

Faculté de Médecine

Année 2021

Thèse N° 3165

Thèse pour obtenir le diplôme d'État de docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement

le 06 Octobre 2021

Par

Benjamin GANNE

Né le 18 Décembre 1992, à Aix-en-Provence

**Étude fonctionnelle chez un patient atteint d'une forme adulte de
gangliosidose à GM2 variant AB :**

Premier cas et revue de la littérature

Examineurs :

Mme Sylvie BOURTHOUMIEU, MCU-PH, Service de Cytogénétique, génétique
médicale et biologie de la reproduction, CHU Limoges

Mme Catherine YARDIN, PU-PH, Service de Cytogénétique, génétique médicale et
biologie de la reproduction, CHU Limoges

Mme Sylvie ROGEZ, PU-PH, Service de Bactériologie – Virologie – Hygiène, CHU
Limoges

M. Laurent MAGY, PU-PH, Service de Neurologie, CHU Limoges

M. Benjamin DAURIAT, PH, Service de Cytogénétique, génétique médicale et
biologie de la reproduction, CHU Limoges



Faculté de Médecine

Année 2021

Thèse N° 3165

Thèse pour obtenir le diplôme d'État de docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement

le 06 Octobre 2021

Par

Benjamin GANNE

Né le 18 Décembre 1992, à Aix-en-Provence

Étude fonctionnelle chez un patient atteint d'une forme adulte de gangliosidose à GM2 variant AB :

Premier cas et revue de la littérature

Examineurs :

Mme Sylvie BOURTHOUMIEU, MCU-PH, Service de Cytogénétique, génétique médicale et biologie de la reproduction, CHU Limoges

Mme Catherine YARDIN, PU-PH, Service de Cytogénétique, génétique médicale et biologie de la reproduction, CHU Limoges

Mme Sylvie ROGEZ, PU-PH, Service de Bactériologie – Virologie – Hygiène, CHU Limoges

M. Laurent MAGY, PU-PH, Service de Neurologie, CHU Limoges

M. Benjamin DAURIAT, PH, Service de Cytogénétique, génétique médicale et biologie de la reproduction, CHU Limoges

Professeurs des Universités – praticiens hospitaliers

Le 14 octobre 2020

ABOYANS Victor	CARDIOLOGIE
ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
AJZENBERG Daniel	PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
ALAIN Sophie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
AUBARD Yves	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
AUBRY Karine	O.R.L.
BERTIN Philippe	THERAPEUTIQUE
CAIRE François	NEUROCHIRURGIE
CHARISSOUX Jean-Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE
CLAVERE Pierre	RADIOTHERAPIE
CLEMENT Jean-Pierre	PSYCHIATRIE d'ADULTES
CORNU Elisabeth	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
COURATIER Philippe	NEUROLOGIE
DARDE Marie-Laure	PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
DAVIET Jean-Christophe	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
DESCAZEAUD Aurélien	UROLOGIE
DES GUETZ Gaëtan	CANCEROLOGIE
DESSPORT Jean-Claude	NUTRITION
DRUET-CABANAC Michel	MEDECINE et SANTE au TRAVAIL
DURAND-FONTANIER Sylvaine	ANATOMIE (CHIRURGIE DIGESTIVE)
FAUCHAIS Anne-Laure	MEDECINE INTERNE

FAUCHER Jean-François	MALADIES INFECTIEUSES
FAVREAU Frédéric	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
FEUILLARD Jean	HEMATOLOGIE
FOURCADE Laurent	CHIRURGIE INFANTILE
GAUTHIER Tristan	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
GUIGONIS Vincent	PEDIATRIE
HANTZ Sébastien	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
HOUETO Jean-Luc	NEUROLOGIE
JACCARD Arnaud	HEMATOLOGIE
JAUBERTEAU-MARCHAN M. Odile	IMMUNOLOGIE
JESUS Pierre	NUTRITION
LABROUSSE François	ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
LACROIX Philippe	MEDECINE VASCULAIRE
LAROCHE Marie-Laure	PHARMACOLOGIE CLINIQUE
LIENHARDT-ROUSSIE Anne	PEDIATRIE
LOUSTAUD-RATTI Véronique	HEPATOLOGIE
LY Kim	MEDECINE INTERNE
MABIT Christian	ANATOMIE
MAGY Laurent	NEUROLOGIE
MARIN Benoît	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
MARQUET Pierre	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
MATHONNET Muriel	CHIRURGIE DIGESTIVE
MELLONI Boris	PNEUMOLOGIE
MOHTY Dania	CARDIOLOGIE

MONTEIL Jacques	BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE
MOUNAYER Charbel	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
NATHAN-DENIZOT Nathalie	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
NUBUKPO Philippe	ADDICTOLOGIE
OLLIAC Bertrand	PEDOPSYCHIATRIE
PARAF François	MEDECINE LEGALE et DROIT de la SANTE
PLOY Marie-Cécile	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
PREUX Pierre-Marie	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
ROBERT Pierre-Yves	OPHTALMOLOGIE
SALLE Jean-Yves	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
STURTZ Franck	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
TCHALLA Achille	GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT
TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre	ENDOCRINOLOGIE, DIABETE et MALADIES METABOLIQUES
TOURE Fatouma	NEPHROLOGIE
VALLEIX Denis	ANATOMIE
VERGNENEGRE Alain	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
VERGNE-SALLE Pascale	THERAPEUTIQUE
VIGNON Philippe	REANIMATION
VINCENT François	PHYSIOLOGIE
YARDIN Catherine	CYTOLOGIE et HISTOLOGIE

PROFESSEUR ASSOCIE DES UNIVERSITES A MI-TEMPS DES DISCIPLINES MEDICALES

BRIE Joël	CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE ET STOMATOLOGIE
------------------	---

PROFESSEURS DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

DUMOITIER Nathalie (Responsable du département de Médecine Générale)

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS DE MEDECINE GENERALE

HOUDARD Gaëtan (du 01-09-2019 au 31-08-2022)

LAUCHET Nadège (du 01-09-2020 au 31-08-2023)

PAUTOUT-GUILLAUME Marie-Paule (du 01-09-2018 au 31-12-2020)

