratégie complémentaire de ces thérapies. Elle consiste à réduire le flux de substrat et donc son accumulation en utilisant des inhibiteurs de la synthèse des SL.

Tableau 1 : Principales caractéristiques des sphingolipidoses, d'après Vanier et al. (19,20)

Pathologie	Transmission	Protéine déficiente	Gène	Composés accumulés	Diagnostic biologique
Gangliosidose à GM1 / Landing	AR	β galactosidase	<i>GLB1</i>	Ganglioside GM1, Mucopolysaccharides et oligosaccharides	LysoGM1 plasmatique, Profil des oligosaccharides urinaire, activité enzymatique leucocytaire, génétique moléculaire
Gangliosidose à GM2	AR	Sandhoff : Hexosaminidase A et B	<i>HEXA</i>	Ganglioside GM2	Activité enzymatique leucocytaire, génétique moléculaire
		Tay-Sachs : Hexosaminidase A	<i>HEXB</i>		
		Protéine activatrice du GM2	<i>GM2A</i>		
Maladie de Fabry	liée à l'X	α galactosidase A	<i>GLA</i>	Globotriaosylcéramide	Gb3 urinaire, LysoGb3 plasmatique, activité enzymatique, génétique moléculaire
Maladie de Gaucher	AR	β glucocérébrosidase Saposine C	<i>GBA</i> <i>PSAP</i>	Glucosylcéramide	LysoGlucosylcéramide plasmatique, activité de la chitotriosidase plasmatique, génétique moléculaire
Leucodystrophie métachromatique	AR	Arylsulphatase A Saposine B	<i>ARSA</i> <i>PSAP</i>	Sulfatides	Sulfatides urinaires Activité enzymatique leucocytaire, génétique moléculaire
Maladie de Krabbe	AR	β galactocérébrosidase Saposine A	<i>GALC</i> <i>PSAP</i>	Galactocébroside ou Galactosylcéramide	LysoGalactosylCéramide plasmatique, activité enzymatique leucocytaire, génétique moléculaire
Maladie de Niemann-Pick A/B	AR	Sphingomyélinase	<i>SMPD1</i>	Sphingomyéline	LysoSphingomyéline, activité enzymatique leucocytaire, génétique moléculaire
Maladie de Farber Lipogranulomatose de Farber	AR	Céramidase Saposine D	<i>ASAH1</i> <i>PSAP</i>	Céramides	Activité enzymatique leucocytaire, génétique moléculaire

AR : Autosomique Récessive

2.2.2 Anabolisme

Si les pathologies touchant le catabolisme des SL sont bien identifiées, caractérisées et relativement nombreuses, celles touchant leur synthèse sont moins répandues et plus récemment décrites. D'un point de vue biochimique, un déficit de catabolisme se traduit par une accumulation du substrat qui n'est pas dégradé, et potentiellement de ses dérivés s'il en existe. A l'inverse, les anomalies de synthèse sont associées à une diminution significative d'un métabolite connu. Pour que les résultats aient une pertinence clinique, il est nécessaire d'avoir une sensibilité technique suffisante, avec des limites de détection et de quantification suffisamment basses. Dans les cas de défaut anabolique, c'est majoritairement l'analyse génétique qui permet de poser le diagnostic.

Historiquement, le déficit en GM3 synthase est la première anomalie de l'anabolisme des SL à avoir été décrite, en 2004. (21) En comparaison, la maladie de Gaucher, qui est la première maladie lysosomale décrite, a été caractérisée cliniquement par le médecin français Philippe Gaucher dans sa thèse de médecine en 1882. (22) Son fondement biologique a été élucidé en 1965, avec mise en évidence d'un déficit enzymatique sur la voie de catabolisme des glucocérebrosides. (23)

Actuellement, cinq étapes du métabolisme des SL sont associées à des anomalies génétiques, allant de la première étape de novo par la SPT à la synthèse des gangliosides. (Tableau 2) Deux gènes codant pour des glycosyltransférases impliquées dans la synthèse des gangliosides ont été identifiés comme pouvant présenter des variations délétères : *ST3GAL5* et *B4GALNT1*. Les variants pathogènes de ces gènes sont associés à des pathologies neurodégénératives, ce qui est cohérent avec l'abondance et l'importance des gangliosides au niveau du système nerveux central. Une hypothèse a cependant été formulée sur une possible redondance fonctionnelle des différents glycosphingolipides et gangliosides, qui permettrait de minimiser l'impact de la perte de fonction d'une des enzymes de synthèse. (24) Les gangliosides non touchés pourraient partiellement remplacer ceux non synthétisés, et assurer leurs fonctions cellulaires.

Tableau 2 : Principales caractéristiques des pathologies de l'anabolisme des sphingolipides

Pathologie	Transmission	Protéine concernée	Gènes	Mécanisme	Phénotype majoritaire	Diagnostic biologique	Références
Neuropathie Héréditaire Sensitive et Autonome de type 1	AD	SPT	<i>SPTLC1, SPTLC2</i>	Modification de fonction	Perte de sensibilité distale, atteinte motrice et autonome variable	Déoxysphingolipides plasmatiques, analyse génétique	(25,26)
Leucodystrophie associée à <i>DEGS1</i>	AR	dihydrocéramide désaturase	<i>DEGS1</i>	Perte de fonction	Déficit intellectuel variable, tétraplégie spastique, épilepsie	Analyse génétique, rapport dihydrocéramides / céramides	(27,28)
Syndrome d'Insuffisance en Sphingosine Phosphate Lyase (SPLIS)	AR	Sphingosine 1-phosphate lyase	<i>SGPL1</i>	Perte de fonction	Syndrome néphrotique corticoïde-résistant, neuropathie centrale et périphérique, insuffisance surrénalienne primaire	Analyse génétique	(15,29)
Déficit en GM3 synthase	AR (répandu dans la communauté Amish)	GM3 synthase	<i>ST3GAL5</i>	Perte de fonction	Syndrome épileptique d'apparition précoce, « <i>Salt and Pepper Mental Retardation Syndrome</i> »	GM3 plasmatique, analyse génétique	(21,30,31)
Paraplégie Spastique Héréditaire (HSP)	AR	GM2/GD2/GA2 synthase	<i>B4GALNT1</i>	Perte de fonction	Faiblesse et spasticité progressive des membres inférieurs, atteintes cognitives	Analyse génétique	(24,32)

AD : Autosomique Dominante, AR : Autosomique Récessive

Dans le cas des variants des gènes *ST3GAL5* et *B4GALNT1*, la perte de fonction enzymatique a un impact limité par le fait qu'elle concerne une des étapes finales de la synthèse des gangliosides complexes. De la même manière, les étapes qui concernent la sphingosine 1-phosphate lyase et la dihydrocéramide désaturase ne sont pas limitantes pour la synthèse des SL complexes. A l'inverse, une perte de fonction totale sur l'enzyme de la synthèse *de novo* des SL n'est pas viable : un déficit complet de l'enzyme SPT est létal au stade embryonnaire. (33,34) En effet, plus la modulation touche une étape précoce de la synthèse, plus les répercussions seront importantes. Dans le cas des SL, il n'existe qu'une seule voie de synthèse canonique. Celle-ci ne peut donc pas subir de perte de fonction enzymatique totale, puisque cela entraînerait un déficit dans toutes les espèces de SL, qui remplissent des fonctions cellulaires majeures.

Si une perte de fonction n'est pas viable, il n'en est pas de même pour un gain ou une modification de fonction. Dans ce contexte et pour ce travail de thèse, la SPT est l'enzyme d'intérêt.

2.3 L'enzyme SPT

La SPT appartient à la famille des α -Oxoamine Synthases (AOS), des enzymes qui réalisent une condensation de Claisen d'un acide aminé et d'un acyl-Coenzyme A (acyl-CoA). Plus largement, les AOS font partie de la superfamille des enzymes phosphate de pyridoxal (PLP) dépendantes. (35) Toutes ces enzymes présentent un domaine de liaison au PLP hautement conservé, proche d'un résidu Lysine, également hautement conservé. C'est la liaison de ce résidu Lysine avec le PLP qui forme une base de Schiff et permet la réaction enzymatique. (7) La SPT catalyse de manière préférentielle la condensation du palmitoyl-CoA avec la L-sérine. (7,36,37)

A la différence des autres AOS, qui se présentent sous la forme d'homodimères solubles, la SPT est un hétérodimère membranaire. Elle est composée de l'association de la sous-unité SPTLC1 (*Serine Palmitoyl Transferase Long Chain base subunit 1*) avec une seconde sous-unité, soit SPTLC2, soit SPTLC3. (38,39) Ces trois isoformes possèdent un domaine hydrophobe transmembranaire à l'extrémité N-terminale, mais seules SPTLC2 et SPTLC3 présentent un domaine de liaison au PLP. Ce sont donc les sous-unités

responsables de l'activité catalytique. (7,39) Cependant, le domaine catalytique se situe à l'interface entre les sous-unités composant l'hétérodimère. Les sous-unités SPTLC1 et SPTLC2 sont exprimées de manière ubiquitaire, tandis que SPTLC3 a une expression tissu-spécifique restreinte au placenta, au foie et à la peau. (39,40)

La SPT est localisée au niveau du réticulum endoplasmique. (41) Elle présente un domaine transmembranaire, et une partie libre comportant le domaine catalytique, située du côté cytosolique de la membrane du réticulum endoplasmique. La condensation de la L-sérine avec le palmitoyl-CoA va donc se réaliser dans le cytosol de la cellule, au niveau du réticulum endoplasmique.

Le gène *SPTLC1* est composé de 22 exons, ce qui équivaut à environ 85 kpb, situés sur le chromosome 9q22.1-q22.3. (42,43) Ce gène code pour une protéine de 473 acides aminés et d'environ 53 kDa (UniProtKB - O15269). Le gène *SPTLC2*, situé sur le chromosome 14q24.3, est composé d'environ 100 kpb répartis en 13 exons, codant pour une sous-unité SPTLC2 d'environ 63 kDa (UniProtKB - O15270). *SPTLC3* est composé de 12 exons, situés sur le gène 20p12.3-p12.1 (UniProtKB - Q9NUV7). La protéine correspondante fait 562 acides aminés et environ 62 kDa. SPTLC2 et SPTLC3 présentent environ 70% d'homologie, alors que SPTLC1 présente environ 20% de similarité de séquence avec les deux autres isoformes. (38,39) Il existe des variants d'épissage de ces gènes, mais leur expression n'a à priori pas d'incidence sur l'activité de l'enzyme SPT ou sur le profil de synthèse des SL. (13,44)

L'unité responsable de l'activité catalytique de l'enzyme SPT est formée de l'hétérodimère composé de l'association de SPTLC1 et SPTLC2 ou SPTLC3. Cependant, des études sur la conformation de l'enzyme ont démontré que cela n'était peut-être pas aussi simple *in vivo*. En effet, des analyses par chromatographie d'exclusion et électrophorèse sur gel de polyacrylamide (BN-PAGE) sur la protéine native ont mis en évidence un complexe enzymatique d'une masse moléculaire de 480 kDa. (45) Or en additionnant les masses des sous-unités composant un hétérodimère, celui-ci devrait avoir un poids théorique d'environ 120 kDa. Les différentes sous-unités de SPT seraient donc organisées dans une structure plus complexe. De l'immunoprécipitation a confirmé que les trois différentes sous-unités étaient exprimées et coexistaient au sein d'un même complexe

SPT. (45) La richesse relative de ce complexe en SPTLC2 et SPTLC3 varie en fonction du tissu concerné, puisque l'expression de SPTLC3 est tissu-dépendante. L'enzyme SPT serait donc un complexe protéique composé d'une association d'hétérodimères formant des unités catalytiques. Bien que l'organisation de ce complexe n'ait pas encore été totalement élucidée, le modèle retenu reste celui d'un octamère, composé de quatre hétérodimères. (Figure 5)

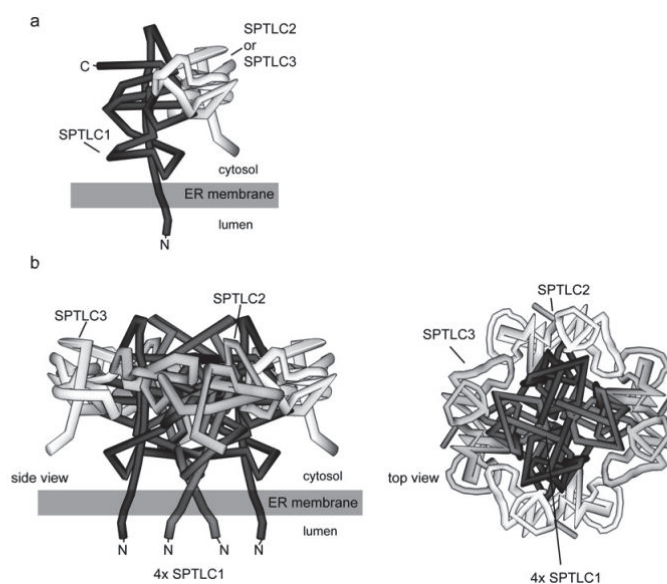


Figure 5 : Modèle théorique de la structure de la SPT d'après Hornemann et al. (45)

a : Structure théorique du dimère SPTLC1 et SPTLC2 ou SPTLC3. b : Structure théorique du complexe octamérique de la SPT

Il existe deux petites protéines, appelées small subunit SPT a et b (ssSPTa et ssSPTb), qui interagissent avec l'enzyme SPT. Elles ont été découvertes plus tardivement, à la suite du constat que l'hétérodimère SPTLC1-SPTLC2 n'était pas suffisant en lui-même pour obtenir une activité enzymatique optimale. (46) En effet, les cellules eucaryotes transfectées par *SPTLC1* et *SPTLC2* ne montraient qu'une faible élévation de leur activité enzymatique, malgré une forte expression protéique. Chez les levures, une petite protéine de 80 acides aminés, régulatrice de la SPT, Tsc3p avait été mise en évidence, sans analogue chez les eucaryotes. (7,47) Cette petite protéine interagit avec les sous unités formant le dimère de SPT, et augmente l'activité enzymatique de ce dernier. Chez des cellules eucaryotes, un screening a mis en évidence deux gènes codants pour deux protéines ssSPTa et ssSPTb, de respectivement 71 et 76 acides aminés. Pour valider le rôle

de ces entités, la sous-unité ssSPTa a été co-exprimée avec les autres sous-unités de SPT chez des cellules lymphocytes B déficientes en SPTLC1 endogène. (46) L'activité enzymatique résultante est environ dix fois supérieure à celle retrouvée dans les cellules exprimant seulement l'hétérodimère SPTLC1-SPTLC2. Une augmentation de l'activité enzymatique est également constatée avec ssSPTb, bien que dans une moindre mesure. Les sous-unités ssSPTa et ssSPTb interagissent donc directement avec le dimère, et potentialisent son activité enzymatique. (48) L'étude du profil de SL associé à chaque combinaison de sous-unités a mis en évidence un autre rôle de ces protéines.

L'enzyme SPT catalyse la condensation d'un acyl-CoA avec un acide aminé. Son acyl-CoA préférentiel est le palmitoyl-CoA, qui donne des bases sphingoïdes avec une chaîne carbonée en C18 : la sphingosine et la sphinganine. (8) Elles ne diffèrent dans leur structure que par une insaturation, présente chez la sphingosine et absente de la sphinganine. (Figure 6) Ce sont les deux bases sphingoïdes les plus courantes. Il en existe d'autres, issues de la condensation d'autres acyl-CoA et/ou d'autres acides aminés. En effet, d'autres acyl-CoA que le palmitoyl-CoA peuvent être utilisés comme substrat, entraînant la synthèse de SL dits « atypiques », avec des bases sphingoïdes présentant des chaînes carbonées allant de C14 à C22. (49) Les différentes combinaisons de sous-unités pouvant former la SPT ont été associées à différentes longueurs de chaînes carbonées des bases sphingoïdes. Les différentes isoenzymes ont donc des acyl-CoA préférentiels différents, et les sous-unités ssSPTa et ssSPTb participent à cette spécificité de substrat. (46,49) Le complexe enzymatique SPTLC1-SPTLC2-ssSPTa montre une préférence marquée pour les acyl-CoA en C16, et donc le palmitoyl-CoA. Ce dernier est également un substrat préférentiel de SPTLC1-SPTLC3-ssSPTa, avec les acyl-CoA en C14. De manière générale, la sous-unité ssSPTb confère une spécificité pour des acyl-CoA à plus longue chaîne. L'enzyme SPTLC1-SPTLC2-ssSPTb catalyse préférentiellement des réactions utilisant des acyl-CoA en C18, alors que SPTLC1-SPTLC3-ssSPTb est associée à un large panel d'acyl-CoA, sans préférence marquée.

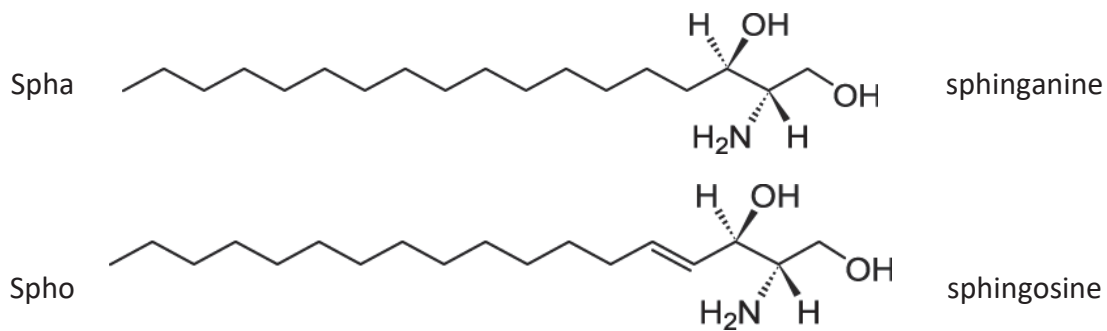


Figure 6 : Structures chimiques de la sphinganine et de la sphingosine

Les protéines ssSPTa et ssSPTb sont donc des sous-unités qui interagissent avec l'hétérodimère formant l'enzyme SPT, et jouent un rôle important : elles potentialisent l'activité enzymatique, et jouent sur la spécificité de substrat sur le plan des acyl-CoA, participant ainsi à la diversité de synthèse des SL.

La famille des protéines Orosomucoïde-like (ORMDL) est localisée au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, et participe également à la modulation de l'activité de la SPT. (50) Elle est constituée de trois protéines chez les mammifères, ORMDL1, 2 et 3, qui sont hautement conservées et présentent entre 81 et 84% d'identité sur leur composition en acides aminés. (51,52) Ce sont des analogues des protéines Orm1 et Orm2, retrouvées chez les levures. Elles jouent un rôle majeur dans la régulation de la biosynthèse des céramides. (51) Ces derniers ayant un rôle de signalisation dans les mécanismes d'apoptose, il existe un rétrocontrôle négatif sur l'enzyme SPT pour réguler leur synthèse. Chez les levures, ce mécanisme de rétrocontrôle est basé sur l'état de phosphorylation des protéines ORM, géré par la phosphatase 2A et la kinase Ypk. (53) Non phosphorylées, Orm1/2 se lient à la SPT et inhibent son activité et ainsi la synthèse de céramides. Dans une situation de déplétion en céramides, la kinase Ypk va phosphoryler les protéines Orm, rompant leur liaison à la SPT et rétablissant ainsi l'activité enzymatique. L'accumulation des intermédiaires métaboliques de la synthèse des SL va entraîner un rétrocontrôle négatif avec déphosphorylation des protéines Orm. (50) Chez les mammifères on retrouve le même principe de rétrocontrôle négatif, sans que le mécanisme par lequel l'activité des protéines ORMDL est régulée ne soit encore totalement élucidé. En effet, ces dernières ne présentent pas le résidu sérine qui est phosphorylé chez les levures. (13,50,52) Des études sur modèles cellulaires ont mis en

évidence l'existence du rétrocontrôle négatif chez les mammifères, avec augmentation de l'activité enzymatique de SPT devant une déplétion en céramide, et à l'inverse une répression de cette activité face à un apport exogène de C6-céramide. (51) Le fonctionnement du système ORM chez les mammifères est donc encore partiellement inconnu, mais il joue un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie des SL et des céramides.

La SPT est donc un complexe enzymatique impliqué dans une voie métabolique fondamentale, et dont les métabolites ont une grande importance fonctionnelle et structurale. Elle interagit avec d'autres protéines pour sa régulation, dont tous les mécanismes ne sont pas encore élucidés. (Figure 7)

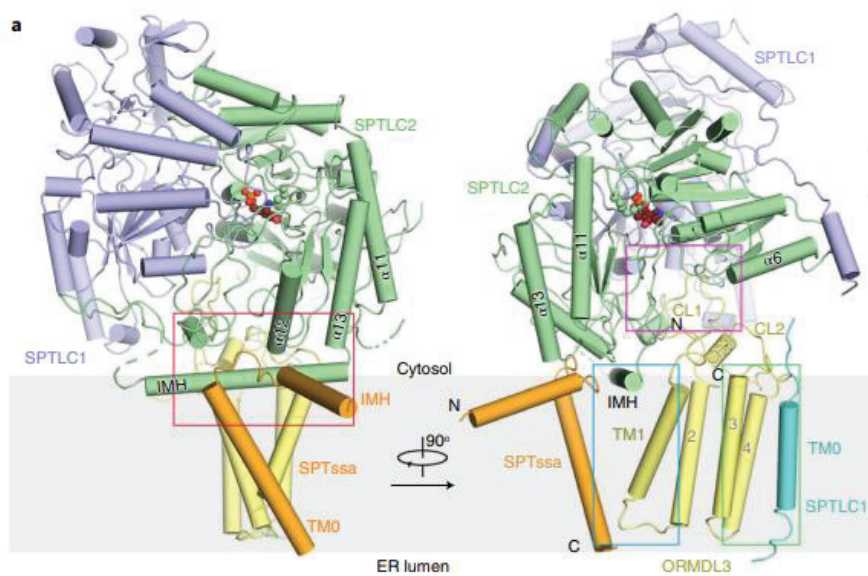


Figure 7 : Structure théorique du complexe SPT avec les différentes sous unités protéiques, d'après Li et al. (54)

Les variants des gènes codant pour les sous-unités SPTLC1 et SPTLC2 entraînent des répercussions sur la fonction de la SPT. Certains d'entre eux, entraînant une modification de fonction de l'enzyme, sont associés à une pathologie monogénique : HSN1.