PROFESSEURS EMERITES

ADENIS Jean-Paul du 01-09-2017 au 31-08-2021

ALDIGIER Jean-Claude du 01.09.2018 au 31.08.2020

BESSEDE Jean-Pierre du 01-09-2018 au 31-08-2020

BUCHON Daniel du 01-09-2019 au 31-08-2021

DESSPORT Jean-Claude du 01-09-2020 au 31-08-2021

MERLE Louis du 01.09.2017 au 31.08.2020

MOREAU Jean-Jacques du 01-09-2019 au 31-08-2021

TREVES Richard du 01-09-2020 au 31-08-2021

TUBIANA-MATHIEU Nicole du 01-09-2018 au 31-08-2021

VALLAT Jean-Michel du 01.09.2019 au 31.08.2022

VIROT Patrice du 01.09.2018 au 31.08.2021

Assistants Hospitaliers Universitaires – Chefs de Clinique

Le 12 juin 2020

ASSISTANTS HOSPITALIERS UNIVERSITAIRES

AUDITEAU Emilie	EPIDEMIOLOGIE (CEBIMER)
DAURIAT Benjamin	HISTOLOGIE, EMBRIOLOGIE ET CYTOGENETIQUE
DERBAL Sophiane	CHIRURGIE ANATOMIE
DOUCHEZ Marie	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
DUPONT Marine	HEMATOLOGIE BIOLOGIQUE
DURIEUX Marie-Fleur	PARASITOLOGIE
GUYOT Anne	LABORATOIRE ANAPATHOLOGIE
HERMINEAUD Bertrand	LABORATOIRE ANAPATHOLOGIE
HUMMEL Marie	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
LABRIFFE Marc	PHARMACOLOGIE
LEFEBVRE Cyrielle	ANESTHESIE REANIMATION
LOPEZ Stéphanie	MEDECINE NUCLEAIRE
PASCAL Virginie	IMMUNOLOGIE CLINIQUE
PIHAN Franck	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
RIVAILLE Thibaud	CHIRURGIE-ANATOMIE
SANSON Amandine	ANESTHESIE REANIMATION
TCHU HOI NGNO Princia	BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE

CHEFS DE CLINIQUE - ASSISTANTS DES HOPITAUX

ALBOUYS Jérémie	HEPATO GASTRO ENTEROLOGIE
ARMENDARIZ-BARRIGA Matéo	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE

AUBLANC Mathilde	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
BAÏSSE Arthur	REANIMATION POLYVALENTE
BEEHARRY Adil	CARDIOLOGIE
BLOSSIER Jean-David	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
BRISSET Josselin	MALADIES INFECTIEUSES ET TROPICALES
CHASSANG-BRUZEAU Anne-Hélène	RADIOLOGIE
CHAUVET Romain	CHIRURGIE VASCULAIRE
CISSE Fatou	PSYCHIATRIE
COMPAGNAT Maxence	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
DE POUILLY-LACHATRE Anaïs	RHUMATOLOGIE
DESCHAMPS Nathalie	NEUROLOGIE
DESVAUX Edouard	MEDECINE GERIATRIQUE
DUVAL Marion	NEPHROLOGIE
EL OUAFI Zhour	NEPHROLOGIE
FAURE Bertrand	PSYCHIATRIE d'ADULTES
FAYEMENDY Charlotte	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
FROGET Rachel	CENTRE D'INVESTIGATION CLINIQUE (pédiatrie)
GEYL Sophie	GASTROENTEROLOGIE
GHANEM Khaled	ORL
GILBERT Guillaume	REANIMATION POLYVALENTE
GUTTIEREZ Blandine	MALADIES INFECTIEUSES
HANGARD Pauline	PEDIATRIE
HARDY Jérémy	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE

HESSAS-EBELY Miassa	GYNECOLOGIE OBSTETRIQUE
LALOZE Jérôme	CHIRURGIE PLASTIQUE
LEGROS Maxime	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
LEHMANN Lauriane	GASTROENTEROLOGIE
MAURIANGE TURPIN Gladys	RADIOTHERAPIE
MEUNIER Amélie	ORL
MICLE Liviu-Ionut	CHIRURGIE INFANTILE
MOWENDABEKA Audrey	PEDIATRIE
PARREAU Simon	MEDECINE INTERNE ET POLYCLINIQUE
PELETTE Romain	CHIRURGIE UROLOGIE et ANDROLOGIE
PEYRAMAURE Clémentine	ONCOLOGIE MEDICALE
PLAS Camille	MEDECINE INTERNE B
QUILBE Sébastien	OPHTALMOLOGIE
SIMONNEAU Yannick	PNEUMOLOGIE
SURGE Jules	NEUROLOGIE
TRICARD Jérémy	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE MEDECINE VASCULAIRE
VAIDIE Julien	HEMATOLOGIE CLINIQUE
VERLEY Jean-Baptiste	PSYCHIATRIE ENFANT ADOLESCENT
VIDAL Thomas	OPHTALMOLOGIE

CHEF DE CLINIQUE – MEDECINE GENERALE

BERTRAND Adeline

SEVE Léa

PRATICIEN HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

Néant

Remerciements

Tout d'abord, merci à toi Sylvie de m'avoir proposé ce sujet, d'avoir accepté d'être ma directrice de thèse et de m'avoir permis d'encadrer un M1. Ce fut un plaisir de travailler avec toi sur ce sujet, mais également tout au long de mon stage en Cytogénétique. Merci pour tout !

Merci Cathy, pour tes enseignements et tes conseils, mais également pour ton soutien dans ma demande de M2 et d'année recherche. En espérant de tout cœur travailler à nouveau avec toi.

Merci également aux Professeurs Sylvie ROGEZ et Laurent MAGY d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, en vous souhaitant une bonne lecture si vous lisez cette partie avant !

Benjamin, merci d'avoir partagé avec moi tes connaissances cliniques, mais aussi de m'avoir appris quelques dogmes de la génétique dont je vais me souvenir longtemps, tels que « Tout phénotype se génotype » !

Merci Laurence de m'avoir énormément aidé avec les techniques d'IF et de ME, et pour ta patience alors que je t'amenaient sans cesse de nouvelles lames.

Merci à l'équipe du Dr LAMARI sur Paris d'avoir réalisé les analyses de LC-MS/MS, et d'avoir permis d'avancer sur le diagnostic de notre patient.

Merci à David et Nathalie de m'avoir tant appris en hématologie, et d'avoir été d'une extrême patience alors que je devais poser sans cesse les mêmes questions.

Aux techniciens/techniciennes de cytogénétique qui m'ont appris à faire les cultures cellulaires, et à ceux et celles d'hématologie qui ont dû rattraper mes bêtises durant deux longues années de garde, merci beaucoup !

Un grand merci à La Carole (je te l'avais promis !) d'avoir pris en charge tout le prélèvement sur Brive, clairement sans toi je n'avais pas grand-chose à dire !

Des gros bisous à toute la fine équipe grimpeuse, Yohan, Rémy, Sylvain et Cata (qui venaient peut-être plus pour la bière d'ailleurs) et surtout Maxime, pour ses splendides épisodes de « Maxime n'arrive pas à commencer la voie », mais surtout pour le plus gros mensonge que tu m'aies jamais sorti : « T'en fais pas, sur cette voie y'a que les premières prises qui sont difficiles » !

Merci à tous les aficionados de cet éternel baby-foot (Wasfi, Marwan, Alexandre, Benoît, Adrien, Nicolas, Émilien, Stéphanie, JP, Clotilde et j'en oublie très certainement une bonne partie) pour toutes ses heures à se charrier et à se manquer mutuellement de toute forme de respect.

Une petite (grande) pensée pour Étienne, qui est beaucoup trop loin à mon goût (les gardes avec toi me manquent), et dont je suis content d'avoir pu assister presque illégalement à la fin du mariage (la bise Maud !).

Mon cher Alexandre, qui n'est pas qu'un physique il faut le rappeler, j'espère pouvoir te revoir bientôt sur Nice !

À mes chères co-internes de génétique, Alexandre, Léa et Ophélie, avec les deux dernières qui sont aussi insupportables que moi ! On se revoit très vite aux cours de DES !

Bisous à tous mes autres co-internes de biologie, à qui j'ai certainement rendu plusieurs semestres infernaux au CBRS pendant maintenant près de 3 ans !

Une pensée également à mes anciens co-internes de promo de pédiatrie, Anne-Laure, Thomas et Amaury, j'espère sincèrement que l'on se recroisera !

Mes chers amis de Marseille (Douglas, Céline, Lise, Clément, Guillaume, Marie et Manu), que je n'ai pu guère voir ces dernières années mais qui me manquent, préparez-vous bien parce que vous allez devoir me supporter pendant une année complète !! Et merci à toi mon cher Douggy de m'avoir fait parrain de ta petite dernière. Je ne le suis pas encore d'ailleurs au moment où j'écris ces lignes, mais clairement quand tu les liras il sera trop tard pour revenir en arrière ! Je vous embrasse tous fort !

Un grand merci à mes parents (mes p'tits vieux !), de m'avoir soutenu durant tout mon cursus qui commence maintenant à être un peu longuet, malgré les moments difficiles qu'il y a pu avoir. Merci aussi de m'avoir donné un magnifique combiné de vos deux caractères de tête de mule, la pomme n'est pas tombée loin de l'arbre c'est sûr !

Merci à ma « petite princesse » d'avoir squatté mon appartement pendant plus d'un an, mais surtout de m'avoir supporté et soutenu pendant toute cette période <3

À tous mes Nîmois préférés (Lemon, Mik et Balou), Cyril mon petit Parisien que j'embête à chaque fois que je suis dans le coin, et surtout à jujucoquinedu73 (JE SAIS QUE C'EST TOI AKI).

Mes chers amis de Lycée, Nana, JB et Olivier, je sais qu'on est maintenant loin les uns des autres et qu'on n'arrive plus à se voir autant qu'on le faisait, mais je vous embrasse très fort !

Et à toutes les personnes qui ont pu survivre avec moi au volant, félicitations !

Enfin, merci infiniment à toutes les personnes que j'ai pu côtoyer de près ou de loin, et qui m'ont permis de grandir, de parvenir jusqu'ici et d'être la personne insupportable que je suis au quotidien.

La bise !

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Introduction.....	22
I. Les gangliosides.....	23
I.1. Structure chimique.....	23
I.2. Métabolisme.....	24
I.2.1. Biosynthèse.....	24
I.2.2. Catabolisme.....	26
I.3. Localisation et fonctions.....	29
II. Les gangliosidoses à GM2.....	30
II.1. Historique.....	30
II.2. Les hexosaminidases.....	31
II.2.1. Rôles et fonctions.....	31
II.2.2. Biosynthèse et maturation.....	32
II.2.3. Sites fonctionnels.....	33
II.3. Rôle et biosynthèse du cofacteur GM2-AP.....	35
II.4. Les différentes gangliosidoses à GM2.....	37
II.4.1. Mutations du gène <i>HEXA</i> et maladie de Tay-Sachs.....	38
II.4.2. Mutations du gène <i>HEXB</i> et maladie de Sandhoff.....	38
II.4.3. Mutations du gène <i>GM2A</i> et variant AB.....	39
II.5. Physiopathologie.....	41
II.6. Les différentes formes cliniques.....	43
II.6.1. Forme infantile.....	43
II.6.2. Forme juvénile.....	44
II.6.3. Forme adulte.....	44
III. Présentation du patient.....	46
III.1. Histoire de la maladie.....	46
III.2. Données cliniques.....	46
III.3. Contexte familial.....	47
III.4. Examens complémentaires.....	47
III.4.1. Conduction nerveuse.....	47
III.4.2. Radiologie.....	47
III.4.3. Biologie.....	47
III.4.4. Génétique.....	47
III.5. Consentement éthique.....	50
IV. Matériel et méthodes.....	51
IV.1. Choix du protocole expérimental.....	51
IV.2. Culture des fibroblastes.....	51
IV.2.1. Contrôles négatifs et patient.....	51
IV.2.2. Contrôle positif.....	52
IV.3. Étude de l'expression génique du gène <i>GM2A</i> par RT-PCRq.....	53
IV.4. Étude de l'accumulation des gangliosides GM2.....	55
IV.4.1. Microscopie électronique.....	55
IV.4.2. Immunofluorescence indirecte.....	55
IV.4.3. Chromatographie couplée à une spectrométrie de masse en tandem.....	56
V. Résultats.....	58
V.1. Expression génique du gène <i>GM2A</i>	58
V.1.1. Validation des amorces.....	58
V.1.1.1. Gènes de référence.....	58
V.1.1.2. Gène <i>GM2A</i>	59
V.1.2. Résultats de l'expression génique.....	61
V.1.2.1. Méthode de calcul.....	61
V.1.2.2. Méthode 1 : moyenne géométrique des Ct.....	61

V.1.2.3. Méthode 2 : moyenne géométrique des Qn.....	62
V.2. Étude de l'accumulation des gangliosides GM2.....	63
V.2.1. Microscopie électronique.....	63
V.2.2. Immunofluorescence indirecte.....	65
V.2.3. Chromatographie couplée à une spectrométrie de masse en tandem.....	67
VI. Discussion.....	69
VI.1. Revue de la littérature des gangliosidoses à GM2 variant AB.....	69
VI.2. Revue de la littérature des formes adultes de gangliosidoses à GM2.....	73
VI.2.1. Atteinte neurologique.....	74
VI.2.2. Atteinte neurocognitive.....	76
VI.2.3. Présentations initiales et évolution.....	76
VI.2.4. Génétique et activité enzymatique.....	77
VI.2.5. Diagnostics cliniques différentiels.....	77
VI.2.6. Cohérence des données de la littérature avec notre patient.....	77
VI.3. Avantages et limites des méthodes d'analyse.....	78
VI.3.1. Expression génique.....	78
VI.3.2. Microscopie électronique et immunofluorescence.....	78
VI.3.3. Western Blot.....	80
VI.3.4. Chromatographie.....	80
VI.4. Traitements.....	81
VI.4.1. Enzymothérapies.....	81
VI.4.1.1. Substitutive.....	81
VI.4.1.2. Par réduction de substrat.....	82
VI.4.2. Greffe de cellules souches (CS).....	82
VI.4.2.1. CS Hématopoïétiques.....	82
VI.4.2.2. CS Neurales.....	83
VI.4.3. Molécules Chaperonnes.....	83
VI.4.4. Thérapies géniques.....	84
Conclusion.....	85
Références bibliographiques.....	86
Annexes.....	97
Serment d'Hippocrate.....	110