2.4 Neuropathies Héréditaires Sensitives et Autonomes

La grande famille des Neuropathies Héréditaires Périphériques peut être divisée en trois sous-familles : les Neuropathies Héréditaires Motrices (HMN), les Neuropathies Héréditaires Motrices et Sensitives (HMSN), aussi appelées maladies de Charcot-Marie-Tooth (CMT) et enfin les Neuropathies Héréditaires Sensitives et Autonomes (HSAN), qui sont le sujet de ce travail. (55) Bien qu'étant identifiées par leur phénotype majoritaire, il existe un chevauchement du spectre clinique de ces maladies.

Les HSAN sont un groupe de pathologies génétiques, avec une importante variabilité génotypique et phénotypique. Ce sont des maladies rares, souvent sous-diagnostiquées, pour lesquelles nous n'avons pas de données épidémiologiques précises. Elles sont caractérisées par une perte progressive de sensibilité au niveau distal, liée à une atteinte exclusive ou prédominante du système nerveux périphérique. Cette atteinte neurologique sensitive se traduit par une altération de la perception de la douleur et de la température, une diminution des réflexes, et une perte de la sensibilité distale qui va aboutir à des ulcérations chroniques au niveau des mains et des pieds. Ces dernières peuvent mener à des nécroses et des ostéomyélites, rendant alors l'amputation indispensable. (56) Les patients peuvent également subir des épisodes de douleurs lancinantes et des paresthésies. (57) Les neurones moteurs peuvent être touchés, avec cliniquement une atrophie et une faiblesse des muscles des membres. Des troubles autonomes peuvent également accompagner ces neuropathies à prédominance sensitive : reflux gastro-intestinal, constipation, arythmies, anhydrose... Les atteintes motrices et autonomes sont variables en fonction des sous-types d'HSAN. L'atteinte autonome étant inconstante, les HSAN sont parfois appelées seulement Neuropathies Héréditaires Sensorielles (HSN).

La traduction clinique de la pathologie peut apparaître dans l'enfance ou à l'âge adulte, selon les cas. De manière générale, la progression de la neuropathie est lente et progressive, et il peut y avoir des variabilités de sévérité au sein d'une même famille. Il existe des exceptions avec des formes particulièrement précoces et sévères (58,59).

En 1975, Dyck et Ohta proposent une classification descriptive des HSN, et introduisent ce terme. (60) Cette classification est reprise par Dyck en 1993, et sépare les

HSN en 5 catégories principales, allant de HSAN I à HSAN V. (61) Cette classification est basée sur le modèle de transmission, l'âge d'apparition clinique, les éléments génétiques connus et d'autres paramètres comme les résultats de biopsie nerveuse ou d'étude électrophysiologique, l'atteinte motrice et autonome... La classification de Dyck est toujours applicable en pratique clinique, mais a depuis été largement étoffée par les avancées et découvertes génétiques qui ont permis d'isoler de nouvelles sous-catégories d'HSAN. Le tableau clinique étant non discriminant, le diagnostic et la classification actuels reposent principalement sur les données de génétique et l'identification des variants pathogènes.

2.5 Neuropathie Héréditaire Sensitive et Autonome de type 1

HSAN1 est la plus fréquente des neuropathies HSAN, bien qu'elle reste une maladie rare. Au 1^{er} mars 2022, la Banque Nationale de Données Maladies Rares dénombre 20 patients recensés avec un diagnostic d'HSAN1 en France. (62) Ce sous-type se distingue des autres HSAN par sa transmission autosomique dominante. Elle a été décrite cliniquement pour la première fois en 1922 par Hicks, comme un ulcère perforant du pied de transmission héréditaire, car touchant dix membres d'une même famille. (63) C'est une neuropathie lentement progressive, avec une forte hétérogénéité dans sa présentation clinique, à la fois inter et intra-familiale. Elle se déclare entre la 2^{ème} et la 5^{ème} décennie de vie. (26,56,64,65) Cette neuropathie axonale est caractérisée par une perte de sensibilité au niveau distal, pouvant s'accompagner d'une atteinte motrice et/ou autonome. L'atteinte sensitive et motrice est prédominante au niveau des membres inférieurs, et plus variable au niveau des membres supérieurs. Les études de conduction nerveuse montrent en effet une forte réduction voire une absence de potentiels sensitifs au niveau des membres inférieurs, et des résultats bien plus modérés au niveau des membres supérieurs. La conduction motrice est bien plus variable entre les individus. La vitesse de conduction nerveuse est généralement préservée, mais certains patients peuvent présenter des caractéristiques de démyélinisation. (26,57)

HSAN1 est elle-même divisée en différentes entités, caractérisées par leur gène causal et par des spécificités cliniques. (64,66,67) Actuellement 6 gènes ont été associés

à HSAN1 : *SPTLC1* (43,68), *SPTLC2* (69), *ATL1* (70), *DNMT1* (71), *ATL3* (72), mais également *RAB7* (73). (Tableau 3) Tous ces gènes sont à transmission autosomique dominante. Les variants des gènes *SPTLC1* et *SPTLC2*, caractérisant respectivement HSAN1A et HSAN1C, sont les plus fréquemment retrouvés. HSAN1A et HSAN1C sont phénotypiquement très proches de Charcot-Marie-Tooth de type 2B (CMT2B), liée à une mutation du gène *RAB7*. (66,74,75) Un chevauchement phénotypique existe avec les formes HSAN1 avec une atteinte motrice. Chez les patients CMT2B, l'atteinte motrice sera prédominante, accompagnée de perte de sensibilité distale, alors que c'est cette dernière qui prédomine chez les patients HSAN1. C'est l'analyse moléculaire qui permet de poser clairement le diagnostic.

Tableau 3 : Récapitulatif des différents sous-types de HSAN1

Sous-type de HSAN1	OMIM	Gène	Localisation	Caractéristiques Phénotypiques	Références
HSAN1A	162400	<i>SPTLC1</i>	9q22.1 - q22.3	Complications par ulcérations chroniques ± atteinte système nerveux central, Télangiectasie Maculaire de type 2	(43,76)
HSAN1B	608088	inconnu	3p24-p22	Toux, reflux gastro-œsophagien	(77,78)
HSAN1C	613640	<i>SPTLC2</i>	14q24.3	Complications par ulcérations chroniques ± atteinte système nerveux central, Télangiectasie Maculaire de type 2	(69,79)
HSAN1D	613708	<i>ATL1</i>	14q22.1	Complications par ulcérations chroniques, spasticité	(70)
HSAN1E	614116	<i>DNMT1</i>	19p13.2	Démence précoce, perte d'audition	(71)
HSAN1F	615632	<i>ATL3</i>	11q13.1	Destruction osseuse, absence d'atteinte autonome ou de spasticité	(72)

Ce sont les variants des gènes *SPTLC1* et *SPTLC2*, leur découverte et leurs conséquences biochimiques et phénotypiques qui nous intéressent dans ce travail. Pour plus de simplicité, les sous-types HSAN1A et HSAN1C ne seront plus distingués et seront regroupés sous l'appellation générique « HSAN1 ».

En 1996, des analyses de liaison génétiques chez 67 membres d'une même famille australienne, dont certains présentaient un phénotype HSAN1, ont permis de localiser le gène responsable de la pathologie au niveau du chromosome 9q22.1-q22.3. (42) Un screening de séquence et une comparaison à des bases de données ont permis d'identifier *SPTLC1* comme le gène d'intérêt dans la pathologie, et d'isoler trois variants faux-sens retrouvés dans les membres atteints de 11 familles. (68)

La première hypothèse formulée était que ces variants de *SPTLC1* entraînaient une augmentation de la synthèse de céramides pro apoptotiques.(43,68) La dégénérescence neuronale aurait donc été liée à l'augmentation de l'apoptose au niveau du ganglion spinal. Une deuxième hypothèse a été formulée, incriminant un effet dominant négatif des variants, qui inhiberaient l'activité de l'enzyme SPT et diminueraient le taux de SL. (43,80) C'est donc une haploinsuffisance qui serait responsable des signes cliniques. (48) Ces hypothèses ont été infirmées par des études démontrant l'absence de différence significative de taux de SL entre les patients HSAN1 et les contrôles, malgré une baisse de l'activité enzymatique. (25,81,82) De plus, des souris KO pour *SPTLC1* ont certes un taux réduit de SL, mais ne développent pas de neuropathies. (33,81,82) La physiopathologie d'HSAN1 n'est donc pas liée à une diminution de l'activité enzymatique de SPT ou au taux de SL canoniques.

Les conséquences des variants de *SPTLC1* ont été étudiées sur des lignées de cellules HEK, Wild Type versus *SPTLC1* c.C133W et C133Y, qui sont des variants pathogènes retrouvés dans HSAN1. (25) La fumonosine, inhibitrice de céramide synthase, a été ajoutée au milieu de culture pour permettre l'accumulation des produits de la SPT dans les deux conditions. L'étude de la séparation de ces lipides en Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) a mis en évidence un pic supplémentaire inattendu. Il a été étudié en Chromatographie Liquide couplée à de la Spectrométrie de Masse (LC-MS), et les rapports masse/charge (m/z) obtenus ont permis d'identifier deux nouveaux analytes : la dSA et la déoxy-méthylsphinganine. (Figure 8) Ces molécules sont des produits de synthèse directe de la SPT, et sont issus de la condensation d'un acyl-CoA non pas avec la L-sérine, mais avec la L-alanine ou la L-glycine respectivement. Cette hypothèse sur modèle cellulaire a été confirmée par des analyses chez des patients. L'élévation significative de ces dSL est également retrouvée dans le plasma des patients HSAN1

présentant des variants identifiés comme délétères. Des études ont retrouvé le même phénotype et la même élévation de dSL associés à des variants du gène codant pour la sous-unité SPTLC2 de l'enzyme SPT. (69,83)

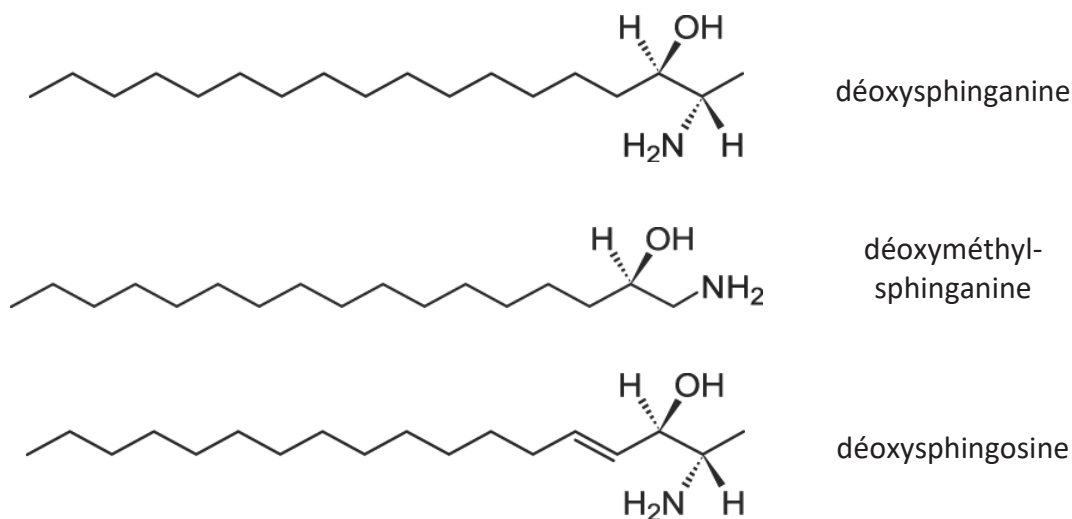


Figure 8 : Structure chimique des premières bases déoxysphingoides découverts dans un contexte de HSAN1

Les neuropathies HSAN1 sont donc liées d'une part à l'existence de variants des sous-unités SPTLC1 ou SPTLC2 de l'enzyme SPT, et d'autre part à l'accumulation de dSL retrouvés au niveau plasmatique, potentiellement responsables de la physiopathologie de HSAN1.

2.5.1 Physiopathologie de HSAN1A et HSAN1C

Les variants des gènes *SPTLC1* et *SPTLC2* entraînent donc une modification du substrat préférentiel de l'enzyme. De manière physiologique, la L-sérine est le substrat préférentiel de la SPT, mais celle-ci présente également une faible affinité pour la L-alanine et la L-glycine. L'utilisation de ces deux acides aminés alternatifs comme substrat de la SPT entraîne la production de SL atypiques : les dSL, plus précisément de la dSA pour la L-alanine, et de la déoxyméthylsphinganine pour la L-glycine. Du fait de la structure de ces acides aminés, les bases sphingoides formées manquent d'un groupement hydroxyle en C1. Elles vont pouvoir être métabolisées en déoxy-dihydrocéramides puis en déoxycéramides, qui pourront être dégradés en déoxyphingosine (dSO) par une céramidase. Cependant, en l'absence de groupement hydroxyle, cela va aboutir à une

impasse métabolique. En effet, ni la synthèse des SL complexes par greffe d'un groupement polaire, ni la dégradation canonique des SL ne vont être possibles. (Figure 9)

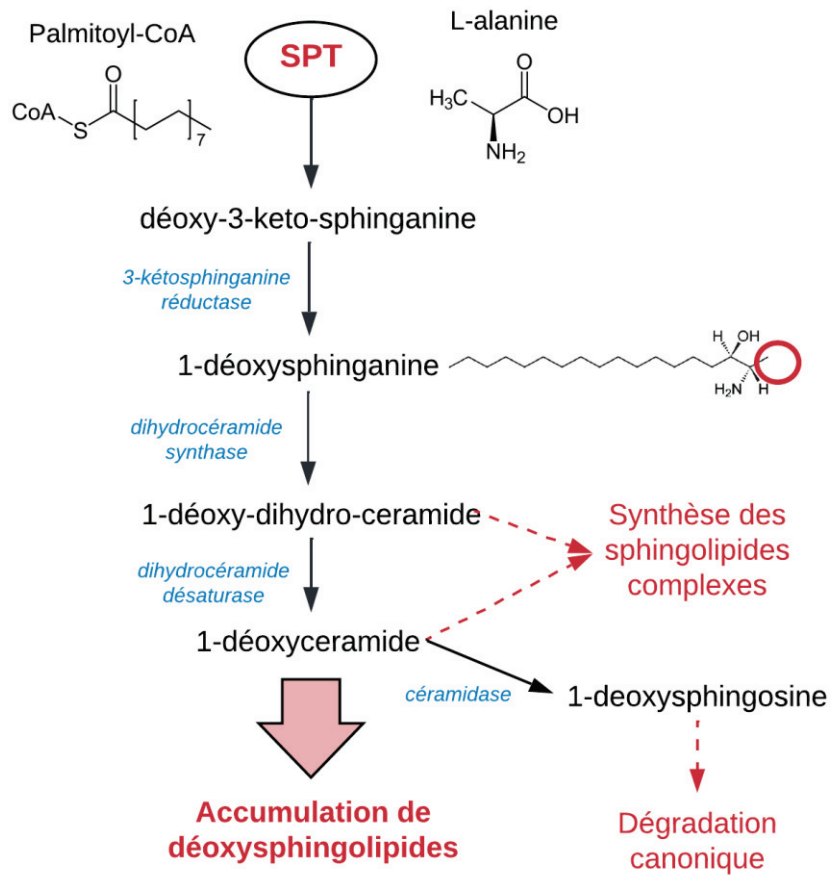


Figure 9 : Synthèse de *novo* des déoxysphingolipides

La L-glycine ayant un rôle mineur dans la formation des dSL et dans la toxicité de ces composés, dans la suite de ce travail nous simplifierons donc en considérant que la synthèse des dSL est liée uniquement à l'utilisation de la L-alanine comme substrat alternatif par la SPT. (25) Seule la dSA et la dSO seront étudiées en tant que bases déoxysphingoïdes.

L'accumulation de dSL est donc en lien avec une augmentation de l'utilisation de L-alanine par l'enzyme SPT, à la place de la L-sérine. Cela a été validé par des modèles murins, chez lesquels un apport exogène d'alanine augmente le taux de dSL et aggrave la neuropathie. (84) Des modèles cellulaires de défaut d'apport exogène de L-sérine ont

également démontré une élévation significative de la synthèse de dSL, réversible par correction de l'apport en L-sérine. (85) C'est donc le ratio sérine/alanine et l'utilisation de ces acides aminés comme substrats de la SPT qui jouent un rôle fondamental dans la synthèse de dSL.

Cette modification du substrat préférentiel n'est pas liée à une modification de l'affinité de l'enzyme SPT pour les acides aminés, mais à une modification des vitesses de réaction. En effet, SPT présente des constantes de Michaelis (K_m) comparables pour la sérine et l'alanine, autant en présence qu'en l'absence de variants caractéristiques d'HSAN1. Avec la L-sérine comme substrat, les variants HSAN1 provoquent une diminution significative de la vitesse initiale maximale (V_{max}) de la SPT. Les variants n'auraient donc pas d'impact sur la liaison des acides aminés à l'enzyme, mais modifieraient le site catalytique, favorisant l'utilisation de L-alanine pour la condensation avec un acyl-CoA. (48). Les variants retrouvés dans HSAN1 n'entraînent par ailleurs pas de diminution de la synthèse canonique des SL.

Les dSL ne sont pas délétères en conditions physiologiques, car produits en très faible quantité, du fait de l'utilisation préférentielle de la L-sérine comme substrat de la SPT. Dans HSAN1, c'est l'accumulation de ces dSL qui va être délétère.

Le phénotype de HSAN1 s'explique par la neurotoxicité des dSL. La culture de neurones du ganglion spinal en présence de concentrations croissantes de dSA a démontré l'effet neurotoxique dose-dépendant de la molécule, à la fois sur le nombre de cellules et sur la longueur des neurites. (25) Les motoneurones semblent moins sensibles aux dSL que les neurones sensitifs. (25) Ces résultats sont concordants avec la clinique de la pathologie, et ont permis d'élucider partiellement la physiopathologie des neuropathies HSAN1.

La cytotoxicité des dSL, et la corrélation entre élévation des dSL et neuropathie périphérique est établie et démontrée dans différents contextes, et à la fois dans des modèles cellulaires (25,86) et animaux (81,84,87). Une élévation des dSL est notamment associée aux effets indésirables de types neuropathies périphériques de deux antinéoplasiques, le docétaxel et le paclitaxel.(88,89) La cytotoxicité de la dSA en a fait pendant un temps un potentiel agent cytotoxique pour le traitement de tumeurs solides.

(90–92) Cependant la balance bénéfique/risque était défavorable, liée à une neurotoxicité importante. Le processus physiopathologique à l'origine de cette cytotoxicité et neurotoxicité n'est pas encore élucidé, mais de nombreuses études ont étudié différentes hypothèses, et apporté des éléments de réponse.

Les SL, et les céramides complexes en particulier, jouent un rôle structural fondamental, notamment concernant la structure des membranes biologiques. La structure chimique des dSL diminue leur miscibilité au sein des bicouches lipidiques, et favorise la formation d'agrégats. (93,94) Cette formation d'agrégats protéiques est caractéristique de pathologies neurodégénératives : Alzheimer, Parkinson, Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA)... L'accumulation de dSL peut donc modifier les propriétés des membranes et potentiellement altérer les fonctions cellulaires.

Les dSL vont également avoir un impact sur les organelles des cellules, en particulier le réticulum endoplasmique et la mitochondrie. Ils vont induire un stress du réticulum endoplasmique et altérer la production énergétique mitochondriale, compromettant ainsi le fonctionnement cellulaire. (48,86)

Les patients atteints de HSAN1 peuvent présenter des caractéristiques de démyélinisation. En effet, les dSL altèrent la stabilité de la gaine de myéline. (95,96) La neurotoxicité peut également s'expliquer par l'effet des dSL sur le cytosquelette. Les fonctions neuronales reposent grandement sur l'intégrité du cytosquelette axonal. Or, de nombreuses altérations de celui-ci sont décrites dans les neuropathies. De manière générale, les trois composants du cytosquelette neuronal sont altérés en présence de dSL : les filaments d'actine, les neurofilaments et les microtubules. (92,97) Les mécanismes de neurotoxicité passeraient donc par une démyélinisation avec atteinte axonale secondaire, expliquant les signes cliniques retrouvés chez les patients.

2.5.2 Génétique de HSAN1A et HSAN1C

A ce jour et depuis 2001, 18 principaux variants ont été identifiés et associés à HSAN1, 10 sur *SPTLC1* et 8 sur *SPTLC2*. Ils sont classés comme probablement pathogènes ou comme des variants de pathogénicité incertaine (VUS) d'après les recommandations de l'*American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) et de l'*Association for Molecular Pathology* (AMP). (98) Ce sont tous des *Single Nucleotide Variants* (SNV), et des

variants faux-sens. Jusqu'à présent, les screenings extensifs n'ont pas permis de mettre en évidence de variants dans le gène *SPTLC3*. (69)

Seules *SPTLC2* et *SPTLC3* sont les sous-unités protéiques portant l'activité catalytique de l'enzyme STP. Cependant le site actif de l'enzyme se situe à l'interface des sous-unités *SPTLC1* et *SPTLC2* ou *SPTLC3*. Des variations de *SPTLC1* peuvent donc avoir un impact sur l'activité de l'enzyme, notamment en modifiant la conformation et les propriétés physico-chimiques du site actif.

Actuellement, huit variants principaux de *SPTLC1* ont été décrits comme associés à HSAN1 : *SPTLC1* p.C133Y, p.C133W, p.C133F, p.C133R, p.V144D, p.A352V, p.S331F et p.S331Y. Deux autres variants de *SPTLC1* sont identifiés mais considérés comme des VUS : *SPTLC1* p.G387A et p.A310G. Le variant *SPTLC1* p.G387A a d'abord été identifié comme causal de HSAN1, mais une comparaison systématique et une étude de ségrégation dans une famille ont démontré qu'il s'agissait en réalité d'un polymorphisme rare mais bénin. (99,100) Le variant *SPTLC1* p.A310G n'a été identifié que chez un patient isolé, sans analyse familiale possible et les programmes de prédiction de pathogénicité ne sont pas en faveur d'un impact délétère du variant. (101) D'autres variants, moins étudiés et moins retrouvés, sont également de pathogénicité incertaine ou ont été reconnus comme des polymorphismes.

Huit variants de *SPTLC2* sont associés à HSAN1 : *SPTLC2* p.G382V, p.V359M, p.I504F, p.S384F, p.A182P, p.N177D et p.R183W. Le variant p.T409M n'a été identifié que chez un patient isolé, et n'a pas été publié. Il est considéré de pathogénicité incertaine. (102)

Ces différents variants pouvant être situés proches de l'interface *SPTLC1*-*SPTLC2* ou non, sur des sites de phosphorylation ou non, et ayant des impacts différents sur l'activité de l'enzyme SPT, il semblerait que différentes modifications protéiques puissent être responsables de l'élévation des dSL. (102–104) Une étude a séparé certains des variants identifiés responsables de HSAN1 en trois groupes, qui concordent du point de vue phénotypique et structural : un premier groupe composé de VUS, un deuxième avec des variants pathogènes, et un dernier avec des variants associés un phénotype particulièrement sévère (102,105). Les variants étudiés et répartis en groupes sont respectivement mis en avant en bleu, orange et rouge dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Principaux variants décrits de *SPTLC1* et *SPTLC2* dans HSN1

Gène	Variant génétique	Variant protéique	Classification des variants selon les recommandations de l'ACMG (98)	Références
<i>SPTLC1</i>	c.398G>A	p.C133Y	VUS	(43,68,100,106–108)
	c.399T>G	p.C133W	Probablement pathogène	(43,48,68,100,101,109)
	c.398G>T	p.C133F	VUS	(110)
	c.397T>C	p.C133R	VUS	(102,111)
	c.431T>A	p.V144D	Probablement pathogène	(68,100,102,112)
	c.1055C>T	p.A352V	VUS	(102,103,113)
	c.992C>T	p.S331F	Probablement pathogène	(58,102,103,113,114)
	c.992C>A	p.S331Y	Probablement pathogène	(59,102,114)
	c.1160G>C	p.G387A	VUS	(99,100,102)
	c.929C>G	p.A310G	VUS	(101)
<i>SPTLC2</i>	c.1145G>T	p.G382V	Probablement pathogène	(69,102)
	c.1075G>A	p.V359M	Probablement pathogène	(69,102)
	c.1510A>T	p.I504F	Probablement pathogène	(69,102)
	c.1151C>T	p.S384F	Probablement pathogène	(79,102,104,106)
	c.544G>C	p.A182P	Probablement pathogène	(83,102)
	c.529A>G	p.N177D	VUS	(115,116)
	c.547C>T	p.R183W	Probablement pathogène	(117)
	c.1226C>T	p.T409M	VUS	(102)

Un premier cluster regroupe des variants n'entraînant pas de modification de la synthèse canonique de SL, ni d'élévation de la synthèse de dSL. Ce sont majoritairement des variants de pathogénicité incertaine : *SPTLC1* p.A352V et p.G387A, et *SPTLC2* p.V359M, p.R183W et p.T409M.

Les variants *SPTLC1* p.C133W et p.C133Y, *SPTLC2* p.A182P, p.G382V et p.S384F constituent le deuxième groupe. Les variants *SPTLC1* p.C133F et p.C133R n'ont pas été étudiés mais peuvent être associés à ce groupe puisque concernant un acide aminé déjà décrit. Il en est de même pour le variant *SPTLC2* p.R183W, très proche d'un variant analysé dans l'étude. Les patients présentant ces variants ont un phénotype typique de

HSAN1. Ces variants n'ont pas d'impact sur l'activité canonique de SPT, mais sont associés à une élévation significative des dSL plasmatiques. Les variants, qu'ils soient sur *SPTLC1* ou *SPTLC2*, sont localisés proches de l'interface *SPTLC1-SPTLC2*, et du site de liaison du PLP, et donc proche du site catalytique de SPT. Les modifications d'acides aminés vont entraîner des modifications de conformation, des pertes de flexibilité et des modifications des caractéristiques physico-chimiques du site-actif pouvant expliquer l'élévation de la synthèse de bases sphingoïdes dérivées de l'alanine. Le résidu S384 est également un site de phosphorylation de l'enzyme SPT, cette phosphorylation pouvant avoir un impact sur la spécificité de substrat de l'enzyme. (104)

Le dernier groupe rassemble *SPTLC1* p.S331F, p.S331Y, et *SPTLC2* p.I504F. Ces trois variants sont caractérisés par un phénotype sévère, les deux variants de *SPTLC1* étant même spécifiquement responsables du « syndrome S331 », particulièrement précoce et associé à des atrophies musculaires en plus de l'atteinte sensitive. (58,59,114) En plus de leur similarité phénotypique, ces variants entraînent une augmentation de l'activité canonique de la SPT, et sont caractérisés par une élévation très spécifique de la synthèse des bases sphingoïdes C20. Ils présentent également une élévation des dSL plasmatiques. Ces variants sont situés à la surface de l'enzyme.

Le variant *SPTLC1* p.V144D est également situé à la surface de l'enzyme, et a été décrit dans de nombreux papiers comme étant responsable de HSAN1, mais sans phénotype sévère.

Il est difficile de déduire les conséquences d'un variant des gènes *SPTLC1* ou *SPTLC2* sur la fonction de l'enzyme SPT. La localisation du variant et son impact sur la modification de l'acide aminé sont deux éléments fondamentaux. Les notions de conservation de l'acide aminé concerné, de propriétés physico-chimiques et d'encombrement stérique sont également à prendre en compte. Un test fonctionnel comme le dosage de dSL permettrait d'étudier l'impact des variants étudiés sur la fonction de l'enzyme.

2.5.3 Diagnostic et traitement

Actuellement, le diagnostic de HSAN1 est évoqué sur un ensemble d'éléments cliniques, et est confirmé par l'analyse génétique. L'histoire familiale est un élément déterminant de la démarche diagnostique. La transmission se faisant sur un mode

autosomique dominant, un cas index devrait être associé à des apparentés 1^{er} degré également atteints. Cependant, la pénétrance incomplète et les mutations *de novo* peuvent fausser cet argument. (26)

Cliniquement, les patients présentent majoritairement une perte de sensibilité distale, notamment à la douleur et à la chaleur, avec des ulcérations pouvant conduire jusqu'à l'amputation. (26,57) (Figure 10) Cela peut s'accompagner de troubles moteurs, et d'atrophie musculaire. Ce sont principalement les membres inférieurs qui sont atteints. Les troubles de la sudation sont les anomalies majoritaires du système autonome. Il n'existe pas de différence phénotypique entre HSAN1A et HSAN1C, le mécanisme physiopathologique restant le même que le variant concerne *SPTLC1* ou *SPTLC2*. (65)



Figure 10 : Ulcérations distales et amputations retrouvées chez des patients HSAN1 (69,118)

L'étude de la conduction nerveuse, qu'elle soit sensitive ou motrice, peut être un argument supplémentaire. (25,26) HSAN1 se traduit par une neuropathie axonale longueur dépendante et rétrograde. Les neurones sensitifs sont les plus touchés, les motoneurones étant moins sensibles à l'accumulation de dSL. (25)

C'est l'analyse moléculaire, avec l'identification de variants pathogènes de *SPTLC1* ou *SPTLC2* qui va permettre de poser le diagnostic de la maladie. Ces variants sont recherchés au sein de panels de gènes pour séquençage NGS (Next Generation Sequencing) majoritairement. En France, peu de centres hospitaliers proposent des panels incluant les gènes *SPTLC1* et *SPTLC2*. (Figure 11) Ces panels peuvent également avoir différentes orientations diagnostiques, et être plus ou moins ciblés : CMT et neuropathies, troubles du métabolisme, anomalies du métabolisme lipidique...

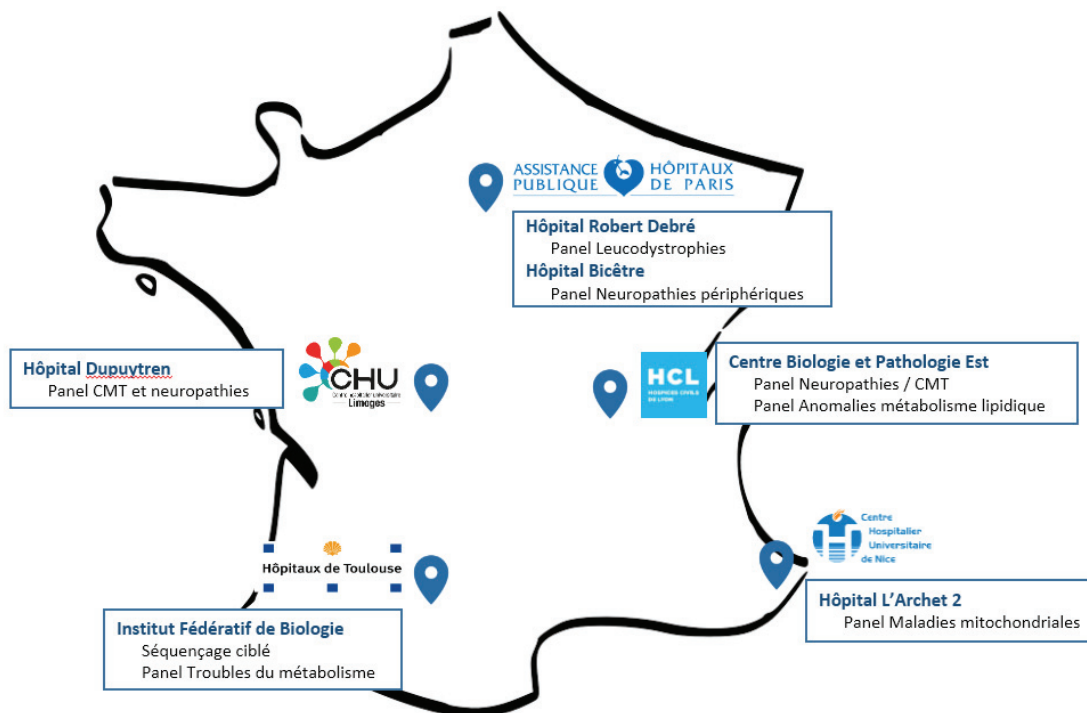


Figure 11 : Laboratoires référencés réalisant la recherche des variants de *SPTLC1* et *SPTLC2* par biologie moléculaire en France

La neuropathie HSAN1 a la particularité d’être traitable de manière efficace. En effet, une supplémentation orale en L-sérine à des concentrations suffisantes permet de rétablir la synthèse canonique des SL. L’efficacité de cet apport exogène, à la fois sur l’amélioration clinique de la neuropathie, et sur la diminution de taux de dSL, est validée sur des modèles cellulaires, (95) murins et humains. (84,119,120) Une étude récente démontre une efficacité du traitement validée par une amélioration significative du *Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Score* (CMTNS). Ce dernier tient compte des symptômes du patient, ainsi que des données d’électrophysiologie. (119) Le traitement par supplémentation en L-sérine a également l’avantage de ne présenter pas ou peu d’effets indésirables.

La L-sérine va agir par compétition vis-à-vis de la L-alanine, et réduire ainsi la synthèse et donc l’accumulation de dSL. Le constat de l’efficacité thérapeutique de la supplémentation par L-sérine est un argument supplémentaire en faveur du diagnostic de HSAN1.

Si l'analyse génétique permet théoriquement de poser le diagnostic de HSAN1, dans les faits ce n'est pas aussi simple. Grâce aux données de génomique, de nouveaux variants sont mis en évidence, sans que leur caractère délétère soit clairement établi *in silico*. En effet, il est difficile de modéliser dans les bases de données un gain de fonction modifiant le site actif d'une enzyme. Il reste néanmoins nécessaire de caractériser ces variants pour distinguer les polymorphismes bénins des variants de classe 4 et 5. Un test fonctionnel, basé sur un dosage biochimique, serait parfaitement complémentaire de l'analyse moléculaire. Les dSL sont le biomarqueur indiqué pour les neuropathies HSAN1. (110) Ils sont significativement élevés dans le plasma des patients atteints, et du fait de leur neurotoxicité, semblent être directement responsables de la physiopathologie de la maladie.

La neuropathie HSAN1 est donc associée à une modification au niveau de la première étape de la synthèse de novo des SL. D'autres pathologies sont également associées à des variants géniques touchant l'enzyme SPT et modifiant ainsi sa fonction. De la même manière, si les dSL ont tout d'abord été étudiés comme biomarqueurs caractéristiques de HSAN1, une pathologie monogénique autosomique dominante, des accumulations de ces métabolites sont retrouvées dans des contextes de pathologies acquises ou multifactorielles.

2.6 Autres pathologies liées au métabolisme de SPT

2.6.1 Anomalies génétiques

La télangiectasie maculaire de type II est une pathologie rétinienne bilatérale, caractérisée par une perte progressive de la vision centrale, par dégénérescence des cellules gliales et des photorécepteurs. Le terme de télangiectasie vient de la dilatation des capillaires maculaires retrouvée dans cette pathologie. L'importance des facteurs environnementaux, ainsi que l'hétérogénéité génétique et la pénétrance incomplète compliquent l'identification des gènes responsables de la pathologie. Des analyses d'exome ont mis en évidence l'existence de variants des gènes *SPTLC1* et *SPTLC2* chez certains patients atteints de télangiectasie maculaire de type II. De plus, les premières études ont démontré l'existence d'une très forte association entre HSAN1 et cette

maladie : sur onze patients HSAN1, neuf présentaient également une atteinte rétinienne caractéristique. (76,106) Plus récemment, l'étude d'une cohorte de seize patients HSAN1 n'en a retrouvé aucun présentant une télangiectasie maculaire de type 2 associée. (121) Le lien entre ces deux pathologies ne peut donc pas être expliqué par l'unique existence de variants génétiques, d'autres mécanismes de régulation doivent être impliqués. Les concentrations plasmatiques de dSL sont retrouvées élevées chez les patients atteints de télangiectasie maculaire de type II, que les variants des sous-unités de la SPT soient retrouvés ou non. En l'absence de variants, cette accumulation est liée à une diminution de la biodisponibilité de la sérine, et donc un déséquilibre du ratio sérine/alanine en faveur de la synthèse des dSL. (122,123) Cela relie bien la télangiectasie maculaire de type II à un déséquilibre impliquant la voie métabolique de la sérine – glycine et la voie de synthèse *de novo* des SL. Si le rôle causal des dSL a été établi, la physiopathologie de cette maladie multifactorielle n'est pas encore totalement élucidée.

En 2021, la découverte de nouveaux variants dominants de *SPTLC1*, en lien avec une autre pathologie, a de nouveau attiré l'attention sur le rôle de la SPT et de cette première étape de synthèse *de novo* de SL. (124–126) Des variants *de novo* ont en effet été identifiés chez des patients présentant une forme juvénile de SLA, caractérisée par une atteinte progressive des motoneurones, débutant dans l'enfance par une atteinte des membres inférieurs, évoluant jusqu'à la perte de mobilité et une éventuelle atteinte des muscles respiratoires. Ces nouveaux variants de *SPTLC1* sont associés à une élévation significative de la synthèse des SL. Cette dernière serait due à une perte du rétrocontrôle exercé par les sous-unités ORMDL sur l'enzyme SPT et ainsi sur la synthèse des SL. (51) Les variants identifiés perturberaient donc l'interaction de la sous-unité *SPTLC1* avec ces sous-unités régulatrices. Dans cette forme de SLA, associée à des variants de *SPTLC1*, il n'existe pas d'excès de synthèse de dSL. La localisation et la nature des variants touchant les sous-unités protéiques de la SPT peuvent donc entraîner différentes conséquences phénotypiques, et être associées à des pathologies différentes.

Ces découvertes récentes soulignent encore le lien étroit entre le métabolisme des SL et le fonctionnement neuronal et la physiopathologie de certaines neuropathies. Le développement de nouveaux dosages pour caractériser au mieux ce métabolisme

pourrait ouvrir des portes quant à la compréhension et aux perspectives thérapeutiques pour ces pathologies.

2.6.2 Pathologies acquises

Les dSL ont récemment été identifiés comme facteur prédictif significatif indépendant pour le diabète de type 2 et le syndrome métabolique. (127,128) En effet, un taux basal significativement élevé des dSL est retrouvé chez des patients développant un diabète de type 2, avant même l'apparition de la maladie. (127) Il existe une forte corrélation positive entre les dSL et les triglycérides, le glucose, l'hémoglobine glyquée, l'insuline et le degré d'insulinorésistance. (128,129). Les dSL ont été dosés pour la première fois chez des patients diabétiques du fait de la proximité clinique existant entre HSAN1 et la neuropathie diabétique : une perte de sensibilité distale se compliquant d'ulcères chroniques et pouvant aller jusqu'à l'amputation. (130) Les dSL sont retrouvés significativement augmentés chez les patients présentant un syndrome métabolique ou un diabète de type II. Ils compromettent à la fois la structure et la fonctionnalité des cellules β des îlots de Langerhans, et leur cytotoxicité est potentialisée par une glycémie élevée. (97) Ces métabolites pourraient donc permettre d'expliquer une partie de la physiopathologie du diabète et de ses complications. Cependant, les raisons d'une élévation des dSL chez ces patients ne sont pas encore totalement élucidées : les patients ne présentent pas de variant des gènes *SPTLC1* et *SPTLC2* comme on peut les retrouver dans HSAN1 ou la télangiectasie maculaire de type II. L'accumulation des dSL serait donc directement liée à un déséquilibre métabolique, la voie de synthèse des SL étant un carrefour métabolique entre les lipides, les glucides et les acides aminés. (129) Une diminution du ratio sérine/alanine est notamment retrouvée chez les patients diabétiques de type II, en faveur de la production de dSL. (129,130) La neuropathie diabétique étant cliniquement améliorée par la diminution du taux de dSL plasmatique, la supplémentation en L-sérine est une option thérapeutique intéressante pour le traitement de cette complication du diabète de type 2. (87,131)

L'hépatopathie dysmétabolique, ou *Non-Alcoholic Fatty Liver Disease* (NAFLD) et sa forme agressive la stéatose hépatique non alcoolique, ou *Non Alcoholic SteatoHepatitis* (NASH), sont corrélés à l'obésité, au diabète de type 2 et au syndrome métabolique. Une

approche lipidomique a été utilisée lors d'une étude pour identifier les biomarqueurs caractéristiques des différents stades de NAFLD, jusqu'à la NASH et la fibrose. (132) Les concentrations plasmatiques de déoxycéramides sont retrouvées élevées, de nouveau en lien avec un déficit en sérine. Cependant, le taux de dSL ne permet pas de différencier les différents stades histologiques de la NAFLD. (132,133) Ces composés seraient donc associés au processus de stéatogénèse initiale, mais pas à la progression de la maladie ni au développement de la fibrose.

2.7 Spectrométrie de masse en tandem

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) est une méthode d'analyse à la fois qualitative et quantitative. Elle permet d'étudier la composition de mélanges complexes en isolant les molécules qui les composent, identifiées grâce à leur rapport masse/charge (m/z).

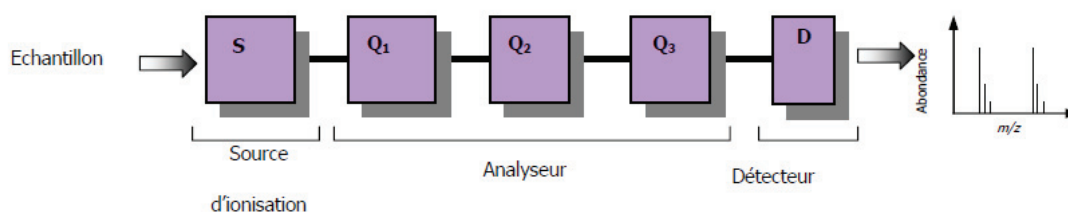


Figure 12 : Principe d'un spectromètre de masse en tandem, d'après Cheillan (134)

L'appareil est composé de trois éléments principaux montés en série : une source d'ionisation, un analyseur et un détecteur. (Figure 12) La source d'ionisation, de type électro spray dans notre cas, permet d'ioniser les molécules du liquide à étudier qui traverse un capillaire, en appliquant une tension électrique élevée. A la sortie du capillaire, le solvant sera évaporé et les ions formés passent en phase gazeuse. La structure chimique des substances d'intérêt, et en particulier leur aptitude à perdre ou gagner un proton, permet de définir le mode d'ionisation : une ionisation en mode positif forme un ion $[M+H]^+$, et une ionisation en mode négatif un ion $[M-H]^-$. Si l'analyseur d'un spectromètre de masse est classiquement composé d'un unique quadripôle, celui d'un spectromètre de masse en tandem est composé d'une succession de trois quadripôles. Dans ce cas-là, le premier quadripôle (Q1 = filtre de masse) sert à isoler l'ion parent de la

molécule d'intérêt, à partir du mélange complexe. Le deuxième quadripôle (Q2 = cellule de collision) permet de fragmenter cet ion parent grâce à un gaz de collision. Les ions fragments résultant de cette étape, aussi appelés ions fils, sont sélectionnés par le troisième quadripôle (Q3 = filtre de masse). Le signal électrique émis par l'analyseur est ensuite converti par un système informatique en spectres de masse directement exploitable par l'utilisateur sur un logiciel. Chaque molécule est ainsi caractérisée par une ou plusieurs transitions (couples ion parent/ion produit).