Table des illustrations

Illustration 1 : Structure chimique d'un ganglioside GM2.....	23
Illustration 2 : Biosynthèse des gangliosides. Les enzymes impliquées en pathologie humaine sont indiqués en rouge, et les principaux gangliosides cérébraux sont indiqués par les accolades (Schnaar et al., 2019).....	25
Illustration 3 : Catabolisme des gangliosides monosialylés et des globosides (Sandhoff et al., 2013). Les protéines sont indiquées en rouge lorsqu'elles sont impliquées en pathologie humaine dans cette voie métabolique.....	28
Illustration 4 : Sous-unités composant les différentes hexosaminidases.....	34
Illustration 5 : Séquence de la protéine GM2-AP, avec le peptide signal entre parenthèses et le propeptide entre accolades. La plus grande des isoformes est indiquée entre crochets. Les sites d'intérêts sont en gras.....	35
Illustration 6 : Résumé du catabolisme du GM2 par l'HexA et la GM2-AP ; 1 = Le GM2 est fiché dans la membrane lysosomale ; 2 = La GM2-AP entoure le GM2 ; 3 = Détachement du GM2 et conformation fermée de la GM2-AP ; 4 = Association avec l'HexA et stabilisation via le résidu NANA ; 5 = Hydrolyse du N-AcetylGalactosamine.....	36
Illustration 7 : Principales mutations des gènes <i>HEXA</i> , <i>HEXB</i> et <i>GM2A</i> (Leal et al., 2020)..	40
Illustration 8 : IRM Cérébrale de notre patient en 2011 avec une discrète atrophie du vermis cérébelleux en T1 (A) et de légers hyper-signaux des cornes ventriculaires postérieures en T2 et T2 FLAIR (B et C respectivement). Comparaison avec l'IRM cérébrale de 2017 en T2 FLAIR (D et E) : stabilité de l'atrophie du vermis cérébelleux, et persistance des hyper-signaux.....	48
Illustration 9 : Représentation 3D de la protéine GM2-AP faite avec Protein Imager (https://3dproteinimaging.com/protein-imager/ , Ref PDB : 1PUB). Le ligand hydrophobe est en rouge clair (céramide) sur la figure de gauche, et le GM2 est représenté en intégralité sur la figure de droite. Les boucles hydrophobes sont en rouge foncé, la zone d'interaction avec la sous-unité α est en jaune. La proline 139 mutée chez notre patient est représentée en violet.....	50
Illustration 10 : Méthode de détermination des Ct (Cycle Threshold ou Cycle Seuil) pour la PCR en temps réel. Les Ct correspondent à l'intersection entre le début de la phase exponentielle de la PCR et la ligne seuil. Au cycle seuil, les trois courbes ont toutes le même niveau de fluorescence, représentatif de leur quantité d'ADN respective, ce qui permet de les comparer.....	54
Illustration 11 : Emplacement des amorces retenues pour <i>GM2A</i> . Réalisé avec UCSC (https://genome-euro.ucsc.edu/index.html).....	60
Illustration 12 : ME de notre contrôle négatif.....	63
Illustration 13 : ME de notre contrôle positif.....	64
Illustration 14 : ME de notre patient, les inclusions lamellaires concentriques sont indiquées par des flèches rouges.....	64
Illustration 15 : Immunofluorescence indirecte. Contrôle négatif au 1:200 (A), contrôle positif au 1:100 (B), patient au 1:200 (C) et 1:100 (D).....	66
Illustration 16 : Fond d'œil d'un patient atteint de gangliosidose à GM2 variant AB infantile (Brackmann F, 2017 ; Patient 1).....	69
Illustration 17 : IRM cérébrale de patients atteints de gangliosidose à GM2 variant AB infantile (Brackmann F, 2017). Le patient 1 présente des hyper-signaux du centre semi-ovale et des ganglions de la base (A = T2 ; B = T2 inversion-récupération), et le patient 2 présente des hyper-signaux des ganglions de la base, de la partie postérieure du thalamus et au niveau des radiations optiques (C = T2).....	72
Illustration 18 : Atrophie cérébelleuse chez des patients atteints de forme adulte de maladie de Tay-Sachs (Masingue et al., 2020) ; Patient A = Ataxie cérébelleuse ; Patient B, C et D = Déficit du motoneurone inférieur isolé sans syndrome cérébelleux.....	75

Illustration 19 : Inclusions intraneuronales visibles en microscopie électronique (Goldman et al., 1980) ; 7A = Inclusions lamellaires concentriques ; 7B = Inclusions irrégulières résultant d'un agrégat de lamelles..... 79

Illustration 20 : Immunofluorescence sur culture de fibroblastes (Martins et al., 2017) ; GM2 = Anticorps anti-GM2, LAMP2 = Anticorps anti-LAMP2 (Lysosomal-associated membrane protein)..... 79

Table des tableaux

Tableau 1 : Gènes mutés dans les gangliosidoses à GM2 et leurs conséquences.....	39
Tableau 2 : Revue de la littérature des patients atteints de gangliosidose à GM2 variant AB dont les mutations ont été décrites (Nomenclature HGVS 2016).....	70

Table des figures

Figure 1 : Corrélation entre l'activité résiduelle de l'hexosaminidase A (mesurée sur des fibroblastes en culture avec du GM2 radiomarqué) et les formes cliniques de gangliosidoses à GM2 (Sandhoff et al., 2013).....	42
Figure 2 : Âge de survenue des symptômes dans les formes infantiles de gangliosidoses à GM2 (Bley et al., 2015).....	43
Figure 3 : Mesure de la concentration en GM2 et du ratio GM2/GM3 par LC-MS/MS dans différentes maladies de surcharge lysosomale.....	57
Figure 4 : Analyse de la dispersion des Ct de nos gènes de référence (<i>GUSB</i> , <i>HPRT</i> et <i>TBP</i>).....	58
Figure 5 : Analyse de la dispersion des Ct pour les différentes amorces du gène <i>GM2A</i> chez notre patient.....	59
Figure 6 : Analyse de la dispersion des Ct pour les différentes amorces du gène <i>GM2A</i> chez nos contrôles négatifs.....	59
Figure 7 : Comparaison des Qn obtenus par la moyenne géométrique des Ct.....	61
Figure 8 : Comparaison des Qn obtenus par la moyenne géométrique des Qn.....	62
Figure 9 : Diagramme en boîte de la concentration en GM2 34:1 et du rapport GM2 34:1 / GM3 34:1.....	67
Figure 10 : Diagramme en boîte de la concentration en GM2 34:1 et du rapport GM2 34:1 / GM3 34:1 en fonction l'âge de début des signes cliniques.....	68
Figure 11 : Signes cliniques des patients adultes atteints de gangliosidoses à GM2 (Masingue et al., 2020) ; SD = Sandhoff, TS = Tay-Sachs, MI = Membres Inférieurs, MS = Membres Supérieurs.....	73