Les techniques de MS/MS permettent de mesurer avec une grande sensibilité et spécificité des molécules dans des mélanges complexes. Il existe plusieurs modes d'utilisation des molécules d'intérêt : balayage des ions parents, balayage des ions fils, balayage des pertes neutres et mode *Multi Reaction Monitoring* (MRM). Le mode MRM est la méthode la plus adaptée à l'étude de molécules isolées. Il présente un paramétrage de sélection des ions au niveau des quadripôles Q1 et Q3. Ainsi ne sont étudiés que les ions présentant exactement le bon couple ion parent/ion fils. Grâce à ce mode, de nombreuses molécules peuvent être quantifiées simultanément.

L'utilisation d'un standard interne (SI) homologue de la molécule à doser permet d'une part de contrôler la qualité des étapes d'extraction et de préparation d'échantillon, et d'autre part de s'affranchir d'éventuelles interférences analytiques. En effet, le SI est ajouté en premier aux échantillons, et va donc subir toutes les étapes d'extraction et de préparation, ainsi que le phénomène d'ionisation en MS/MS, dans les mêmes proportions que l'analyte à doser. Le SI doit avoir une masse légèrement différente de la molécule d'intérêt, et peut donc être soit cette molécule d'intérêt marquée par un isotope stable (deutérium, ^{13}C), soit une molécule structurellement proche et non physiologique.

La MS/MS permet une quantification sensible et spécifique de composés présents dans des fluides complexes. Une étape préalable d'HPLC permet d'ajouter un paramètre discriminant pour différencier d'éventuels composés isomasses. Cette technique permet de séparer les composés de l'échantillon en fonction de leur affinité relative pour la phase mobile et pour la phase stationnaire. La séparation est principalement basée sur le caractère hydrophile ou non des composés d'intérêt.

Ce travail de thèse est donc centré sur la mise en place du dosage de dSA totale plasmatique par LC-MS/MS dans l'Unité Médicale Pathologies métaboliques, érythrocytaires et dépistage périnatal du Service de Biochimie et Biologie Moléculaire des HCL. La mise en place de ce test fonctionnel pour caractériser de nouveaux variants de *SPTLC1* et *SPTLC2* répond à la demande de plusieurs cliniciens auprès du service.

3 Matériels et méthodes[RJ1]

3.1 Echantillons biologiques

Douze plasmas de patients avec une suspicion de HSAN1 nous ont été envoyés par différents services spécialisés dans les pathologies neuromusculaires. Ils nous ont été adressés pour caractérisation fonctionnelle, en complément de leur analyse moléculaire. Pour chacun des patients a été envoyé à son clinicien un formulaire standardisé pour uniformiser les données cliniques récoltées. (Annexe 1)

Les plasmas de cinquante patients pour lesquels une recherche de sphingolipidose a été prescrite et réalisée aux HCL ont été utilisés comme plasmas contrôles pour établir les valeurs normales de dSA totale plasmatique. Ces patients présentaient des résultats des dosages de lysosphingolipides normaux, excluant ainsi les maladies de surcharge lysosomales. Un pool de plasmas normaux de ces mêmes patients (pool témoin), ou ce pool surchargé avec un standard de dSA (pool positif), sont aliquotés et servent de contrôle de qualité interne maison et d'échantillons pour la mise en place de la méthode. Les plasmas de patients sont conservés à -80°C, et les pools de plasma et contrôles de qualité à -20°C.

3.2 Bases sphingoïdes étudiées

La base sphingoïde dosée dans ce travail est la dSA totale. La dSA étant un intermédiaire métabolique dans la voie de synthèse des dSL, elle n'est présente qu'en très faible quantité à l'état libre. La dSA totale correspond donc à la somme de la dSA libre et de la dSA issue de l'hydrolyse acide des déoxy-dihydrocéramides. (Figure 13)

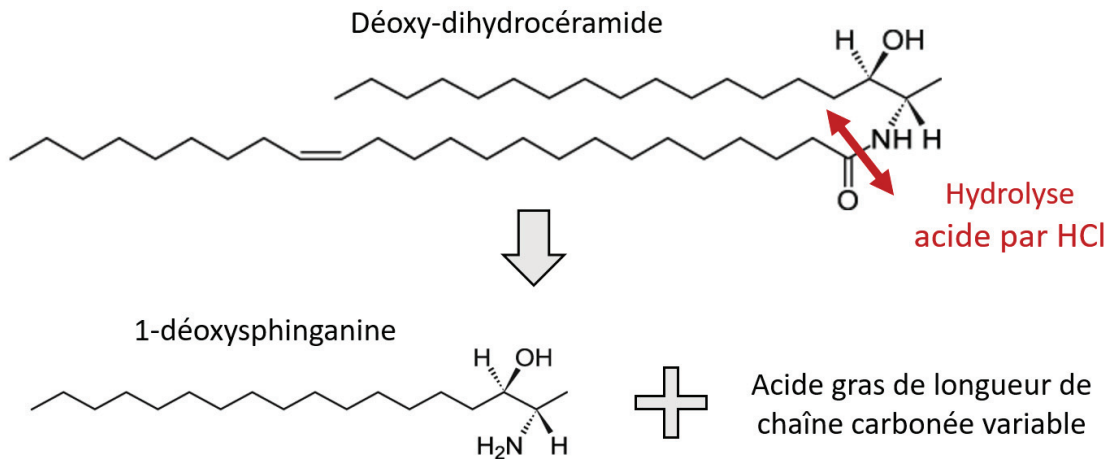


Figure 13 : Hydrolyse acide des déoxy-dihydrocéramides

On dispose d'un étalon de dSA, commercialisé par Avanti polar lipids, Inc®, et de D3-déoxysphinganine (D3-dSA), un SI deutéré, commercialisé par la même entreprise. (Figure 14)

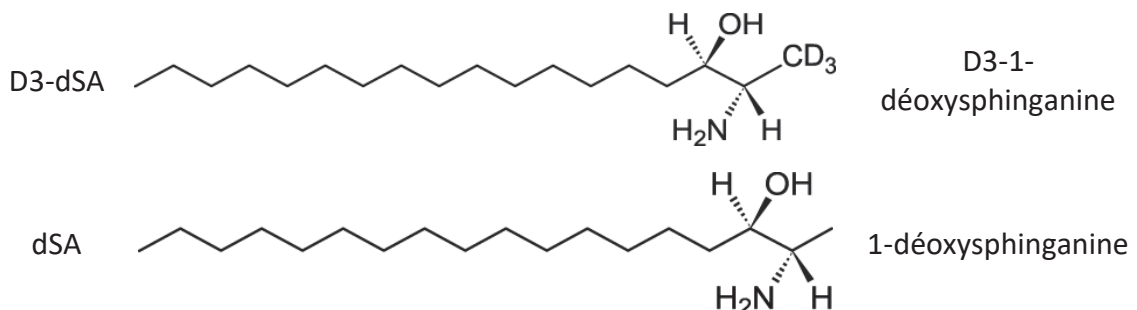


Figure 14 : Bases sphingoïdes étudiées

3.3 Réactifs utilisés

Les solutions de standard de dSA et de SI deutéré de D3-dSA sont préparées dans du méthanol et conservées à -20°C. Les autres réactifs utilisés sont conservés à température ambiante et préparés en amont : méthanol, ammoniacque 2N, chloroforme, eau alcaline, Méthanol – HCl, KOH 5M, Méthanol – KOH 0.125M.

3.4 Spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

L'appareil utilisé est l'API 4500 Q-Trap (AbSciex©). La détection des molécules d'intérêt est faite en mode MRM, avec des transitions spécifiques. L'intégration des résultats et la quantification des pics sont ensuite réalisées sur le logiciel ANALYST version 1.6.2. La quantification de chaque analyte est réalisée à partir du rapport des surfaces des pics Analyte/SI.

3.5 Chromatographie liquide (LC)

Une étape préalable d'HPLC est nécessaire avant l'analyse des échantillons par MS/MS. Cette séparation est réalisée sur une colonne de silice C8 (Uptisphère, Interchim©), équipée d'une pré-colonne, sur un appareil d'HPLC (Shimadzu©). Deux phases mobiles sont utilisées pour réaliser le gradient d'élution : de l'eau additionnée d'acide formique 0,2% (phase A) et de l'acétonitrile (ACN) additionné d'acide formique 0,2% (phase B).

3.6 Préparation des échantillons

Une étape d'extraction lipidique, suivie d'une hydrolyse acide puis basique est nécessaire avant analyse des échantillons sur les appareils. (Annexe 2) Elles se font après sonication des prélèvements, trois fois 10 secondes pour un volume maximal de 1,5 mL. Les techniques mises en place se basent sur les protocoles utilisés par Penno et al. et Mwinyi et al. (25,127) Brièvement, 100 µL d'échantillon (plasma ou contrôle) et 100 µL d'ammoniacque sont ajoutés à 500 µL de solution de SI, pour être agités une heure à 37°C. Après ajout de 500 µL de chloroforme et 200 µL d'eau alcaline, l'échantillon est centrifugé à vitesse maximale pour isoler la phase chloroformique du surnageant et de l'interphase protéique. Cette phase chloroformique est ensuite lavée à trois reprises par 1mL d'eau

alcaline, puis séchée sous azote. Le culot est repris dans 200 μ L de solution de méthanol-HCl, pour une incubation d'une nuit à 65°C. Suite à cette hydrolyse acide, l'échantillon est neutralisé par du KOH. L'hydrolyse basique est réalisée par ajout, dans cet ordre, de 500 μ L d'une solution de Méthanol-KOH et Chloroforme, 500 μ L de chloroforme, 500 μ L d'eau alcaline et 100 μ L d'ammoniaque. Après centrifugation et récupération de la phase inférieur chloroformique, cette dernière est lavée deux fois dans 1 mL d'eau alcaline et séchée sous azote. Pour être passés en LC-MS/MS, les culots sont repris dans 500 μ L de méthanol.

3.7 Mise en place de la méthode

Les étapes de validation de la méthode, d'établissement des valeurs normales et d'études des plasmas de patients sont précédées d'une importante phase d'optimisation de la méthode, tant de l'étape d'extraction et de préparation des échantillons que du paramétrage des appareils de LC-MS/MS.

3.8 Validation technique

La validation de méthode a été réalisée selon les recommandations du Comité Français d'Accréditation (COFRAC), dans le document SH GTA 04. (135) Pour la mise en place de ce dosage ont été évalués la répétabilité, la fidélité intermédiaire et la contamination inter-échantillons. Les limites de quantification et de linéarité haute ont également été déterminées. La quantification est réalisée grâce à une gamme externe composée de sept points de concentrations connue en standard, également extraite en parallèle de chaque série.

3.9 Analyse statistique

Une analyse statistique des résultats des patients contrôles a été réalisée sur le logiciel GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software ©).

4 Résultats

4.1 Mise en place de la méthode

4.1.1 Chromatographie liquide (LC)

Après une phase stable à 37,5% d'ACN, les composés sont élués à 60% d'ACN. Une étape de rinçage de la colonne à 75% d'ACN est réalisée, avant rééquilibration à 37,5%. (Annexe 2) La dSA, comme son SI deutéré, ont un temps de rétention de 5,7 minutes environ.

Dans les données de bibliographie sur les dosages de dSL, c'est classiquement une colonne C18 qui est utilisée pour l'étape de LC. Les paramétrages de cette étape sont adaptés à partir de ceux utilisés pour le dosage des lysosphingolipides. Or aux HCL, les dosages de lysosphingolipides sont réalisés sur colonne de silice C8. Un échantillon du pool témoin et un échantillon de pool positif, extraits et hydrolysés, ont donc été passés sur chacune de ces deux colonnes pour identifier l'impact de la composition de la phase stationnaire sur les temps de rétention et la quantification. (Tableau 5) Le temps de rétention des analytes est légèrement différent, mais n'a pas d'impact sur le rendu des résultats, et il n'existe pas de différence de quantification. Il est donc possible de réaliser l'étape de chromatographie liquide sur colonne C8.

Tableau 5 : Impact de la composition de la colonne de chromatographie liquide sur le temps de rétention et la quantification de dSA totale

		Composition phase stationnaire	
		colonne	
		C18	C8
D3-dSA	Temps de rétention (min)	4,06	5,7
	Temps de rétention (min)	4,06	5,7
dSA totale	Concentration (nM)	Pool témoin	96,6
		Pool positif	614

4.1.2 Spectrométrie de masse en tandem (MS/MS)

L'optimisation des paramètres de masse a été réalisée par infusion directe de chaque molécule, à une concentration d'environ 50 μM . Pour le standard de dSA comme pour le SI deutéré, les transitions caractéristiques de l'ion parent et de l'ion fils ont été déterminées en mode positif et en mode négatif. Pour la dSA et la D3-dSA, le mode d'ionisation en électro spray et en mode positif est le plus adapté. Les paramètres électriques ont été optimisés pour chaque transition : Declustering Potentiel (DP), Collision Energy (CE). La transition la plus sensible et la plus spécifique a été sélectionnée pour chaque molécule. (Tableau 6)

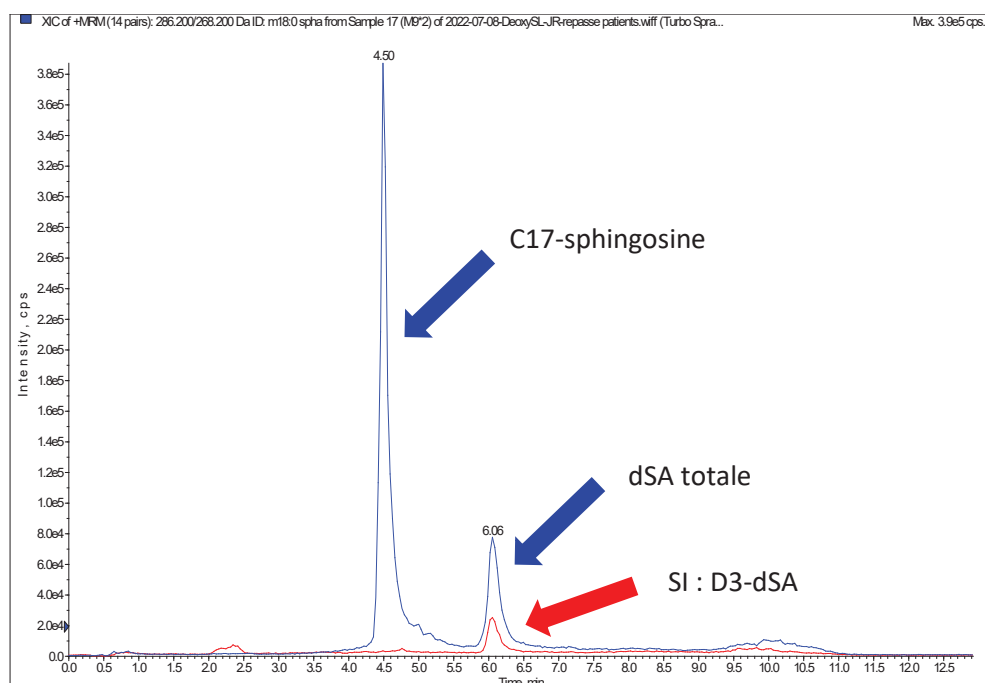


Figure 15 : Profil de la dSA totale plasmatique d'un patient contrôlé et de son SI en LC-MS/MS

Les paramétrages de l'HPLC et du spectromètre de masse en tandem permettent d'obtenir des profils de spectrométrie avec une bonne séparation du composé d'intérêt. (Figure 15) Le profil de spectrométrie de masse de la dSA met en évidence le pic de dSA, mais également un composé isomasse et présentant les mêmes transitions : la C17-sphingosine. C'est un sphingolipide atypique mais néanmoins physiologique, et donc présent dans des concentrations bien plus importantes que la dSA. La C17-sphingosine présente un rapport m/z identique à la dSA mais un comportement différent en LC. La

dSA, plus hydrophobe du fait de la perte du groupement hydroxyle, est retenue plus longtemps. Le SI deutéré va avoir le même comportement en LC que la molécule d'intérêt, et donc le même temps de rétention, mais est identifiable en MS/MS grâce à sa masse différente.

Tableau 6 : Transitions retenues pour le dosage des bases déoxysphingoides étudiées, mode d'ionisation sélectionné et temps de rétention chromatographiques

	PM (g/mol)	Mode	Transition	DP(V)	CE (eV)	RT (min)
dSA	285,508	[ESI+]	286.2/268.2	100	18	5,7
D3-dSA	288,527	[ESI+]	289.2/271.2	100	18	5,7

PM : Poids Moléculaire, [ESI+] : Positive ElectroSpray Ionisation, DP : Declustering Potential, CE : Collision Energy, RT : temps de rétention

4.1.3 Préparation des échantillons

Le protocole d'extraction et d'hydrolyse acide puis basique a été élaboré après revue de la bibliographie, et est basé sur les méthodes de dosage employées par Penno et al. et Mwinyi et al. (25,127) La mise en place de la méthode au laboratoire a nécessité l'optimisation de différents paramètres de ce protocole : la nécessité de l'étape de sonication, et l'impact de la réalisation et de la durée de l'hydrolyse acide sur la quantification de dSA totale.

Deux échantillons du pool témoin ont été extraits en parallèle, un seul d'entre eux ayant subi une étape préalable de sonication. Après analyse des deux échantillons, l'importance de cette étape est clairement visible : la sonication permet d'obtenir un taux de dSA totale plasmatique presque deux fois supérieur, et ainsi d'augmenter la sensibilité analytique de la technique.

Pour évaluer l'impact de l'étape de l'hydrolyse acide sur le résultat de l'analyse, deux échantillons du pool témoin ont été extraits. L'un d'entre eux a subi le protocole de double hydrolyse, alors que le second n'a subi que l'hydrolyse alcaline après reprise du culot obtenu post extraction dans 200 µL de méthanol. Tout comme la sonication, l'étape d'hydrolyse acide est indispensable et améliore grandement la sensibilité analytique, puisqu'il y a un ratio de plus de 20 entre la quantité mesurée avec et sans cette étape.

(Tableau 7) Cependant, la durée de cette étape à partir d'un certain temps, ne semble plus avoir d'effet déterminant. On a comparé l'effet de cette durée d'hydrolyse acide sur deux échantillons du pool de plasmas normaux : un plasma est resté 11h au four à 65°C, et l'autre 16h. Il n'existe pas de différence de taux de dSA totale dosée dans ces deux échantillons.

Tableau 7 : Impact de la sonication et de l'hydrolyse acide sur la quantification de dSA totale plasmatique

	Sonication		Hydrolyse acide			
	Pool témoin non soniqué	Pool témoin soniqué	Pool témoin sans hydrolyse acide	Pool témoin avec hydrolyse acide	Pool témoin hydrolyse acide 11h	Pool témoin hydrolyse acide 16h
dSA (nM)	34,9	62,5	4,7	75,3	112	116

4.2 Validation de méthode

4.2.1 Gamme externe

Pour rendre des résultats quantitatifs et s'affranchir des variations inter-extractions, il a été nécessaire de mettre en place une gamme externe. Elle a été réalisée par dilutions successives de standard de dSA en concentration connue dans du méthanol. Cette gamme externe est composée de sept points, et couvre la majorité du domaine de linéarité de la méthode de dosage, de 1 nM à 1000 nM. A chaque nouvelle extraction est extraite en parallèle une gamme externe.

4.2.2 Contrôles internes de qualité et fidélité intermédiaire

Pour évaluer la fidélité intermédiaire et servir de contrôle interne de qualité, le pool témoin et le pool positif sont utilisés, reflétant respectivement les taux plasmatiques physiologiques et pathologiques de dSA totale. Un échantillon de chaque niveau est extrait et analysé en parallèle de chaque extraction. Les données de fidélité intermédiaire, bien qu'obtenues à partir d'effectifs réduits (n=8), sont satisfaisantes car inférieures à 20%. (Tableau 8)

4.2.3 Répétabilité

La répétabilité a été évaluée sur deux niveaux : un niveau bas, soit le pool témoin, avec un taux de dSA totale physiologique, et un niveau haut, correspondant au pool positif, chargé en dSA pour obtenir un taux proche des valeurs pathologiques retrouvées chez les patients HSAN1. Pour chaque niveau, la répétabilité a été évaluée sur dix extractions successives, et un coefficient de variation (CV) inférieur à 5% est retrouvé.

Tableau 8 : Validation de la méthode : résultats de l'étude de la contamination inter-échantillon, domaine de mesure, répétabilité (variabilité intra série) et fidélité intermédiaire (variabilité inter séries)

	Répétabilité n = 10		Fidélité intermédiaire n = 8	
	Pool témoin	Pool positif	Pool témoin	Pool positif
CV (%)	4,5	3,4	16,2	14,0
Moyenne dSA totale (nM)	87,1	580,4	92,7	566,4

Domaine de mesure		Contamination inter-échantillons
LoQ (nM)	Limite de linéarité haute (nM)	Pool témoin / positif
1	2000	< 0,01 %

4.2.4 Contamination inter-échantillons

L'évaluation de la contamination inter-échantillons a été réalisée d'après les recommandations du SH GTA 04, en utilisant le pool de plasmas normaux et le pool de plasma chargé en dSA comme niveaux bas et haut. Elle a été évaluée sur cinq cycles successifs comme étant inférieure à 0.01%. (Tableau 8)

4.2.5 Limite de détection, de quantification et de linéarité

La limite de quantification (LoQ) correspond à la plus petite valeur mesurée exprimée en concentration, rendue avec un niveau de confiance acceptable, soit la plus petite dilution pour laquelle le CV de répétabilité est inférieur à 10% pour 5 mesures. Pour notre méthode de dosage, la LoQ est de 0.5×10^{-3} nM. (Figure 16)

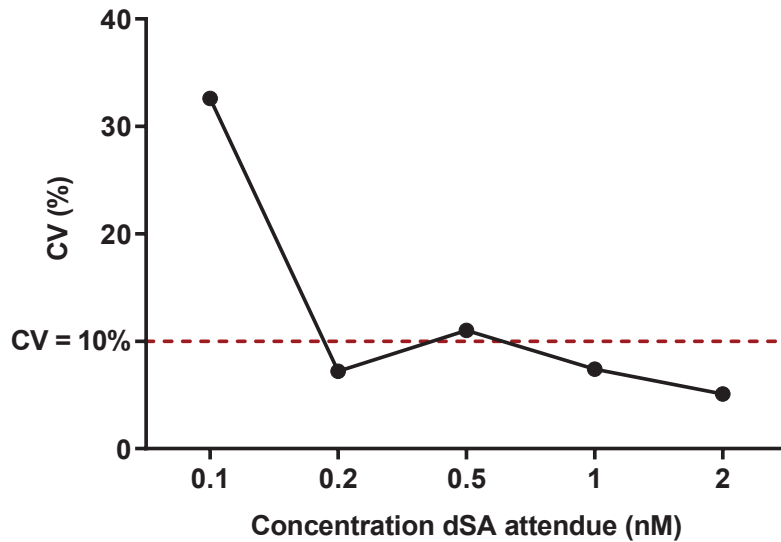


Figure 16 : Courbe d'Horwitz pour la détermination graphique de la limite de quantification

La limite de linéarité haute correspond au dernier point avant le point d'inflexion de la courbe de gamme, avec un biais de moins de 10% par rapport à la valeur attendue. (Figure 17)

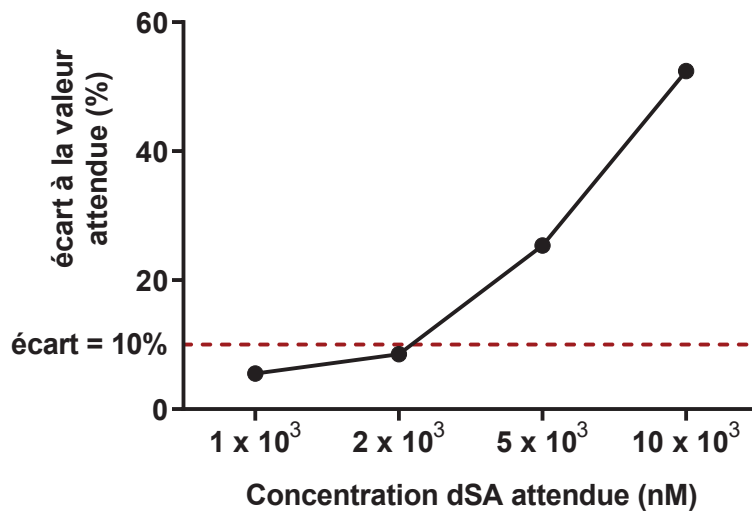


Figure 17 : Détermination graphique de la limite haute de linéarité

4.3 Valeurs normales

Pour établir les valeurs normales de dSA totale plasmatiques, cinquante patients adultes ont été sélectionnés parmi les patients ayant eu des résultats normaux de recherche de sphingolipidose entre mai 2021 et janvier 2022. Ces patients sont répartis également entre les hommes et les femmes, et de manière relativement homogène entre les différentes catégories d'âge. (Figure 18)

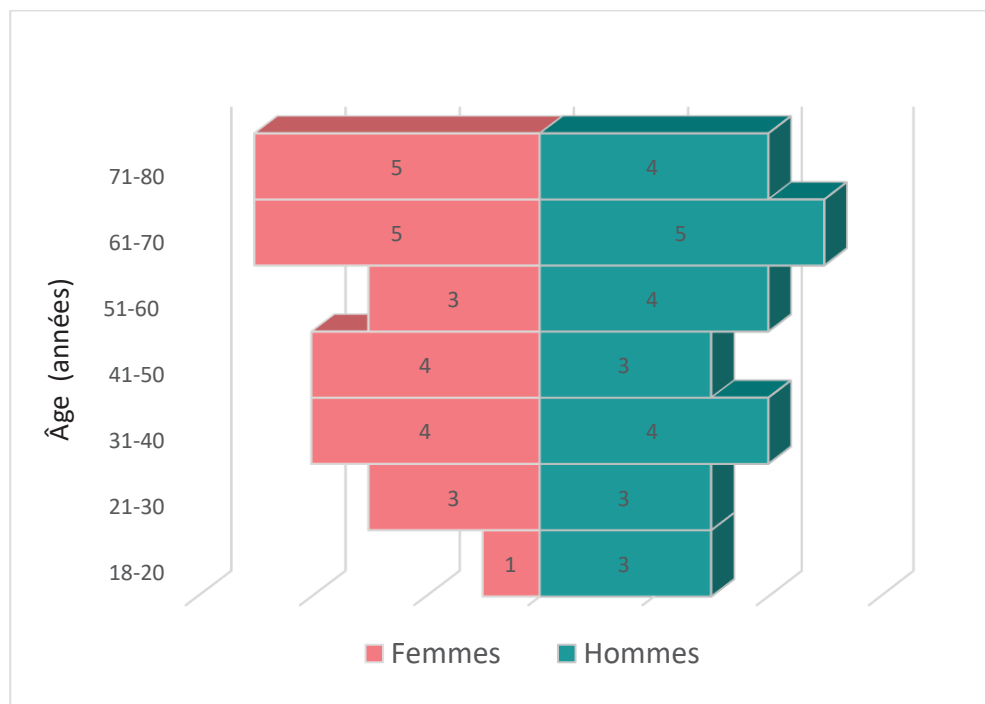


Figure 18 : Répartition des patients contrôles par sexe et par catégorie d'âge

Le taux de dSA totale plasmatique a été dosé chez chacun de ces patients. (Figure 19) Les valeurs normales ont été établies en suivant les recommandations du COFRAC (135) :

- sur un nombre significatif de valeurs (n=50)
- à partir de patients à priori exempts de pathologie
- en écartant les valeurs aberrantes
- en écartant toutes les valeurs $> m + 2s$ et $< m - 2s$
- recalcul de la moyenne et de l'écart-type une fois ces valeurs écartées

Les valeurs de référence sont données par l'intervalle $[m - 2s ; m + 2s]$.

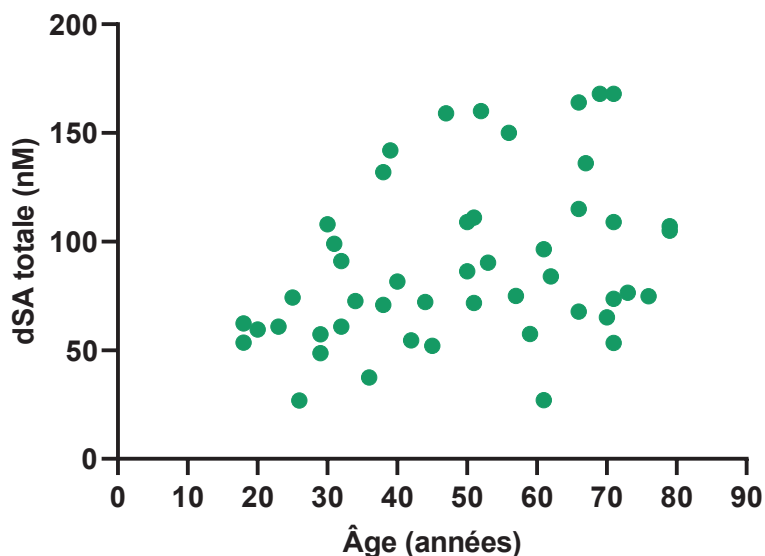


Figure 19 : Concentration de dSA totale plasmatique en fonction de l'âge chez les patients contrôles

Pour l'établissement des valeurs normales de dSA totale plasmatique, une valeur aberrante est écartée. L'intervalle de valeurs normales est recalculé comme étant [14.4 nM ; 164.2 nM]. A l'heure actuelle seule l'élévation des dSL étant identifiée et associée à une pathologie, on considérera que pour le dosage plasmatique de dSA totale par LC-MS/MS, les valeurs normales sont inférieures à 165 nM, avec une moyenne de 90nM. (Tableau 9)

Tableau 9 : Valeurs normales établies de dSA totale plasmatique

Concentration en dSA totale plasmatique (nM)	
moyenne	89,3
écart type	37,4
m + 2s	164,2
m - 2s	14,4

Seuil pathologique établi : **< 165 nM**

Le test de Shapiro-Wilk montre une absence de répartition normale des valeurs de dSA totale obtenues ($p = 0.0088$), qui se retrouve sur l'histogramme des valeurs de dSA totale dans la population contrôle. (Figure 20) Cette absence de normalité peut être

expliquée par l'existence d'une corrélation significative entre l'âge des sujets et leur taux physiologique de dSA totale. En effet, un test de corrélation non paramétrique de Spearman montre que le taux de dSA totale augmente significativement avec l'âge ($p=0,0057$). Il n'existe cependant pas d'impact significatif du sexe sur les valeurs normales plasmatique de dSA totale (test non paramétrique de Student, $p = 0.8167$). (Figure 21)

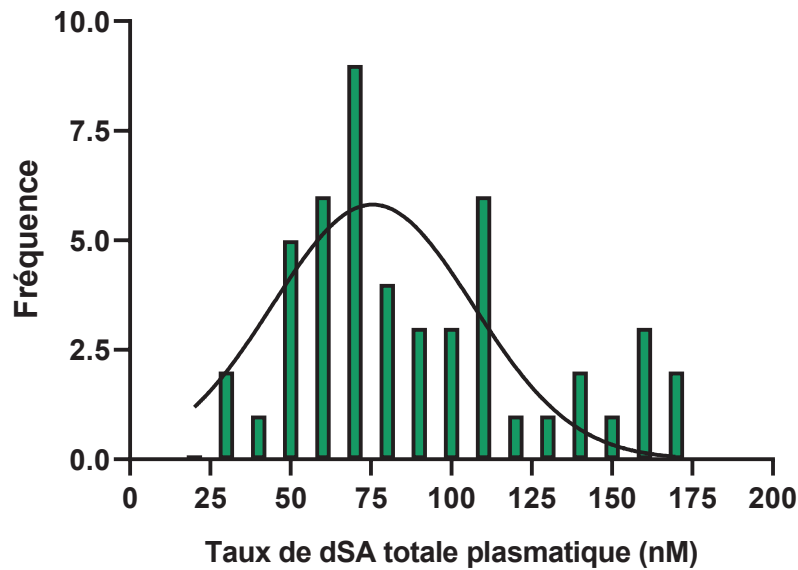


Figure 20 : Histogramme de fréquence des concentrations plasmatiques de dSA totale chez les patients contrôles et comparaison à une répartition gaussienne

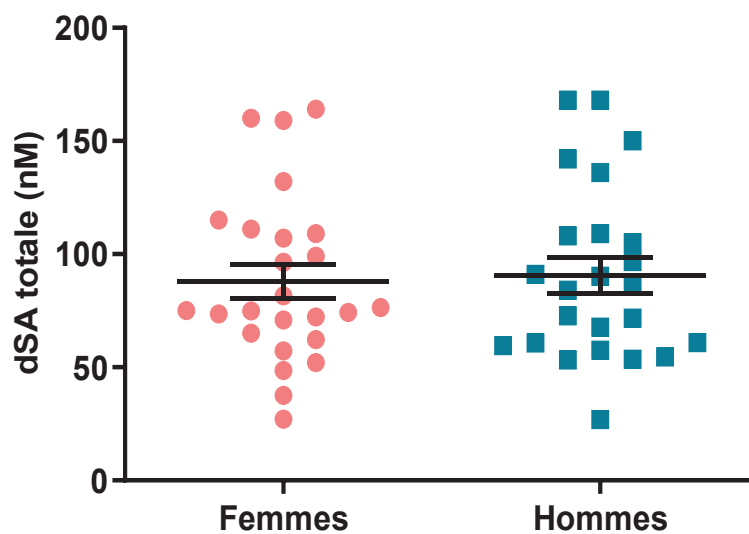


Figure 21 : Répartition des concentrations en dSA totale en fonction du sexe chez les patients contrôles

4.4 Patients avec suspicion de HSAN1

4.4.1 Renseignements cliniques

Les renseignements cliniques ont été principalement récoltés auprès du Centre de Référence des Maladies Neuromusculaires et de la Sclérose Latérale Amyotrophique à Marseille : auprès des neurologues des patients et généticiens responsables de leur prise en charge. (Tableau 10) Les patients présentent bien les signes cliniques caractéristiques de HSAN1 : perte de sensibilité distale à la douleur et à la température, touchant majoritairement les membres inférieurs. Les atteintes motrices sont beaucoup plus fréquentes que les troubles autonomes, et les maux perforants plantaires sont les complications le plus fréquemment rapportées. La biopsie nerveuse est rarement réalisée, et quand elle l'est, elle retrouve bien l'atteinte axonale caractéristique de la pathologie.

Tableau 10 : Principales caractéristiques cliniques des patients avec suspicion de HSAN1

Patient	Démographie		Analyse moléculaire		Autre membre de la famille	Âge d'apparition	Atteinte neurologique										Autres atteintes	Traitement par L-sérine	
	Age	Sexe	Gène	Variant			Troubles sensitifs					Troubles moteurs				Biopsie nerveuse		Mise en place	Amélioration clinique
							MS	MI	Perte de sensibilité distale :	Douleurs lancinantes	Paresthésies	MS	MI	Atteinte motrice	Atrophie musculaire				
1	20	F	SPTLC1	c.992C>T	/	congénital		X	douleur				X	X	X	/	Maux perforants, reflux gastro-œsophagien		
2	65	M	SPTLC1	c.998A>G															
3	42	F	SPTLC1	c.1015G>A	/	10	X	X	douleur, température				X	X	X	/	Maux perforants		
4	54	F	SPTLC1	c.451C>T	non	/	X	X	douleur, température	X	X	X	X	X	Atteinte axonale				
5	71	M	SPTLC1	c.1429G>A	non	67		X	douleur, température		X				/				
6	63	F	SPTLC1	c.10G>A															
7	53	F	SPTLC1	c.71A>G	mère	/		X	douleur, température	X	X		X	X	Atteinte axonale				
8	74	M	SPTLC2	c.547C>T	non	/		X	douleur, température				X	X	X	/		oui	
9	47	M	SPTLC2	c.1304G>T	père + frère	12	X	X	douleur, température	X	X	X	X	X	X	/	Maux perforants, ulcérations	oui, sans protocole	Diminution douleurs + amélioration sensibilité au tact sur MI
10	43	M	SPTLC2	c.1304G>T	père + frère	16		X	douleur, température		X		X	X	X	/			Amélioration tact et motricité MI
11	76	M	SPTLC2	c.1304G>T	fil	20	X	X	douleur, température	X	X	X	X	X	X	/	Maux perforants plantaires		Diminution douleurs neuropathiques
12	63	F	SPTLC2	c.1660G>A	/	/		X					X		/				

MI : Membres inférieurs, MS : Membres supérieurs

4.4.2 Génétique moléculaire

Une caractérisation fonctionnelle par dosage de dSL a été demandée chez les douze patients, principalement à la suite de l'identification d'un variant non caractérisé de *SPTLC1* ou *SPTLC2*, dans un contexte clinique compatible avec HSAN1. Sept de ces patients présentent un variant de *SPTLC1*, les cinq autres un variant de *SPTLC2*. (Tableau 11) Deux des variants identifiés sont déjà décrits : *SPTLC1* p.S331F (58,114) et *SPTLC2* p.R183W. (117) Ils sont donc déjà classés comme « probablement pathogènes ». Les autres variants ne sont à ce jour pas décrits dans la littérature.

4.4.3 Dosage de la dSA totale plasmatique

Le dosage de dSA totale plasmatique représente un test *in vitro* démontrant le caractère pathogène ou non des différents variants non décrits et caractérisés. Cela permet donc d'ajouter un argument pour la classification des variants selon les recommandations de l'ACMG, permettant dans la majorité des cas de discriminer les variants catégorisés comme VUS. Un taux pathogène de dSA totale correspond au critère PS3, soit « preuve solide de pathogénicité », alors qu'un taux comparable à ceux de la population contrôle est un critère BS3, de « preuve solide d'impact bénin » du variant. (98) Le Tableau 11 présente la classification ACMG établie par ALAMUT™, ainsi que les modifications de classifications obtenues en ajoutant les données de test fonctionnel. La conclusion clinico-biologique tient compte de ce score et conclue sur la pathogénicité de chacun des nouveaux variants.

Les résultats de dosage de dSA totale chez les patients avec suspicion de HSAN1 les séparent en deux grandes catégories : les patients avec un taux de dSA totale plasmatique comparable aux patients contrôles, et les patients avec un taux élevé de dSA totale, équivalent à environ sept fois les valeurs normales. (Figure 22 , Tableau 11) Ce test fonctionnel permet donc de discriminer les patients avec un variant de *SPTLC1* ou *SPTLC2* non pathogène, et donc sans impact sur le taux de dSL, de ceux entraînant une élévation importante des dSL, et donc étant pathogènes. Le patient porteur du variant *SPTLC2* p.R183W, connu comme probablement pathogène, est supplémenté par L-sérine, ce qui

Tableau 11: Variants identifiés chez les douze patients avec suspicion de HSAN1 et apport des résultats du test fonctionnel dans leur classification

Patient	Âge	Sexe	Gène	Variant génétique	Variant protéique	Classification selon les recommandations de l'ACMG (98)	dSA totale (nM)	Classification avec résultat du test fonctionnel	Conclusion clinico-biologique
1	20	F		c.992C>T	p.S331F	Probablement pathogène	717	Pathogène	Pathogène
2	65	M		c.998A>G	p.Gln333R	VUS	682	Probablement pathogène	Probablement pathogène
3	42	F		c.1015G>A	p.A339T	VUS	1310	Probablement pathogène	Probablement pathogène
4	54	F	<i>SPTLC1</i>	c.451C>T	p.R151C	VUS	87,3	VUS	Probablement bénin
5	71	M		c.1429G>A	p.A477T	VUS	110	Probablement bénin	Probablement bénin
6	62	F		c.10G>A	p.A4T	VUS	71,5	Probablement bénin	Probablement bénin
7	53	F		c.71A>G	p.H24R	VUS	100	Probablement bénin	Probablement bénin
8	74	M		c.547C>T	p.R183W	Probablement pathogène	704	Pathogène	Pathogène
9	47	M		c.1304G>T	p.G435V	VUS	245	/	Probablement pathogène
10	43	M	<i>SPTLC2</i>	c.1304G>T	p.G435V	VUS	151	/	Probablement pathogène
11	76	M		c.1304G>T	p.G435V	VUS	219	/	Probablement pathogène
12	63	F		c.1660G>A	p.E554K	VUS	71,3	Probablement bénin	Probablement bénin

Valeurs normales de dSA totale plasmatique (nM) < 165

Variants déjà décrits dans la littérature

pourrait fausser le dosage de dSA totale pour un diagnostic. Cependant le plasma a été prélevé avant la mise en place du traitement.

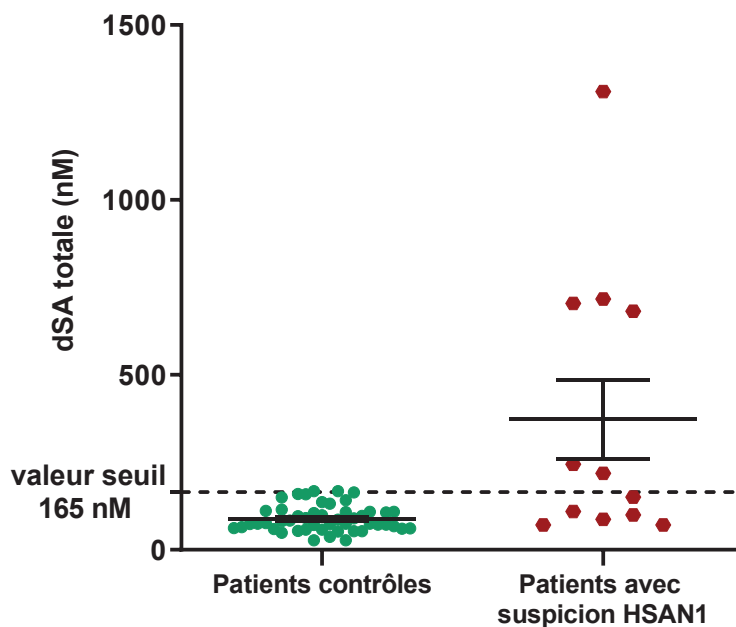


Figure 22 : Répartition de la concentration en dSA totale plasmatique chez les patients contrôles et avec suspicion de HSAN1

Trois patients d'une même famille, porteurs du même variant *SPTLC2* p.G435V, présentent des résultats modérément élevés de dSA totale, proches des valeurs normales. Ce sont des patients ayant mis en place une supplémentation par L-sérine, sans suivre de recommandations de protocole ou de posologie. Ces résultats sont donc potentiellement faussés par un traitement thérapeutique. Ils ne peuvent ainsi pas servir de preuve formelle par test fonctionnel, et permettre d'avancer un argument supplémentaire pour la classification des variants selon les recommandations de l'ACMG. (98) Cependant devant le résultat modérément élevé, malgré la prise de L-sérine, il s'agit probablement de variants entraînant un changement du substrat préférentiel de la SPT. La conclusion clinico-biologique est donc en faveur d'un variant pathogène.