Introduction

Les gangliosides sont des glycosphingolipides découverts dans les années 1930, par Ernst Klenk (1), lors de l'analyse post-mortem de coupes de cerveaux de patients atteints de la maladie de Tay-Sachs. Cette maladie appartient, avec la maladie de Sandhoff et le variant AB, aux groupes des gangliosidoses à GM2, des maladies de surcharge lysosomale résultant du déficit dans le catabolisme du GM2, un intermédiaire essentiel dans la synthèse et la dégradation des gangliosides (2). Ces trois pathologies sont toutes de transmission autosomique récessive.

Les gangliosidoses à GM2 se retrouvent dans toutes les populations du globe. Dans la population générale, les maladies de Tay-Sachs et de Sandhoff ont une prévalence de 1/201 000 et 1/384 000 naissances vivantes, respectivement (3). Certaines populations sont plus à risque de maladie de Tay-Sachs, comme la population Ashkénaze et la population française canadienne de l'Est du Québec, où la fréquence des patients porteurs d'une mutation pathogène est de 1/30 et 1/14 respectivement, contre 1/300 dans la population générale (4).

Ces pathologies surviennent lorsque l'hexosaminidase A, enzyme catabolisant le GM2 en GM3, est déficitaire. S'ensuit une accumulation de GM2 dans les lysosomes, principalement des neurones, avec apparition plus ou moins précoce de signes neurologiques, et pouvant entraîner le décès du patient avant l'âge de 3-4 ans dans les formes les plus graves (5).

Parmi les trois types de gangliosidoses à GM2, le variant AB est le moins fréquent, avec moins d'une trentaine de cas décrits dans la littérature. Il correspond à un déficit du cofacteur de l'hexosaminidase A, la GM2 Activator Protein (ou GM2-AP), aussi appelé Sphingolipid Activator Protein 3 (ou SAP-3), codée par le gène *GM2A* situé en 5q33.1, et composé de 4 exons (6,7). Cette protéine non enzymatique permet la solubilisation de la partie hydrophobe des GM2, permettant d'exposer leur résidu N-AcetylGalactosamine à l'hexosaminidase A, et de le dégrader.

Sur le plan clinique, ces trois maladies peuvent être décrites sous trois formes différentes en fonction de l'âge de survenue des symptômes et de leur évolution :

- la forme infantile, la plus précoce et la plus grave, avec un décès dans la petite enfance ;
- la forme juvénile, avec apparition des symptômes dans les 10 premières années de vie, et une évolution clinique variable ;
- la forme adulte, avec apparition tardive des symptômes, et principalement une atteinte motrice et neuropsychiatrique.

Nous présenterons ici le premier cas de forme adulte de gangliosidose à GM2 variant AB, chez un jeune homme de 22 ans, hétérozygote composite pour le gène *GM2A*. Une des deux mutations étant considérée comme variant de signification indéterminée (VOUS ou VSI), nous présenterons aussi les techniques employées pour prouver sur le plan fonctionnel l'accumulation de GM2 chez notre patient, mais également une revue de la littérature des différentes mutations du gène *GM2A*.

I. Les gangliosides

I.1. Structure chimique

Les gangliosides sont des molécules composées d'une particule glycosphingolipidique, associant un céramide et un oligosaccharide, et d'un ou plusieurs acides sialiques, ici l'acide N-AcetylNeuraminique (aussi abrégé NANA ou Neu5Ac).

Ils sont concentrés au niveau des membranes cellulaires, avec leur particule céramide hydrophobe enchâssée dans la membrane, et leur partie saccharidique hydrophile dans le milieu extracellulaire.

Il existe plus de 180 gangliosides différents chez les vertébrés (8), qui diffèrent en fonction du nombre et de la position de leurs particules NANA : GM pour une particule NANA, GD pour deux, GT pour trois et GQ pour quatre. Il existe également des gangliosides notés GA1 ou GA2, qui ont la même structure glycosphingolipidique de base que le GM1 et le GM2 respectivement, mais sont dépourvus de résidus NANA.

Les particules NANA peuvent classiquement, chez les vertébrés, être liées au galactose (Gal) ou au N-AcetylGalactosamine (GalNAc).