5 Discussion

Les dSL sont des composés pouvant servir de biomarqueurs pour caractériser les variants des gènes *SPTLC1* et *SPTLC2*. La mise en place du dosage et de la quantification de la dSA totale sont développés dans ce travail pour étudier la pertinence de ce test fonctionnel dans un contexte de diagnostic de HSAN1.

L'analyse par LC-MS/MS en mode MRM a permis d'analyser de manière spécifique la dSA totale, caractérisée par ses transitions. La quantification est rendue possible par l'élaboration d'une gamme externe à partir de dilutions d'un standard de dSA en concentration connue. Le profil chromatographique montre une excellente séparation de la dSA totale.

La validation de méthode, réalisée selon le SH GTA 04, donne des résultats satisfaisants. Le domaine de mesure présente une linéarité haute et une limite de quantification adaptées aux valeurs attendues, qui permettent d'analyser des concentrations physiologiques et pathologiques de dSA totale sans dilution. La contamination inter échantillons est inférieure à 1% grâce à un rinçage automatique de l'aiguille d'injection avant et après aspiration de l'échantillon. Les données de répétabilité sont acceptables pour une technique d'extraction manuelle, les CV étant inférieurs à 5% tant pour le pool témoin que pour le pool positif. Les effectifs de la fidélité intermédiaire sont trop faibles ($n = 8$), et méritent d'être complétés, cependant il semble exister un biais inter-séries de l'ordre de 15% pouvant être expliqué notamment par les très faibles quantités dosées (nM).

L'étude de cinquante patients contrôles a permis d'établir un seuil « pathologique » de la concentration plasmatique de dSA totale. Ce taux est comparable à des patients contrôles dans les études précédentes. (25) Il existe cependant un léger biais de sélection de ces patients, qui s'ils sont considérés comme « sains » au vu des résultats de dosages de lysosphingolipides réalisés, ont néanmoins un contexte clinique ou familial ayant conduit à ces analyses. Il faudrait intégrer et étudier des patients de la population générale pour établir des valeurs normales et un réel seuil pathologique. De plus, il s'agit d'un seuil établi arbitrairement, selon des méthodes non adaptées au contexte : nouveau

dosage sans méthode de référence, technique d'extraction manuelle, petit panel de plasmas de patients contrôlés... La méthode des multiples de la médiane peut également être envisagée, mais rend des résultats similaires à celle utilisant l'écart-type. Dans tous les cas, il convient de ne pas être trop restrictif dans le rendu des résultats, et de tenir compte du contexte clinico-biologiques, notamment des renseignements cliniques et des données de biologie moléculaire. Il existe forcément une « zone grise » dans laquelle les résultats du test fonctionnel isolés ne permettent pas de trancher sur le diagnostic.

Le travail de mise en place de la méthode a mis en évidence l'intérêt des étapes de sonication et d'hydrolyse acide dans l'optimisation de la technique. La sonication, par application d'une onde ultrasonore de fréquence supérieure à 20kHz, permet de désorganiser les membranes biologiques et donc de récupérer les éléments qui les composent. Or les SL de manière générale, et les dSL par extension, sont des composés essentiels des membranes cellulaires, et sont retrouvés dans les lipoprotéines, bien plus que sous forme libre. La sonication de l'échantillon plasmatique permet donc de récupérer les dSL présents dans les lipoprotéines, et ainsi d'augmenter fortement la sensibilité analytique.

Travailler dans du méthanol permet de rompre les éventuelles liaisons protéiques, et de précipiter les protéines plasmatiques pour s'en débarrasser. L'étape d'hydrolyse alcaline permet quant à elle de s'affranchir des triglycérides et autres lipides complexes. On travaille donc sur un échantillon où l'impact de la matrice est quasi nul.

L'hydrolyse acide va rompre la liaison amide entre la base sphingoïde et l'acide gras. Cette étape permet de s'affranchir des variations liées à la longueur de cette chaîne d'acide gras, et d'augmenter la sensibilité analytique de la méthode en ne dosant pas de nombreux composés en très petites quantités mais uniquement leur base sphingoïde commune. Dans le cas de la dSA, on dosera à la fois la dSA sous forme libre, mais également la base déoxysphingoïde issue de l'hydrolyse acide des déoxy-dihydrocéramides : c'est ce que l'on appelle la dSA totale. Les tests de l'impact de l'étape d'hydrolyse acide sur la quantification finale ont démontré que cette étape permettait une forte élévation de la concentration finale de dSA dosée. Cela rejoint les résultats d'études précédentes, qui démontrent que la neurotoxicité des dSL n'est pas

due aux bases déoxysphingoïdes que sont la dSA et la dSO, mais majoritairement à leurs dérivés N-acylés, respectivement les déoxy-dihydrocéramides et les déoxycéramides (89,97,106,136).

Historiquement, deux bases déoxysphingoïdes peuvent être dosées : la dSA et la dSO. La dSA totale dosée correspond donc à la dSA sous forme libre, mais également à la base déoxysphingoïde issue de l'hydrolyse acide des déoxy-dihydrocéramides. La dSO totale correspond à la somme de la forme libre et de la base déoxysphingoïde résultant de l'hydrolyse acide des déoxycéramides. Dans ce travail, seul le dosage de dSA a été mis en place. Le dosage de dSO n'a pas pu être développé de manière suffisamment satisfaisante : le pic était inconstant sur le profil de spectrométrie de masse. Les paramétrages de LC-MS/MS et l'utilisation de transitions définies permettent d'identifier et de quantifier la dSA totale spécifiquement. Cependant, le protocole d'extraction lipidique suivi d'une double hydrolyse permet en théorie d'étudier la totalité des bases sphingoïdes et déoxysphingoïdes issues du plasma initial. Issus de la condensation d'un acide aminé avec le palmitoyl-CoA, on retrouve la dSA, la dSO, et les bases sphingoïdes canoniques, la sphinganine et la sphingosine. Ces dernières sont présentes de manière physiologique en très grande quantité. Si le ratio dSA totale/sphinganine totale permet d'isoler et de quantifier le pic de dSA par LC-MS/MS, il n'en est pas de même pour la dSO. En effet, il est difficile de séparer la dSO de la sphingosine, compte tenu du ratio très important entre les taux plasmatiques de ces deux composés. Le paramétrage actuel de la LC-MS/MS ne permet donc actuellement pas un dosage satisfaisant de la dSO. Cependant, les résultats de ce travail ont démontré que le dosage de la dSA totale était suffisant pour conclure sur le caractère pathologique ou non des variants étudiés. Le dosage de dSA totale est donc un test fonctionnel en lui-même, et n'a pas besoin d'être complété par le dosage de dSO pour le diagnostic de HSAN1.

L'objectif initial de ce travail était de développer un test fonctionnel pour caractériser de nouveaux variants de *SPTLC1* et *SPTLC2* dans un contexte de suspicion de HSAN1, en développant un dosage de dSA totale plasmatique. Les deux patients présentant un variant de *SPTLC1* ou *SPTLC2* connu et caractérisé comme probablement pathogène (patient 1 : *SPTLC1* p.S331F, patient 8 : *SPTLC2* p.R183W) présentent bien une

concentration significativement élevée de dSA totale plasmatique, ce qui est concordant avec les résultats d'études précédentes. (103,117) Cela permet de valider la pertinence du test fonctionnel mis en place. Les résultats de dSA totale plasmatique obtenus chez les patients avec suspicion de HSAN1 permettent de caractériser de manière satisfaisante les variants identifiés de *SPTLC1* et *SPTLC2* : certains patients présentent un taux parfaitement comparable à ceux observés chez la cohorte de patients contrôles, et les autres ont un taux significativement plus élevé, entre huit et quinze fois supérieur. Pour les patients 9, 10 et 11, porteurs d'un variant *SPTLC2* p.G435Va, le taux de dSA totale n'est retrouvé que faiblement augmenté du fait de l'interférence par la supplémentation en L-sérine. En dehors de ce cas particulier, le résultat de dosage de dSA totale est donc un argument solide pour la classification des variants selon l'ACMG.

Si le test fonctionnel est concordant avec les études précédentes et permet de discriminer de manière tout à fait satisfaisante les nouveaux variants des sous-unités de la SPT, il est intéressant de mettre en relation ces résultats de biochimie avec ceux obtenus par biologie moléculaire. En effet, l'étude des domaines fonctionnels des sous-unités *SPTLC1* et *SPTLC2*, ainsi que la modélisation en trois dimensions de ces protéines et de leurs interactions peuvent étoffer les arguments quant à la pathogénicité d'un variant. Des études ont déjà été menées sur la relation structure – fonction au sein de SPT, en analysant les variants précédemment identifiés. (102,105) Ces études structurales nécessitent une analyse approfondie, avec étude des domaines fonctionnels, des contraintes physico-chimiques, des encombrements stériques... Des scores de contraintes, de conservation et des outils de modélisation intégrant de nombreuses données existent déjà pour permettre ce travail. Cependant, les outils de modélisation *in silico* ne sont pas encore très performants quand il s'agit de gain ou modification de fonction d'une enzyme comme c'est le cas ici, particulièrement quand il s'agit d'un complexe protéique.

Néanmoins, pour certains des variants des patients étudiés, étudier leur localisation au sein du complexe protéique peut rapidement exclure leur pathogénicité, ou à l'inverse, en faire un sérieux candidat potentiellement pathogène. Par exemple, les variants *SPTLC1* c.10G>A et *SPTLC1* c.71A>G sont situés proches de l'extrémité 5' du gène *SPTLC1*. L'étude des domaines fonctionnels de la sous-unité protéique codée montre bien que ces deux

variants vont affecter des acides aminés respectivement au niveau des domaines intraluminal et transmembranaire. Le variant *SPTLC1* c.10G>A est situé dans la lumière du réticulum endoplasmique. Or, la première étape de condensation d'un acide aminé et d'un acyl coA par la SPT se déroule au niveau de la membrane cytosolique de cette organelle. De la même façon, le variant *SPTLC1* c.71A>G se situe au niveau du domaine transmembranaire de l'enzyme, et n'aura donc à priori pas d'impact sur le choix de substrat préférentiel. Cette hypothèse a été validée pour les deux variants, pour lesquels on retrouve une concentration de dSA totale plasmatique dans les valeurs normales.

A l'inverse, les variants *SPTLC1* c.992C>T et *SPTLC2* c.547C>T, déjà décrits dans la littérature (103,117), se situent au niveau de l'interface entre *SPTLC1* et *SPTLC2*. Si on sait que seules les sous-unités *SPTLC2* ou *SPTLC3* sont responsables de l'activité enzymatique car porteuses du domaine de liaison au PLP, le domaine catalytique est formé de l'association de *SPTLC1* et une de ces deux autres sous-unités. Un variant au niveau de l'interface entre les deux sous-unités *SPTLC1* et *SPTLC2* peut donc avoir un impact sur l'activité de l'enzyme, qu'il concerne *SPTLC1* et *SPTLC2*. Pour les deux variants déjà décrits, ils sont déjà associés à un taux élevé de dSL. Les variants *SPTLC1* c.998A>G et *SPTLC1* c.1015G>A sont très proches du variant *SPTLC1* c.992C>T. On peut donc supposer qu'ils auront également un impact sur le substrat préférentiel de la SPT, hypothèse validée par le taux élevé de dSA totale plasmatique retrouvé chez les patients concernés.

L'étude approfondie de la localisation des autres variants, grâce à de la modélisation et des outils de score, pourrait donc permettre de préjuger sur la pathogénicité de nouveaux variants identifiés. La réalisation d'un test fonctionnel, quand il est possible, reste un argument décisif sur la classification des variants.

Pour un variant cependant, *SPTLC1* c.451C>T, le test fonctionnel n'a pas permis de modifier la classification du variant. En effet, en l'absence du dosage de la dSA totale plasmatique, ce variant est un VUS, avec des arguments plutôt en faveur d'une éventuelle pathogénicité, sans qu'ils soient assez forts pour trancher : localisation au niveau d'un domaine fonctionnel de l'enzyme, absence dans la population normale, nucléotide fortement conservé, importante distance physico-chimique entre les deux acides aminés, score de prédiction en faveur d'une pathogénicité... C'est un variant *de novo*, ce qui n'aide

pas pour la classification. Cependant le dosage de dSA totale plasmatique ressort dans les valeurs normales, apportant un argument en faveur d'un variant bénin. Le variant reste donc théoriquement classifié en tant que VUS, mais les données clinico-biologiques étoffées par les résultats du test fonctionnel font conclure en faveur d'un variant probablement bénin. Dans ce cas précis, une étude plus approfondie avec modélisation des interactions de l'acide aminé en question peut fournir des arguments complémentaires.

La supplémentation par L-sérine est le traitement de choix pour les patients HSAN1 : cet acide aminé agit par compétition de vis-à-vis de la L-alanine et favorise la synthèse de SL physiologiques, au détriment des dSL. Une diminution significative des dSL plasmatiques est donc observée parallèlement à l'amélioration des signes cliniques, et peut servir pour le suivi thérapeutique des patients. (84,119) Il n'est pas possible de faire ce constat chez les patients étudiés puisque pour aucun d'entre eux nous n'avons eu d'informations sur un protocole de supplémentation par L-sérine, ni des prélèvements plasmatiques réguliers pour le suivi de l'efficacité thérapeutique. [CD2] Pour les patients ayant mis en place un auto-traitement, il n'est également pas possible de conclure à une efficacité formelle de la supplémentation, malgré l'amélioration clinique rapportée.

En plus de l'intérêt pour le suivi du traitement, une étude a également mis en évidence une corrélation entre le taux plasmatique de dSL et la sévérité de la pathologie. (137) La clinique du patient HSAN1 était évaluée par le score CMTNS. Dans le cas présent, nous ne disposons pas d'outils d'évaluation objective de la clinique des patients étudiés, il n'est donc pas possible de vérifier cette hypothèse. Il faudrait utiliser des scores standardisés, et s'assurer de la collecte exhaustive d'informations cliniques.

D'autres développements de dosages de dSL dans le service seraient également pertinents : celui des déoxycéramides et déoxy-dihydrocéramides. En effet, ces composés sont majoritairement responsables de la cytotoxicité des dSL. (89,97,106,136) Le travail sur l'importance de l'étape d'hydrolyse acide a également montré que la grande majorité de la dSA totale dosée est issue de l'hydrolyse des déoxy-dihydrocéramides. Le dosage de ces composés est plus compliqué à développer, car nécessite une très grande sensibilité

de la technique. Doser la dSA totale permet de s'affranchir des différentes longueurs de chaîne carbonée des acides gras formant les déoxy-dihydrocéramides, et de ne doser qu'un unique composé, somme de tous ces dérivés. Pour développer le dosage des déoxycéramides et déoxy-dihydrocéramides, outre mettre au point la méthode d'extraction et déterminer les paramétrages de la MS/MS, l'étape de LC devra être suffisamment résolutive pour permettre la séparation de composés dont la chaîne carbonée ne diffère que de quelques carbones. La répartition des différentes longueurs de chaînes et ainsi l'utilisation des différents acides gras dans la synthèse de ces dSL pourrait ainsi être étudiées. Le développement de l'identification et de la quantification des déoxycéramides et déoxy-dihydrocéramides permettrait ainsi de compléter le panel d'exploration des dSL, et du métabolisme des SL de manière plus générale.

Les dSL et les anomalies génétiques de la SPT ont été découverts et tout d'abord étudiés comme des biomarqueurs caractéristiques de HSAN1, une pathologie monogénique autosomique dominante. Cependant, cette étape de la synthèse des SL est associée à des anomalies génétiques dans d'autres pathologies que HSAN1, et l'accumulation de dSL est retrouvée dans des pathologies acquises et multifactorielles comme le diabète de type 2 et le syndrome métabolique. Le développement de nouveaux dosages comme celui de la dSA totale pour caractériser au mieux le métabolisme de la SPT pourra permettre d'approfondir les connaissances sur la physiopathologie de ces maladies, et d'envisager des perspectives thérapeutiques.

L'élévation des dSL dans des déséquilibres métaboliques souligne l'importance de la biodisponibilité en sérine et en alanine dans la synthèse des SL canoniques et des dSL. Un déficit en sérine, ou plus généralement un déséquilibre du ratio entre les deux acides aminés, suffisent à promouvoir la synthèse des dSL. Or une famille de transporteurs protéiques, Serinc 1-5, est responsable du transport transmembranaire de la sérine, et favorise la synthèse des lipides dérivés de cet acide aminé : la phosphatidylsérine et des SL. En plus de permettre l'apport de substrat, ces protéines interagissent directement avec SPT et favorisent son activité et l'utilisation de la L-sérine. Un défaut de fonction de Serinc pourrait donc entraîner un déséquilibre du ratio sérine/alanine, et favoriser la synthèse de dSL, notamment dans les pathologies pour lesquelles aucun variant de

SPTLC1 ou *SPTLC2* n'est retrouvé. (138) Dans HSAN1, certains variants de *SPTLC1* ou *SPTLC2* pourraient affecter les interactions de SPT avec Serinc, et donc perturber la synthèse des SL. Des travaux sont nécessaires pour étudier ces hypothèses et évaluer l'implication potentielle de la famille de protéines Serinc dans la synthèse des dSL.

Les dSL de manière globale sont donc des composés impliqués dans de nombreuses pathologies, et associés à des variants génétiques comme à des déséquilibres métaboliques. Pour HSAN1, leur dosage peut devenir un véritable outil diagnostique, un test fonctionnel efficace pour caractériser les nouveaux variants de *SPTLC1* et *SPTLC2*. Cela pourrait également être un test performant de suivi de l'efficacité thérapeutique du traitement par L-sérine. Pour les autres pathologies, l'étude de ces composés est encore au stade de recherche, et n'a pas encore d'implication médicale et diagnostique ou pronostique. Le développement du dosage de la dSA totale plasmatique par LC-MS/MS a donc une utilité directe dans les contextes de HSAN1, mais vient de manière plus générale compléter le panel d'explorations du métabolisme des SL proposé par les HCL.

CONCLUSIONS GENERALES

Thèse soutenue par Mme Julie Rochat

Les Neuropathies Héréditaires Sensitives et Autonomes de type 1 sont la cause la plus fréquente de neuropathies sensitives héréditaires de transmission autosomique dominante. Elles sont caractérisées par une perte de sensibilité au niveau distal, accompagnée d'éventuels troubles moteurs et autonomes. Ces neuropathies HSANI sont liées à l'existence de variants des gènes codant pour les sous-unités SPTLC1 et SPTLC2 de la Sérine Palmitoyl Transférase, enzyme qui réalise la première étape de la synthèse de novo des sphingolipides. Ces variants entraînent un changement de substrat préférentiel de l'enzyme, aboutissant à une accumulation de déoxysphingolipides neurotoxiques.

Actuellement, le diagnostic de ces neuropathies passe par la confrontation de la clinique aux résultats de l'analyse moléculaire, avec identification de variants hétérozygotes de *SPTLC1* et *SPTLC2*. De nouveaux variants sont mis en évidence, sans que leur caractère délétère soit clairement établi. Leur caractérisation fonctionnelle devient donc fondamentale, et ce travail porte donc sur le développement du dosage de la déoxysphinganine totale plasmatique, comme biomarqueur des Neuropathies Héréditaires Sensitives et Autonomes de type 1.

Le dosage de la déoxysphinganine totale plasmatique est réalisé par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem, après extraction lipidique et double hydrolyse acide puis basique. La méthode de dosage a été optimisée et ses performances analytiques ont été validées.

Les plasmas de cinquante patients contrôles et douze patients avec suspicion de HSANI ont été analysés, et ont permis de valider l'intérêt du dosage de la déoxysphinganine totale plasmatique pour le diagnostic de la maladie, et la caractérisation des nouveaux variants. En effet, dans la majorité des cas, ce test fonctionnel permet de confirmer ou d'infirmer le caractère délétère de variants jusqu'alors classés comme variants « de signification indéterminée ».

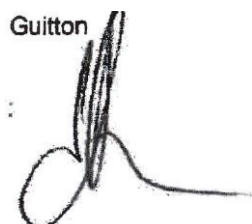
Le dosage de la déoxysphinganine totale plasmatique pourrait également permettre le suivi de l'efficacité des traitements de supplémentation par L-sérine qui permettent de favoriser la voie de synthèse canonique des sphingolipides, et ainsi de limiter l'accumulation des déoxysphingolipides.

Le développement de méthodes d'exploration des déoxysphingolipides, et en particulier de la déoxysphinganine totale ouvre des perspectives techniques avec le

développement du dosage des déoxycéramides, et physiopathologiques car ces espèces de lipides sont également impliqués dans le syndrome métabolique et le diabète de type 2, ou encore la stéatohépatite non-alcoolique.

Le Président de la thèse, Nom : J. Guilton

Signature

Guilton


Vu et permis d'imprimer, Lyon, le 29 JUIL 2022

Vu, le Directeur de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et
Biologiques, Faculté de Pharmacie

Pour le Président de l'Université Claude
Bernard Lyon 1



Professeur C. DUSSART

P/O Le Directeur et par délégation
Le Directeur adjoint
Lars Petter JORDHEIM



Bibliographie

1. A treatise on the chemical constitution of the brain : based throughout upon original researches / by J. L. W. Thudichum. [Internet]. Wellcome Collection. [cité 14 sept 2021]. Disponible sur: <https://wellcomecollection.org/works/zcf2rr7p>
2. Lahiri S, Futerman AH. The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cell Mol Life Sci.* 1 sept 2007;64(17):2270- 84.
3. Quehenberger O, Armando AM, Brown A, Milne S, Myers D, Merrill A, et al. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma¹[S]. *J Lipid Res.* 2010;
4. Proia Richard L. Orchestration of the Sphingolipid Metabolic Network. 2021 janv 11.
5. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. 1997;387:4.
6. Fyrst H, Saba JD. An update on sphingosine-1-phosphate and other sphingolipid mediators. *Nat Chem Biol.* juill 2010;6(7):489- 97.
7. Hanada K. Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids.* 10 juin 2003;1632(1):16- 30.
8. Weiss B. The Biosynthesis of Sphingosine: I. A STUDY OF THE REACTION WITH TRITIUM-LABELED SERINE. *J Biol Chem.* 1 juin 1963;238(6):1953- 9.
9. Brady RO, Koval GJ. The Enzymatic Synthesis of Sphingosine. *J Biol Chem.* 1 juill 1958;233(1):26- 31.
10. Pewzner-Jung Y, Park H, Laviad EL, Silva LC, Lahiri S, Stiban J, et al. A critical role for ceramide synthase 2 in liver homeostasis: I. alterations in lipid metabolic pathways. *J Biol Chem.* 2 avr 2010;285(14):10902- 10.
11. Fabrias G, Muñoz-Olaya J, Cingolani F, Signorelli P, Casas J, Gagliostro V, et al. Dihydroceramide desaturase and dihydrosphingolipids: Debutant players in the sphingolipid arena. *Prog Lipid Res.* 1 avr 2012;51(2):82- 94.
12. Hannun YA, Obeid LM. Many ceramides. *J Biol Chem.* 12 août 2011;286(32):27855- 62.
13. Ernst D. Regulation of deoxy-sphingolipids and their role in disease [Thèse de doctorat]. Ernst, Daniela. Regulation of deoxy-sphingolipids and their role in disease. 2013, University of Zurich, Faculty of Science.
14. Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, Hannun YA. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell Signal.* juin 2008;20(6):1010- 8.
15. Fyrst H, Saba JD. Sphingosine-1-phosphate lyase in development and disease: sphingolipid metabolism takes flight. *Biochim Biophys Acta.* sept 2008;1781(9):448- 58.
16. Kolter T, Sandhoff K. Sphingolipid metabolism diseases. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 1758(12):2057- 79.
17. Futerman AH. Les maladies lysosomales : mécanismes pathologiques et options thérapeutiques. *médecine/sciences.* 1 déc 2005;21:16- 9.
18. Desnick RJ. Enzyme replacement and enhancement therapies for lysosomal diseases. *J Inherit Metab Dis.* 2004;27(3):385- 410.
19. Vanier MT, Caillaud C. Disorders of Sphingolipid Metabolism and Neuronal Ceroid-Lipofuscinoses. In: Georges, éditeur. *Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2012 [cité 22 juill 2022]. p. 555- 77. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-3-642-15720-2_39
20. Levade T. MALADIES LYSOSOMALES - Bases physiopathologiques et diagnostic moléculaire. 2022 mars 16.

21. Simpson MA, Cross H, Proukakis C, Priestman DA, Neville DCA, Reinkensmeier G, et al. Infantile-onset symptomatic epilepsy syndrome caused by a homozygous loss-of-function mutation of GM3 synthase. *Nat Genet.* nov 2004;36(11):1225- 9.
22. GAUCHER PCE. De l'épithélioma primitif de la rate. Hypertrophie idiopathique de la rate sans leucémie [Internet]. 1882 [cité 13 févr 2022]. 41 p. Disponible sur: http://archive.org/details/BIUSante_TPAR1882x031
23. Brady RO, Kanfer JN, Shapiro D. Metabolism of glucocerebrosides II. Evidence of an enzymatic deficiency in Gaucher's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 18 janv 1965;18(2):221- 5.
24. Trinchera M, Parini R, Indelicato R, Domenighini R, dall'Olio F. Diseases of ganglioside biosynthesis: An expanding group of congenital disorders of glycosylation. *Mol Genet Metab.* 1 août 2018;124(4):230- 7.
25. Penno A, Reilly MM, Houlden H, Laurá M, Rentsch K, Niederkofler V, et al. Hereditary Sensory Neuropathy Type 1 Is Caused by the Accumulation of Two Neurotoxic Sphingolipids. *J Biol Chem.* 9 avr 2010;285(15):11178- 87.
26. Houlden H, King R, Blake J, Groves M, Love S, Woodward C, et al. Clinical, pathological and genetic characterization of hereditary sensory and autonomic neuropathy type 1 (HSAN I). *Brain.* 1 févr 2006;129(2):411- 25.
27. Dolgin V, Straussberg R, Xu R, Mileva I, Yogev Y, Khoury R, et al. DEGS1 variant causes neurological disorder. *Eur J Hum Genet.* nov 2019;27(11):1668- 76.
28. Pant DC, Dorboz I, Schluter A, Fourcade S, Launay N, Joya J, et al. Loss of the sphingolipid desaturase DEGS1 causes hypomyelinating leukodystrophy. *J Clin Invest.* 1 mars 2019;129(3):1240- 56.
29. Choi YJ, Saba JD. Sphingosine phosphate lyase insufficiency syndrome (SPLIS): A novel inborn error of sphingolipid metabolism. *Adv Biol Regul.* janv 2019;71:128- 40.
30. Bowser LE, Young M, Wenger OK, Ammous Z, Brigatti KW, Carson VJ, et al. Recessive GM3 synthase deficiency: Natural history, biochemistry, and therapeutic frontier. *Mol Genet Metab.* 1 avr 2019;126(4):475- 88.
31. Wang H, Wang A, Wang D, Bright A, Sency V, Zhou A, et al. Early growth and development impairments in patients with ganglioside GM3 synthase deficiency. *Clin Genet.* 2016;89(5):625- 9.
32. Boukhris A, Schule R, Loureiro JL, Lourenço CM, Mundwiler E, Gonzalez MA, et al. Alteration of Ganglioside Biosynthesis Responsible for Complex Hereditary Spastic Paraplegia. *Am J Hum Genet.* 11 juill 2013;93(1):118-23.
33. Hojjati MR, Li Z, Jiang XC. Serine palmitoyl-CoA transferase (SPT) deficiency and sphingolipid levels in mice. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids.* 15 oct 2005;1737(1):44-51.
34. Adachi-Yamada T, Gotoh T, Sugimura I, Tateno M, Nishida Y, Onuki T, et al. De Novo Synthesis of Sphingolipids Is Required for Cell Survival by Down-Regulating c-Jun N-Terminal Kinase in *Drosophila* Imaginal Discs. *Mol Cell Biol.* oct 1999;19(10):7276-86.
35. Eliot AC, Kirsch JF. Pyridoxal Phosphate Enzymes: Mechanistic, Structural, and Evolutionary Considerations. *Annu Rev Biochem.* 2004;73(1):383-415.
36. Buede R, Rinker-Schaffer C, Pinto WJ, Lester RL, Dickson RC. Cloning and characterization of LCB1, a *Saccharomyces* gene required for biosynthesis of the long-chain base component of sphingolipids. *J Bacteriol.* juill 1991;173(14):4325-32.
37. Weiss B, Stoffel W. Human and murine serine-palmitoyl-CoA transferase--cloning, expression and characterization of the key enzyme in sphingolipid synthesis. *Eur J Biochem.* 1 oct 1997;249(1):239-47.
38. Weiss B, Stoffel W. Human and Murine Serine-Palmitoyl-CoA Transferase. *Eur J Biochem.* 1997;249(1):239-47.

39. Hornemann T, Richard S, Rütli MF, Wei Y, Eckardstein A von. Cloning and Initial Characterization of a New Subunit for Mammalian Serine-palmitoyltransferase *. *J Biol Chem.* 8 déc 2006;281(49):37275-81.
40. Lone MA, Bourquin F, Hornemann T. Serine Palmitoyltransferase Subunit 3 and Metabolic Diseases. In: Jiang XC, éditeur. *Sphingolipid Metabolism and Metabolic Disease* [Internet]. Singapore: Springer Nature; 2022 [cité 12 juill 2022]. p. 47-56. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-981-19-0394-6_4
41. Mandon EC, Ehses I, Rother J, van Echten G, Sandhoff K. Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydrosphinganine reductase, and sphinganine N-acyltransferase in mouse liver. *J Biol Chem.* 5 juin 1992;267(16):11144-8.
42. Nicholson GA, Dawkins JL, Blair IP, Kennerson ML, Gordon MJ, Cherryson AK, et al. The gene for hereditary sensory neuropathy type I (HSN-I) maps to chromosome 9q22.1–q22.3. *Nat Genet.* mai 1996;13(1):101-4.
43. Bejaoui K, Wu C, Scheffler MD, Haan G, Ashby P, Wu L, et al. SPTLC1 is mutated in hereditary sensory neuropathy, type 1. *Nat Genet.* mars 2001;27(3):261-2.
44. Wei J. Study of Serine Palmitoyltransferase and de Novo Synthesis of Sphingolipids. Umi Dissertation Publishing; 2011.
45. Hornemann T, Wei Y, von Eckardstein A. Is the mammalian serine palmitoyltransferase a high-molecular-mass complex? *Biochem J.* 1 juill 2007;405(Pt 1):157-64.
46. Han G, Gupta SD, Gable K, Niranjankumari S, Moitra P, Eichler F, et al. Identification of small subunits of mammalian serine palmitoyltransferase that confer distinct acyl-CoA substrate specificities. *Proc Natl Acad Sci.* 19 mai 2009;106(20):8186-91.
47. Gable K, Slife H, Bacikova D, Monaghan E, Dunn TM. Tsc3p Is an 80-Amino Acid Protein Associated with Serine Palmitoyltransferase and Required for Optimal Enzyme Activity*. *J Biol Chem.* 17 mars 2000;275(11):7597-603.
48. Gable K, Gupta S, Han G, Niranjankumari S, Harmon J, Dunn T. A Disease-causing Mutation in the Active Site of Serine Palmitoyltransferase Causes Catalytic Promiscuity. *J Biol Chem.* 23 juill 2010;285:22846-52.
49. Hornemann T, Penno A, Rütli MF, Ernst D, Kivrak-Pfiffner F, Rohrer L, et al. The SPTLC3 subunit of serine palmitoyltransferase generates short chain sphingoid bases. *J Biol Chem.* 2009;284(39):26322-30.
50. Breslow DK, Collins SR, Bodenmiller B, Aebersold R, Simons K, Shevchenko A, et al. Orm family proteins mediate sphingolipid homeostasis. *Nature.* 25 févr 2010;463(7284):1048-53.
51. Siow DL, Wattenberg BW. Mammalian ORMDL Proteins Mediate the Feedback Response in Ceramide Biosynthesis. *J Biol Chem.* 23 nov 2012;287(48):40198-204.
52. Hjelmqvist L, Tuson M, Marfany G, Herrero E, Balcells S, González-Duarte R. ORMDL proteins are a conserved new family of endoplasmic reticulum membrane proteins. *Genome Biol.* 2002;3(6):research0027.1-research0027.16.
53. Roelants FM, Breslow DK, Muir A, Weissman JS, Thorner J. Protein kinase Ypk1 phosphorylates regulatory proteins Orm1 and Orm2 to control sphingolipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci.* 29 nov 2011;108(48):19222-7.
54. Li S, Xie T, Liu P, Wang L, Gong X. Structural insights into the assembly and substrate selectivity of human SPT–ORMDL3 complex. *Nat Struct Mol Biol.* mars 2021;28(3):249-57.
55. Hornemann Th. Mini review: Lipids in Peripheral Nerve Disorders. *Neurosci Lett.* 1 janv 2021;740:135455.
56. Reilly MM. Sorting out the inherited neuropathies. *Pract Neurol.* avr 2007;7(2):93-105.
57. Houlden H, Blake J, Reilly MM. Hereditary sensory neuropathies. *Curr Opin Neurol.* oct 2004;17(5):569-77.

58. Suh BC, Hong YB, Nakhro K, Nam SH, Chung KW, Choi BO. Early-onset severe hereditary sensory and autonomic neuropathy type 1 with S331F SPTLC1 mutation. *Mol Med Rep.* 1 févr 2014;9(2):481-6.
59. Rossi F, Bruno G, Fratta M, Colavito D, Casertano S, Sampaolo S, et al. Expanding the spectrum of SPTLC1-related disorders beyond hereditary sensory and autonomic neuropathies: A novel case of the distinct « S331 syndrome ». *J Peripher Nerv Syst JPNS.* sept 2020;25(3):308-11.
60. Dyck PJ, Ohta M. Neuronal atrophy and degeneration predominantly affecting peripheral sensory neurons. *Peripher Neuropathy.* 1975;791-824.
61. Dyck PJ. Hereditary motor and sensory neuropathies. *Peripher Neuropathy.* 1993;1094-136.
62. Nombre de cas par maladie rare dans la BNDMR [Internet]. Banque Nationale de Données Maladies Rares; 2022 mars [cité 13 août 2022]. Disponible sur: <https://www.bndmr.fr/publications/nombre-de-cas-par-mr/>
63. Hicks EP. HEREDITARY PERFORATING ULCER OF THE FOOT. *The Lancet.* 18 févr 1922;199(5138):319-21.
64. Auer-Grumbach M. Chapter 50 - Hereditary sensory and autonomic neuropathies. In: Said G, Krarup C, éditeurs. *Handbook of Clinical Neurology* [Internet]. Elsevier; 2013 [cité 13 févr 2022]. p. 893-906. (Peripheral Nerve Disorders; vol. 115). Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444529022000503>
65. Rothier A, Baets J, Timmerman V, Janssens K. Mechanisms of disease in hereditary sensory and autonomic neuropathies. *Nat Rev Neurol.* 24 janv 2012;8(2):73-85.
66. Auer-Grumbach M. Hereditary sensory neuropathy type I. *Orphanet J Rare Dis.* 18 mars 2008;3(1):7.
67. Rossor AM, Evans MRB, Reilly MM. A practical approach to the genetic neuropathies. *Pract Neurol.* juin 2015;15(3):187-98.
68. Dawkins JL, Hulme DJ, Brahmabhatt SB, Auer-Grumbach M, Nicholson GA. Mutations in SPTLC1, encoding serine palmitoyltransferase, long chain base subunit-1, cause hereditary sensory neuropathy type I. *Nat Genet.* mars 2001;27(3):309-12.
69. Rothier A, Auer-Grumbach M, Janssens K, Baets J, Penno A, Almeida-Souza L, et al. Mutations in the SPTLC2 Subunit of Serine Palmitoyltransferase Cause Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathy Type I. *Am J Hum Genet.* 8 oct 2010;87(4):513-22.
70. Guelly C, Zhu PP, Leonardis L, Papić L, Zidar J, Schabhüttl M, et al. Targeted High-Throughput Sequencing Identifies Mutations in atlastin-1 as a Cause of Hereditary Sensory Neuropathy Type I. *Am J Hum Genet.* 7 janv 2011;88(1):99-105.
71. Klein CJ, Botuyan MV, Wu Y, Ward CJ, Nicholson GA, Hammans S, et al. Mutations in DNMT1 cause hereditary sensory neuropathy with dementia and hearing loss. *Nat Genet.* juin 2011;43(6):595-600.
72. Kornak U, Mademan I, Schinke M, Voigt M, Krawitz P, Hecht J, et al. Sensory neuropathy with bone destruction due to a mutation in the membrane-shaping atlastin GTPase 3. *Brain J Neurol.* mars 2014;137(Pt 3):683-92.
73. Verhoeven K, De Jonghe P, Coen K, Verpoorten N, Auer-Grumbach M, Kwon JM, et al. Mutations in the Small GTP-ase Late Endosomal Protein RAB7 Cause Charcot-Marie-Tooth Type 2B Neuropathy. *Am J Hum Genet.* mars 2003;72(3):722-7.
74. Reilly MM, Murphy SM, Laurá M. Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst.* 2011;16(1):1-14.
75. Vance JM, Speer MC, Stajich JM, West S, Wolpert C, Gaskell P, et al. Misclassification and linkage of hereditary sensory and autonomic neuropathy type 1 as Charcot-Marie-Tooth disease, type 2B. *Am J Hum Genet.* juill 1996;59(1):258-62.
76. Tyynismaa H. A Metabolic Vulnerability of Vision. *N Engl J Med.* 10 oct 2019;381(15):1474-6.

77. Kok C, Kennerson ML, Spring PJ, Ing AJ, Pollard JD, Nicholson GA. A Locus for Hereditary Sensory Neuropathy with Cough and Gastroesophageal Reflux on Chromosome 3p22-p24. *Am J Hum Genet.* 1 sept 2003;73(3):632-7.
78. Spring PJ, Kok C, Nicholson GA, Ing AJ, Spies JM, Bassett ML, et al. Autosomal dominant hereditary sensory neuropathy with chronic cough and gastro-oesophageal reflux: clinical features in two families linked to chromosome 3p22-p24. *Brain J Neurol.* déc 2005;128(Pt 12):2797-810.
79. Triplett J, Nicholson G, Sue C, Hornemann T, Yiannikas C. Hereditary sensory and autonomic neuropathy type IC accompanied by upper motor neuron abnormalities and type II juxtafoveal retinal telangiectasias. *J Peripher Nerv Syst JPNS.* juin 2019;24(2):224-9.
80. Bejaoui K, Uchida Y, Yasuda S, Ho M, Nishijima M, Brown RH, et al. Hereditary sensory neuropathy type 1 mutations confer dominant negative effects on serine palmitoyltransferase, critical for sphingolipid synthesis. *J Clin Invest.* 1 nov 2002;110(9):1301-8.
81. Eichler FS, Hornemann T, McCampbell A, Kuljis D, Penno A, Vardeh D, et al. Overexpression of the Wild-Type SPT1 Subunit Lowers Desoxysphingolipid Levels and Rescues the Phenotype of HSAN1. *J Neurosci.* 18 nov 2009;29(46):14646-51.
82. Dedov VN, Dedova IV, Merrill AH, Nicholson GA. Activity of partially inhibited serine palmitoyltransferase is sufficient for normal sphingolipid metabolism and viability of HSN1 patient cells. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* 2 mars 2004;1688(2):168-75.
83. Murphy SM, Ernst D, Wei Y, Laurà M, Liu YT, Polke J, et al. Hereditary sensory and autonomic neuropathy type 1 (HSANI) caused by a novel mutation in SPTLC2. *Neurology.* 4 juin 2013;80(23):2106-11.
84. Garofalo K, Penno A, Schmidt BP, Lee HJ, Frosch MP, von Eckardstein A, et al. Oral l-serine supplementation reduces production of neurotoxic deoxysphingolipids in mice and humans with hereditary sensory autonomic neuropathy type 1. *J Clin Invest.* 1 déc 2011;121(12):4735-45.
85. Esaki K, Sayano T, Sonoda C, Akagi T, Suzuki T, Ogawa T, et al. l-Serine Deficiency Elicits Intracellular Accumulation of Cytotoxic Deoxysphingolipids and Lipid Body Formation. *J Biol Chem.* 5 juin 2015;290(23):14595-609.
86. Alecu I, Tedeschi A, Behler N, Wunderling K, Lamberz C, Lauterbach MAR, et al. Localization of 1-deoxysphingolipids to mitochondria induces mitochondrial dysfunction. *J Lipid Res.* janv 2017;58(1):42-59.
87. Othman A, Bianchi R, Alecu I, Wei Y, Porretta-Serapiglia C, Lombardi R, et al. Lowering Plasma 1-Deoxysphingolipids Improves Neuropathy in Diabetic Rats. *Diabetes.* 1 mars 2015;64(3):1035-45.
88. Becker KA, Uerschels AK, Goins L, Doolen S, McQuerry KJ, Bielawski J, et al. Role of 1-Deoxysphingolipids in docetaxel neurotoxicity. *J Neurochem.* sept 2020;154(6):662-72.
89. Kramer R, Bielawski J, Kistner-Griffin E, Othman A, Alecu I, Ernst D, et al. Neurotoxic 1-deoxysphingolipids and paclitaxel-induced peripheral neuropathy. *FASEB J.* nov 2015;29(11):4461-72.
90. Baird RD, Kitzen J, Clarke PA, Planting A, Reade S, Reid A, et al. Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacogenomic trial of ES-285, a novel marine cytotoxic agent, administered to adult patients with advanced solid tumors. *Mol Cancer Ther.* 1 juin 2009;8(6):1430-7.
91. Vilar E, Grünwald V, Schöffski P, Singer H, Salazar R, Iglesias JL, et al. A phase I dose-escalating study of ES-285, a marine sphingolipid-derived compound, with repeat dose administration in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs.* 1 févr 2012;30(1):299-305.
92. Cuadros R, Montejó de Garcini E, Wandosell F, Faircloth G, Fernández-Sousa JM, Avila J. The marine compound spisulosine, an inhibitor of cell proliferation, promotes the disassembly of actin stress fibers. *Cancer Lett.* 28 avr 2000;152(1):23-9.
93. Carreira AC, Santos TC, Lone MA, Zupančič E, Lloyd-Evans E, de Almeida RFM, et al. Mammalian sphingoid bases: Biophysical, physiological and pathological properties. *Prog Lipid Res.* 1 juill 2019;75:100988.