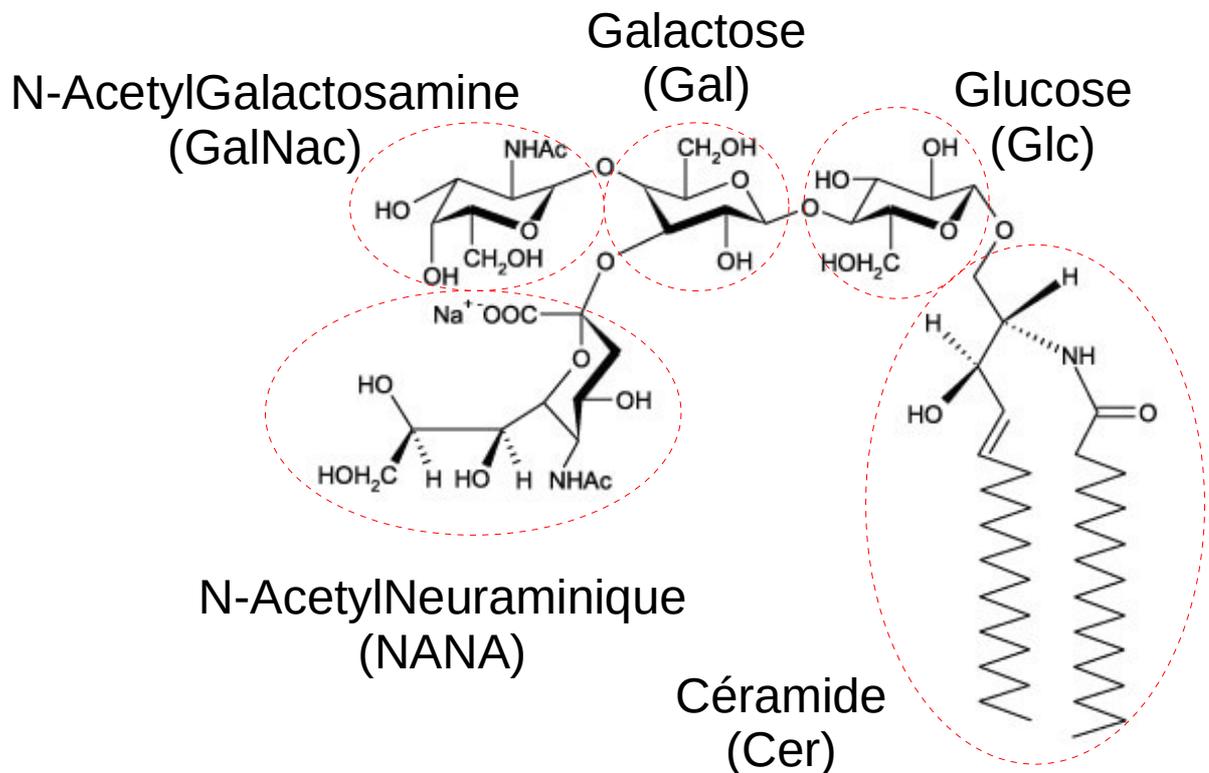


Illustration 1 : Structure chimique d'un ganglioside GM2.

I.2. Métabolisme

I.2.1. Biosynthèse

La particule céramide des gangliosides est synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique (RE), puis est glycosylée dans l'appareil de Golgi via une enzyme, la glucosylcéramide synthase (ou UDP-glucose céramide glucosyltransférase, codée par le gène *UGCG* en 9q31.3, OMIM*602874). Une fois la particule de glucosylcéramide formée (GlcCer) par l'association du céramide et d'un monosaccharide (ici le glucose) dans la partie cytosolique de la membrane, elle subit un « flip » lui permettant de passer dans la partie luminale du Golgi, où elle sera convertie en lactosylcéramide (LacCer) par adjonction d'un autre monosaccharide, le galactose. Cette réaction peut être médiée par deux β -1,4-galactosyltransférases différentes, codées par les gènes *B4GALT5* en 20q13.13 (OMIM*604016) et *B4GALT6* en 18q12.1 (OMIM*604017).

Excepté le GM4, qui est dérivé d'un galactosylcéramide (GalCer) via l'action de l'UDP-galactose céramide galactosyltransférase (codée par le gène *UGT8* en 4q26, OMIM*601291), les autres gangliosides sont dérivés du noyau lactosylcéramide disaccharidique précédemment décrit.

Le LacCer est alors sialylé par la GM3 synthase (LacCer α -2,3-sialyltransférase, codée par le gène *ST3GAL5* en 2p11.2, OMIM*604402#609056), pour former le plus petit et le plus abondant précurseur des gangliosides : le GM3 (9). Cette enzyme sert également à apposer une particule NANA directement sur un GalCer pour former un GM4. En fonction du nombre de particules NANA apposées ensuite sur le GM3 par la GD3/GT3 synthase (GM3/GD3 α -2,8-sialyltransférase, codée par le gène *ST8SIA1* en 12p12.1, OMIM*601123), le GD3 et le GT3 peuvent également être synthétisés (10).

Le GM3/GD3 va alors servir de base pour la synthèse des gangliosides plus complexes comme le GM2/GD2, grâce à la GM2/GD2 synthase (β -1,4-N-acetylgalactosaminyl transférase 1, codée par le gène *B4GALNT1* en 12q13.3, OMIM*601873#609195), qui va transférer un résidu N-AcetylGalactosamine sur le GM3/GD3 (8). Une nouvelle particule de galactose est apposée par la β -1,3-galactosyltransférase 4 (codée par le gène *B3GALT4* en 6p21.32, OMIM*603095), donnant le GM1 à partir du GM2, et le GD1b à partir du GD2. De nouveaux résidus NANA peuvent être apposés par des sialyltransférases, comme la β -galactoside α -2,3-sialyltransférase 3 (codée par le gène *ST3GAL3* en 1p34.1, OMIM*606494#615006#611090).

Le transfert des gangliosides néoformés à la surface de la cellule se fait ensuite via son système de sécrétion vésiculaire.

Les gangliosides peuvent ainsi être classifiés en quatre familles (11) :

- asialo-série (ou 0-série) : dérivés du GA2 ;
- a-série : dérivés du GM3 ;
- b-série : dérivés du GD3 ;
- c-série : dérivés du GT3.

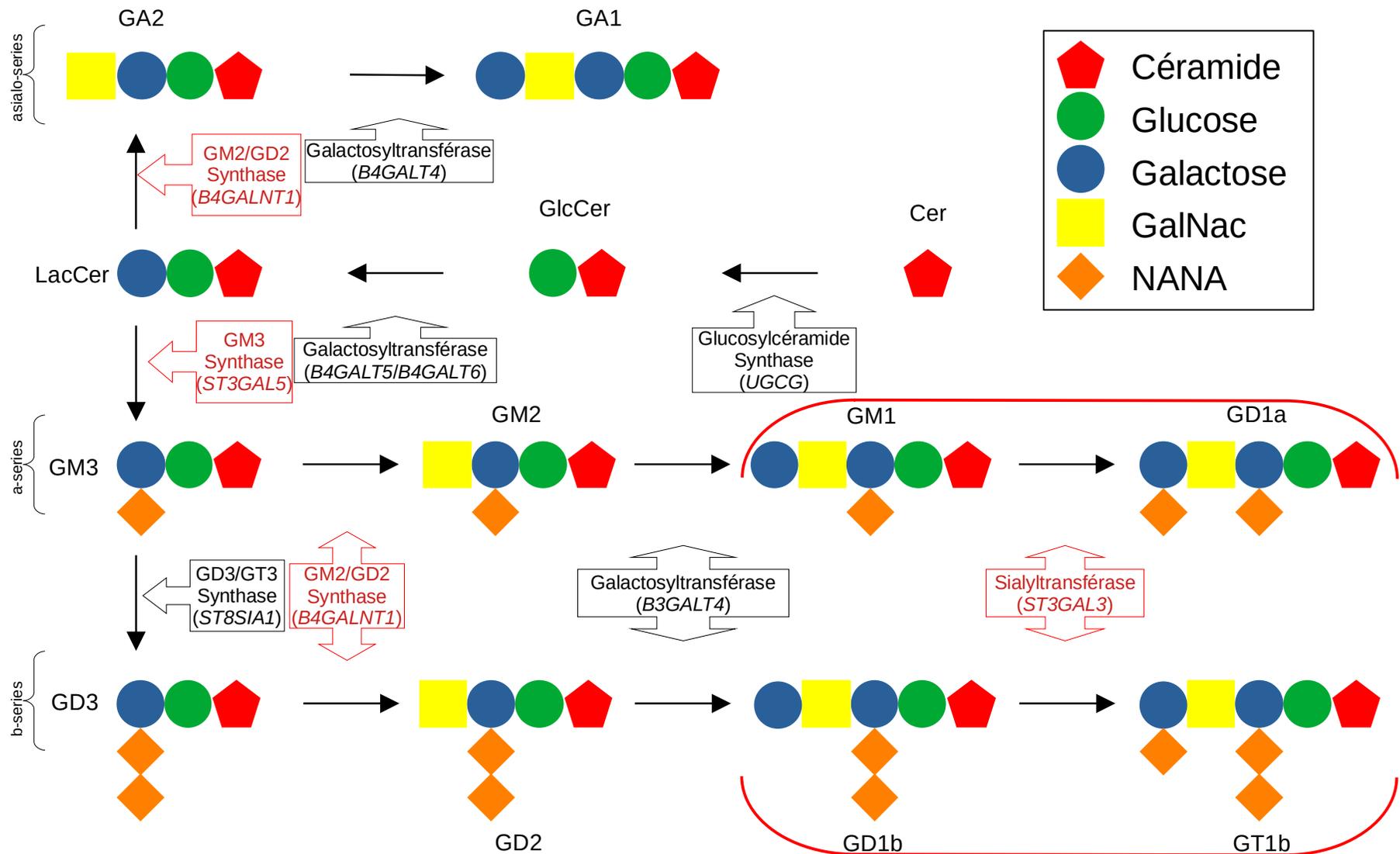


Illustration 2 : Biosynthèse des gangliosides. Les enzymes impliqués en pathologie humaine sont indiqués en rouge, et les principaux gangliosides cérébraux sont indiqués par les accolades (Schnaar et al., 2019).

I.2.2. Catabolisme

Les lysosomes sont des organites permettant la dégradation aussi bien des protéines que des lipides, et peuvent fournir par ce biais, nutriments et énergie à la cellule. Les macromolécules et les composants membranaires atteignent la partie luminale des lysosomes par autophagie, phagocytose ou endocytose. C'est cette dernière qui entre en jeu dans la dégradation des gangliosides, et les amènent depuis la membrane cellulaire jusqu'à l'endosome précoce, où les différents lipides sont tout d'abord triés. L'endosome mature, puis fusionne avec le lysosome où s'effectue la suite de la dégradation des molécules endocytées, et éventuellement une présentation antigénique par le biais du CD1.

Dans le cadre des gangliosides, qui sont amphiphiles, leur dégradation ne peut se faire directement par les enzymes lysosomales hydrosolubles. Ils ont besoin de la participation de protéines liant leur partie lipidique, les « Sphingolipid Activator Proteins » (SAPs).

La première étape de la dégradation des gangliosides monosialylés (GM) passe par la dégradation du GM1 en GM2 par la β -galactosidase, codée par le gène *GLB1* en 3p22 (OMIM*611458#230500#230600#230650#253010), avec comme cofacteur la GM2-AP, une protéine non enzymatique de 17 kDa codée par le gène *GM2A* en 5q33.1, ou la Saposine B (SAP-1 ou SAP-B), codée par le gène *PSAP* en 10q22.1. Les mutations du gène *GLB1* entraînent les gangliosidoses à GM1 par déficit en β -galactosidase, qui ne peuvent pas survenir par un déficit en cofacteur puisque la GM2-AP et la SAP-B se compensent l'une l'autre.

La dégradation du GM2 est effectuée par l'hexosaminidase A (HexA), une enzyme hétérodimérique composée de deux sous unités : α codée par le gène *HEXA* en 15q23 (OMIM*606869#272800), et β codée par le gène *HEXB* en 5q13.3 (OMIM*606873#268800). Cette enzyme nécessite pour fonctionner un cofacteur, la GM2-AP, mentionnée plus haut. Deux sous-unités β peuvent aussi se dimériser pour former l'hexosaminidase B (HexB), servant au catabolisme des globosides en globotriaosylcéramides. Cette réaction peut aussi être catalysée par l'HexA.

Les gangliosidoses à GM2, maladies rares de transmission autosomique récessive, peuvent ainsi être causées par des mutations pathogènes des gènes *HEXA*, *HEXB* ou *GM2A*, qui entraînent un déficit fonctionnel en HexA et une accumulation de GM2 responsable des signes cliniques observés.

À un pH acide, comme dans le lysosome, la GM2-AP est chargée positivement, et peut se fixer sur la membrane lysosomale anionique via deux boucles hydrophobes, Val90_Trp94 et Val153_Leu163 (12). La reconnaissance de la partie hydrophile (carbohydate) du GM2 se fait au niveau d'un site de reconnaissance en bordure de la cavité de la GM2-AP. La partie hydrophobe (céramide) du GM2 peut alors se loger dans la cavité, et la boucle Val153_Leu163 change de conformation, en se repliant vers l'intérieur : la GM2-AP passe alors d'une conformation ouverte à une conformation fermée.

La GM2-AP se détache ensuite de la membrane lysosomale : c'est le mécanisme de liftase. Elle interagit alors, en particulier avec les acides aminés Asp113-Met117-Glu123 (13), avec la sous-unité α de l'hexosaminidase A, en Gly280_Pro283 (14), pour former un complexe de Michaelis-Menten permettant la dégradation du GM2. Ce complexe stœchiométrique permet l'hydrolyse de la particule GalNac (β -D-N-AcetylGalactosamine) terminale des GM2.

Le GM3 alors formé est dégradé en LacCer par la sialidase 1, codée par le gène *NEU1* en 6p21.33 (OMIM*608272), utilisant la SAP-B comme cofacteur. Les déficits en sialidase (α -D-neuraminidase) donnent les sialidoses, type I (cécité progressive avec tache maculaire, épilepsie myoclonique et ataxie apparaissant entre 20 et 30 ans) ou type II (sialidose dysmorphique infantile, proche cliniquement de la maladie de Hurler).

Chez la souris, il existe une voie de dégradation alterne, permettant la conversion du GM2 accumulé en GA2 par sialidase 3 (codée par le gène *Neu3* sur le bras long du chromosome 7 chez la souris, et le gène *NEU3* en 11q13.4 chez l'homme, OMIM*604617), puis sa dégradation par les hexosaminidases A et B (1,8). Ce mécanisme serait suffisant dans la majorité des neurones du cortex cérébral, et explique la difficulté à établir un modèle murin Tay-Sachs qui se rapproche de l'être humain (15). Chez ce dernier, la sialidase 3 est associée à la membrane des lysosomes, et a comme principaux substrats le GM3 et le GDA1, catalysant leur conversion en LacCer et GM1 respectivement (15). En revanche, la conversion du GM2 en GA2 est très faible, et ne permet pas son élimination comme chez la souris (16).