94. Jiménez-Rojo N, Sot J, Busto JV, Shaw WA, Duan J, Merrill AH, et al. Biophysical Properties of Novel 1-Deoxy-(Dihydro)ceramides Occurring in Mammalian Cells. *Biophys J*. 16 déc 2014;107(12):2850-9.
95. Clark AJ, Kugathasan U, Baskozos G, Priestman DA, Fugger N, Lone MA, et al. An iPSC model of hereditary sensory neuropathy-1 reveals L-serine-responsive deficits in neuronal ganglioside composition and axoglial interactions. *Cell Rep Med*. 21 juill 2021;2(7):100345.
96. Saba S, Chen Y, Maddipati KR, Hackett M, Hu B, Li J. Demyelination in hereditary sensory neuropathy type-1C. *Ann Clin Transl Neurol*. 30 juill 2020;7(9):1502-12.
97. Zuellig RA, Hornemann T, Othman A, Hehl AB, Bode H, Güntert T, et al. Deoxysphingolipids, Novel Biomarkers for Type 2 Diabetes, Are Cytotoxic for Insulin-Producing Cells. *Diabetes*. 1 avr 2014;63(4):1326-39.
98. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. mai 2015;17(5):405-23.
99. Verhoeven K, Coen K, Vriendt ED, Jacobs A, Gerwen VV, Smouts I, et al. SPTLC1 mutation in twin sisters with hereditary sensory neuropathy type I. *Neurology*. 23 mars 2004;62(6):1001-2.
100. Hornemann T, Penno A, Richard S, Nicholson G, van Dijk FS, Rotthier A, et al. A systematic comparison of all mutations in hereditary sensory neuropathy type I (HSAN I) reveals that the G387A mutation is not disease associated. *neurogenetics*. 9 janv 2009;10(2):135.
101. Davidson GL, Murphy SM, Polke JM, Laura M, Salih MAM, Muntoni F, et al. Frequency of mutations in the genes associated with hereditary sensory and autonomic neuropathy in a UK cohort. *J Neurol*. août 2012;259(8):1673-85.
102. Bode H, Bourquin F, Suriyanarayanan S, Wei Y, Alecu I, Othman A, et al. HSAN1 mutations in serine palmitoyltransferase reveal a close structure-function-phenotype relationship. *Hum Mol Genet*. 2016;25(5):853-65.
103. Rotthier A, Penno A, Rautenstrauss B, Auer-Grumbach M, Stettner G, Asselbergh B, et al. Characterization of Two Mutations in the SPTLC1 Subunit of Serine Palmitoyltransferase Associated with Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathy Type I. *Hum Mutat*. 1 juin 2011;32:E2211-25.
104. Ernst D, Murphy SM, Sathiyandan K, Wei Y, Othman A, Laurá M, et al. Novel HSAN1 Mutation in Serine Palmitoyltransferase Resides at a Putative Phosphorylation Site That Is Involved in Regulating Substrate Specificity. *Neuromolecular Med*. 2015;17(1):47-57.
105. Bode H. Serine Palmitoyltransferase and Peripheral Neuropathy - Studies on Neuropathy-causing Mutations and their Biochemical Hallmarks [Thèse de doctorat]. [Zurich, Allemagne]: Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Zürich; 2016.
106. Gantner ML, Eade K, Wallace M, Handzlik MK, Fallon R, Trombley J, et al. Serine and Lipid Metabolism in Macular Disease and Peripheral Neuropathy. *N Engl J Med*. 10 oct 2019;381(15):1422-33.
107. Geraldés R, de Carvalho M, Santos-Bento M, Nicholson G. Hereditary sensory neuropathy type 1 in a Portuguese family—electrodiagnostic and autonomic nervous system studies. *J Neurol Sci*. 15 déc 2004;227(1):35-8.
108. Klein CJ, Wu Y, Kruckeberg KE, Hebring SJ, Anderson SA, Cunningham JM, et al. SPTLC1 and RAB7 mutation analysis in dominantly inherited and idiopathic sensory neuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. juill 2005;76(7):1022-4.
109. Bi H, Gao Y, Yao S, Dong M, Headley AP, Yuan Y. Hereditary sensory and autonomic neuropathy type I in a Chinese family: British C133W mutation exists in the Chinese. *Neuropathol Off J Jpn Soc Neuropathol*. oct 2007;27(5):429-33.
110. Boso F, Armirotti A, Taioli F, Ferrarini M, Nobbio L, Cavallaro T, et al. Deoxysphingolipids as candidate biomarkers for a novel SPTLC1 mutation associated with HSAN-I. *Neurol Genet*. 1 déc 2019;5(6):e365.

111. Rautenstrauss B, Neitzel B, Muench C, Haas J, Holinski-Feder E, Abicht A. Late onset hereditary sensory neuropathy type 1 (HSN1) caused by a novel p.C133R missense mutation in SPTLC1. *J Peripher Nerv Syst.* 2009;14:124-5.
112. Ho KWD, Jerath NU. V144D Mutation of SPTLC1 Can Present with Both Painful and Painless Phenotypes in Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathies Type I. *Case Rep Genet.* 18 oct 2018;2018:1898151.
113. Rotthier A, Baets J, Vriendt ED, Jacobs A, Auer-Grumbach M, Lévy N, et al. Genes for hereditary sensory and autonomic neuropathies: A genotype-phenotype correlation. *Brain.* 2009;132(10):2699-711.
114. Auer-Grumbach M, Bode H, Pieber TR, Schabhüttl M, Fischer D, Seidl R, et al. Mutations at Ser331 in the HSN type I gene SPTLC1 are associated with a distinct syndromic phenotype. *Eur J Med Genet.* 1 mai 2013;56(5):266-9.
115. Suriyanarayanan S, Othman A, Dräger B, Schirmacher A, Young P, Mulahasanovic L, et al. A Novel Variant (Asn177Asp) in SPTLC2 Causing Hereditary Sensory Autonomic Neuropathy Type 1C. *Neuromolecular Med.* juin 2019;21(2):182-91.
116. Cintra VP, Dohrn MF, Tomaselli PJ, Figueiredo FB, Marques SE, Camargos ST, et al. Rare mutations in ATL3, SPTLC2 and SCN9A explaining hereditary sensory neuropathy and congenital insensitivity to pain in a Brazilian cohort. *J Neurol Sci.* 15 août 2021;427:117498.
117. Suriyanarayanan S, Auranen M, Toppila J, Paetau A, Shcherbii M, Palin E, et al. The Variant p.(Arg183Trp) in SPTLC2 Causes Late-Onset Hereditary Sensory Neuropathy. *NeuroMolecular Med.* 1 mars 2016;18(1):81-90.
118. Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathy (HSAN1) [Internet]. *Neuropathy Commons*; [cité 22 juill 2022]. Disponible sur: <https://neuropathycommons.org/genetics/hereditary-sensory-autonomic-neuropathy-hsan1#HSAN1slideshow>
119. Fridman V, Suriyanarayanan S, Novak P, David W, Macklin EA, McKenna-Yasek D, et al. Randomized trial of l-serine in patients with hereditary sensory and autonomic neuropathy type 1. *Neurology.* 22 janv 2019;92(4):e359-70.
120. Auranen M, Toppila J, Suriyanarayanan S, Lone MA, Paetau A, Tynnismaa H, et al. Clinical and metabolic consequences of L-serine supplementation in hereditary sensory and autonomic neuropathy type 1C. *Cold Spring Harb Mol Case Stud.* nov 2017;3(6):a002212.
121. Gomes Rodrigues F, Pipis M, Heeren TFC, Fruttiger M, Gantner M, Vermeirsch S, et al. Description of a patient cohort with Hereditary Sensory Neuropathy Type 1 without retinal disease Macular Telangiectasia type 2 – implications for retinal screening in HSN1. *J Peripher Nerv Syst* [Internet]. [cité 28 juill 2022];n/a(n/a). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jns.12508>
122. Bonelli R, Ansell BRE, Lotta L, Scerri T, Clemons TE, Leung I, et al. Genetic disruption of serine biosynthesis is a key driver of macular telangiectasia type 2 aetiology and progression. *Genome Med.* 9 mars 2021;13(1):39.
123. Eade K, Gantner ML, Hostyk JA, Nagasaki T, Giles S, Fallon R, et al. Serine biosynthesis defect due to haploinsufficiency of PHGDH causes retinal disease. *Nat Metab.* mars 2021;3(3):366-77.
124. Mohassel P, Donkervoort S, Lone MA, Nalls M, Gable K, Gupta SD, et al. Childhood amyotrophic lateral sclerosis caused by excess sphingolipid synthesis. *Nat Med.* juill 2021;27(7):1197-204.
125. Johnson JO, Chia R, Miller DE, Li R, Kumaran R, Abramzon Y, et al. Association of Variants in the SPTLC1 Gene With Juvenile Amyotrophic Lateral Sclerosis. *JAMA Neurol.* oct 2021;78(10):1-13.
126. Kölbl H, Kraft F, Hentschel A, Czech A, Gangfuss A, Mohassel P, et al. New Insights into the Neuromyogenic Spectrum of a Gain of Function Mutation in SPTLC1. *Genes.* 17 mai 2022;13(5):893.
127. Mwinyi J, Boström A, Fehrer I, Othman A, Waeber G, Marti-Soler H, et al. Plasma 1-deoxysphingolipids are early predictors of incident type 2 diabetes mellitus. *PLOS ONE.* 4 mai 2017;12(5):e0175776.

128. Othman A, Saely CH, Muendlein A, Vonbank A, Drexel H, von Eckardstein A, et al. Plasma 1-deoxysphingolipids are predictive biomarkers for type 2 diabetes mellitus. *BMJ Open Diabetes Res Care* [Internet]. 19 mars 2015 [cité 9 mars 2021];3(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4368929/>
129. Othman A, Rütli MF, Ernst D, Saely CH, Rein P, Drexel H, et al. Plasma deoxysphingolipids: a novel class of biomarkers for the metabolic syndrome? *Diabetologia*. 1 févr 2012;55(2):421-31.
130. Berteaux M, Rütli MF, Othman A, Marti-Jaun J, Hersberger M, von Eckardstein A, et al. Deoxysphingoid bases as plasma markers in Diabetes mellitus. *Lipids Health Dis*. 16 août 2010;9:84.
131. Dohrn MF, Winter N, Dafotakis M. Ursachen, Spektrum und Therapie der diabetischen Neuropathie. *Nervenarzt*. août 2020;91(8):714-21.
132. Gordon DL, Myers DS, Ivanova PT, Fahy E, Maurya MR, Gupta S, et al. Biomarkers of NAFLD progression: a lipidomics approach to an epidemic. *J Lipid Res*. mars 2015;56(3):722-36.
133. Weyler J, Verrijken A, Hornemann T, Vonghia L, Dirinck E, von Eckardstein A, et al. Association of 1-deoxy-sphingolipids with steatosis but not steatohepatitis nor fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Acta Diabetol*. 1 mars 2021;58(3):319-27.
134. Cheillan D. Application de la spectrométrie de masse en tandem au dépistage néonatal [Mémoire de Diplôme Universitaire des Maladies Héritaires du Métabolisme]. 2002.
135. COFRAC - Comité français d'accréditation. GUIDE TECHNIQUE D'ACCREDITATION DE VERIFICATION (PORTEE A) / VALIDATION (PORTEE B) DES METHODES EN BIOLOGIE MEDICALE - Document SH GTA 04. 2015.
136. Güntert T, Hänggi P, Othman A, Suriyanarayanan S, Sonda S, Zuellig RA, et al. 1-Deoxysphingolipid-induced neurotoxicity involves N-methyl-d-aspartate receptor signaling. *Neuropharmacology*. 1 nov 2016;110:211-22.
137. Matilde L, Eichler F, Hornemann T, Murphy S, Polke J, Bull K, et al. 1042 Hereditary sensory and autonomic neuropathy type 1: correlation of severity and plasma atypical deoxy-sphingoid bases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 9 févr 2012;83:e1-e1.
138. Inuzuka M, Hayakawa M, Ingi T. Serinc, an Activity-regulated Protein Family, Incorporates Serine into Membrane Lipid Synthesis *. *J Biol Chem*. 21 oct 2005;280(42):35776-83.

Annexe 1 : Formulaire de recueil des données cliniques



GROUPEMENT HOSPITALIER EST
Centre de Biologie et de Pathologie Est
59, boulevard Pinel
69677 Bron Cedex - France

ETUDE DEOXYSA

Julie Rochat, interne en biologie médicale : julie.rochat@chu-lyon.fr

Dr David Cheillan : david.cheillan@chu-lyon.fr

Formulaire de recueil des données cliniques de patients suspect de HSAN1

Dans le cadre du travail de thèse d'exercice en Pharmacie de Julie Rochat, il a été développé le dosage de la deoxysphinganine totale par LC-MS/MS. Ce biomarqueur est pertinent dans la caractérisation fonctionnelle des variants identifiés dans les gènes *SPTLC1* et *SPTLC2* responsables de HSAN1. L'objectif de ce formulaire est de colliger la clinique des patients suspects ou atteints afin de les décrire de façon homogène.

NOM : PRENOM :

Date de naissance : SEXE : Homme Femme

Âge d'apparition des symptômes :

Autre membre de la famille atteint : Oui Non

Si oui, lien de parenté :

ATTEINTE NEUROLOGIQUE

- **Troubles sensitifs** : Membres inférieurs Membres supérieurs
 - Perte de sensibilité distale : à la douleur à la température
 - Episodes de douleur lancinante
 - Paresthésies
- **Troubles moteurs** : Membres inférieurs Membres supérieurs
 - Atteinte motrice Atrophie musculaire
- **Biopsie nerveuse** : réalisée non réalisée

Si réalisée, conclusions :

AUTRES ATTEINTES

- Ulcères chroniques Amputation Ostéomyélite
- Reflux gastro intestinal Constipation Atteinte oculaire
- Anhydrose Arythmie
- Autre :

TRAITEMENT :

Traitement par sérine ? : Oui Non

Si oui, quelle amélioration des signes cliniques ? :

DIAGNOSTIC MOLECULAIRE : Oui Non

Si oui, gène et variant identifié :

Annexe 2 : Protocole de dosage de la déoxysphinganine totale plasmatique par LC-MS/MS

Réactifs

- Méthanol CH₃OH
- Ammoniaque 2N
 - NH₄OH 30% (16N) 12.5 mL
 - Eau distillée qsp 100 mL
- Chloroforme CHCl₃
- Eau alcaline
 - 500 mL d'eau distillée
 - + 1mL d'Ammoniaque NH₄OH 30%
- Méthanol – HCl
 - HCl 37% : 5.04 mL
 - Eau distillée : 5.36 mL
 - Méthanol qsp 50 mL
- KOH 5M
 - 28g de KOH en pastilles
 - Eau distillée qsp 100 mL
- Méthanol – KOH 0.125M
 - 0.7g de KOH en pastilles
 - Méthanol qsp 100 mL

Solution de standard interne de D3 – dSA

Solution primaire : solution méthanolique de D3-dSA à 34.66 µM

Solution secondaire 1/10

Solution de SI : 10µL de solution secondaire qsp 5mL de méthanol

Protocole

Extraction lipidique

Dans des tubes de 2.5 mL

- 500 µL de solution de SI
- 100 µL de plasma
- 100 µL d'ammoniaque 2N

Agiter au vortex – 10 secondes par tube

Agitation 1h dans une cuve à 37°C

Ajouter dans chaque tube

- 500 µL de chloroforme
- 200 µL d'eau alcaline

Agiter par retournements 5 min

Centrifugation 15min à 14 000 t/min

On obtient un tube avec une phase inférieure chloroformique contenant les composés à doser, une phase supérieure méthanolique, et une interphase protéique.

Dans un Eppendorf de XX mL

- Récupérer la phase inférieure chloroformique
- 1 mL d'eau alcaline

Agiter par retournements 5 min

Centrifugation 15min à 14 000 t/min (vitesse maximale)

Éliminer la phase supérieure aqueuse

Répéter ce cycle de lavage de la phase chloroformique trois fois pour éliminer la phase protéique.

Sécher la phase chloroformique sous azote, dans des vials en verre de 8mL (20-30 min).

Les culots sont congelables à -20°C.

Hydrolyse acide

Reprendre les culots avec 200µL de méthanol – HCl

Mettre à incuber une nuit (12-15h) à 65°C

Neutraliser avec KOH 5M (≈ 70µL)

Hydrolyse basique

Préparer extemporanément une solution de méthanol – KOH / chloroforme (4 :1 v/v)

Dans les vials, ajouter dans cet ordre

- 0.5 mL de solution de méthanol – KOH / chloroforme
- 0.5 mL de chloroforme
- 0.5 mL d'eau alcaline
- 0.1 mL d'ammoniaque 2N

Agiter par retournements 5 min

Centrifugation 10min à 4700 t/min (vitesse maximale)

Éliminer la phase supérieure aqueuse

Réaliser deux cycles de lavage de la phase chloroformique par 1mL d'eau alcaline

Sécher la phase chloroformique sous azote, dans des vials en verre de 8mL (20-30 min).

Les culots sont congelables à -20°C.

Préparation de l'échantillon

Reprendre les culots avec 500µL de méthanol

LC-MS/MS

Chromatographie Liquide Haute Performance - UFLC Shimadzu®

Colonne

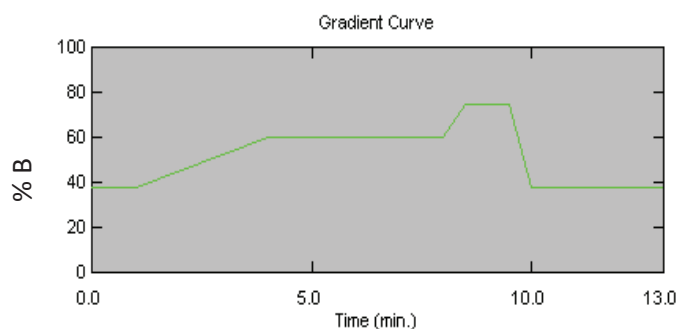
- Uptisphere® C8 ref. UP3C8 – 050/021
 - Longueur : 50 mm
 - Diamètre interne : 2.1 mm
 - Diamètre particules : 3µM

Phases mobiles

- Pompe A : Eau + 0.2% acide formique COOH
- Pompe B : Acétonitrile + 0.2% acide formique COOH

Paramétrages de la chromatographie

- Durée : 12.955 min
- Température de la colonne : 25°C
- Débit : 0.4 mL/min
- Volume injecté : 25 µL
- Gradient :
 - 0 à 1 min : 37.5% B
 - 1 à 4 min : 37.5 à 60% B
 - 4 à 8 min : 60% B
 - 8 à 8,5 min : 60 à 75% B
 - 8,5 à 9,5 min : 75% B
 - 9,5 à 10 min : 75 à 37.5% B
 - 10 à 12.995 min : 37.5% B



Spectrométrie de masse en tandem – 4500 Qtrap AB Sciex®

- Mode d'acquisition : MRM
 - D3-1-dSA : 289.5 / 271.2
 - dSA : 286.5 / 268.5
- Source d'ions : Turbo Spray

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon est engagé dans une démarche de lutte contre le plagiat. De ce fait, une sensibilisation des étudiants et encadrants des thèses a été réalisée avec notamment l'incitation à l'utilisation d'une méthode de recherche de similitudes.

ROCHAT Julie

Apport du dosage de la déoxysphinganine totale plasmatique par LC/MS-MS dans le diagnostic des Neuropathies Héréditaires Sensitives et Autonomes de type 1

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2022, 100 p.

RESUME

Les Neuropathies Héréditaires Sensitives et Autonomes de type 1 (HSAN1) sont la cause la plus fréquente de neuropathies sensibles héréditaires de transmission autosomique dominante. Actuellement, le diagnostic de ces pathologies passe par la confrontation de la clinique aux résultats de l'analyse moléculaire, avec identification de variants hétérozygotes de *SPTLC1* et *SPTLC2*. De nouveaux variants sont mis en évidence, sans que leur caractère délétère soit clairement établi. Leur caractérisation fonctionnelle devient donc fondamentale, et ce travail porte donc sur le développement du dosage de la déoxysphinganine totale plasmatique, comme biomarqueur de ces neuropathies.

Le dosage de la déoxysphinganine totale plasmatique est réalisé par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem, après extraction lipidique et hydrolyse acide puis alcaline. La méthode de dosage a été optimisée et ses performances analytiques validées.

L'analyse de douze patients avec suspicion de HSAN1 a permis de valider l'intérêt du dosage de la déoxysphinganine totale plasmatique pour le diagnostic de la maladie, et la caractérisation des nouveaux variants. C'est donc un excellent test fonctionnel, complémentaire de l'analyse génomique.

MOTS CLES

HSAN1
Sérine Palmitoyl Transférase
SPTLC1, *SPTLC2*
Déoxysphingolipides, déoxysphinganine

JURY

M. GUITTON Jérôme, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier
M. CHEILLAN David, Praticien Hospitalier
Mme BONELLO Nathalie, Praticien Hospitalier
Mme BOUHOURE Françoise, Praticien Hospitalier
M. LATOUR Philippe, Praticien Hospitalier

DATE DE SOUTENANCE

Jeudi 1^{er} septembre 2022

CONTACT

jerome.guitton@univ-lyon1.fr