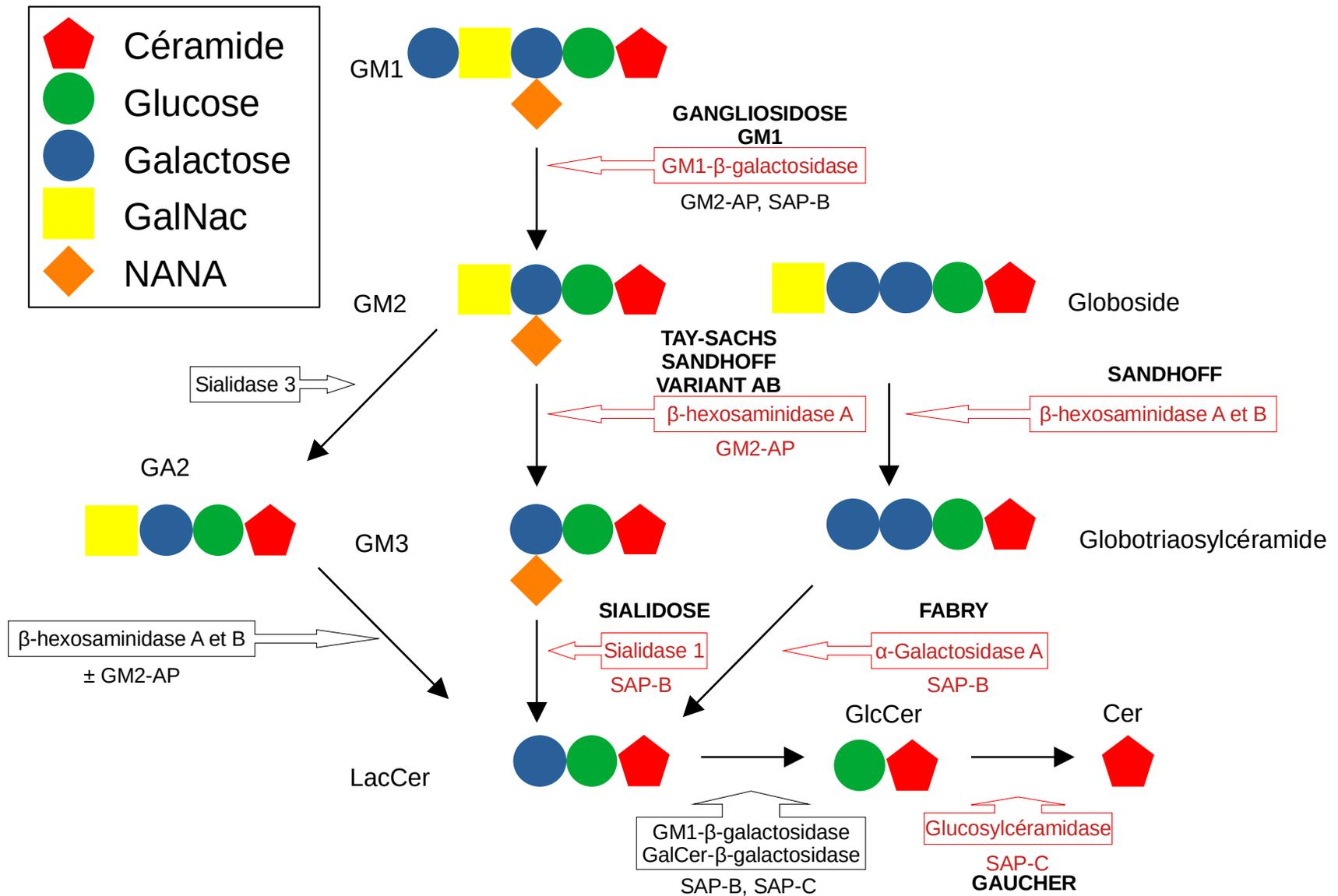


Illustration 3 : Catabolisme des gangliosides monosialylés et des globosides (Sandhoff et al., 2013). Les protéines sont indiquées en rouge lorsqu'elles sont impliquées en pathologie humaine dans cette voie métabolique.

I.3. Localisation et fonctions

Les gangliosides se retrouvent dans tous les tissus, bien qu'ils soient le plus abondant dans le cerveau. En proportion, les gangliosides sont 3 fois plus présents dans le cortex cérébral que dans la substance blanche, et jusqu'à 300 fois plus dans le cortex cérébral que dans le foie (9).

Chez l'être humain, les gangliosides composant les membranes des cellules nerveuses appartiennent quasi exclusivement (96 %) à la famille des gangliotétraoses, c'est-à-dire le GM1 et ses dérivés (GD1a, GD1b, GT1b et GQ1b) (17). Les gangliosides GM2, parmi d'autres, composent les 4 % restant. Les GM3 sont quant à eux prédominants dans les tissus périphériques, représentant plus de la moitié des gangliosides dans le cœur, les muscles squelettiques, le foie, les reins et le tissu adipeux (18).

Au niveau de la membrane cellulaire, les gangliosides vont s'associer latéralement avec les autres sphingolipides, le cholestérol, les protéines ancrées par le glycosylphosphatidylinositol (GPI) et les protéines transmembranaires. Ces structures sont appelées des radeaux lipidiques (« lipid rafts »), des cavéoles ou des microdomaines enrichis en glycosphingolipides. Ces domaines sont non seulement dynamiques, mais ont de nombreux rôles différents, dont la reconnaissance inter-cellulaire, la transduction de signaux et l'adhésion (9,11) :

- régulation de l'activité de récepteurs à tyrosine kinase, comme l'inhibition du récepteur à EGF (Epidermal Growth Factor) ou du récepteur à l'insuline par le GM3 ;
- fixation des plaques bêta-amyloïdes solubles à la surface des neurones par le GM1/GD1a/GD1b/GT1b ;
- neutralisation de toxines bactériennes, comme la toxine cholérique, par le GM1, mais aussi les toxines botulique et tétanique ;
- fixation des glycoprotéines associées à la myéline (MAG) par le GD1a et le GT1b, avec certaines formes de Guillain-Barré liées à des anticorps anti-gangliosides.

Le rôle des gangliosides sur le plan neuronal se voit aussi lors de la survenue de mutations délétères dans les gènes essentiels à leur biosynthèse (9) :

- les mutations de *B4GALNT1*, codant pour la GM2/GD2 synthase, donnent des paraplégies spastiques récessives, avec un déficit intellectuel et des crises d'épilepsie ;
- les mutations de *ST3GAL5*, codant pour la GM3 synthase, donnent le syndrome d'épilepsie infantile type Amish, une encéphalopathie épileptique sévère récessive ;
- les mutations de *ST3GAL3*, codant pour la β -galactoside α -2,3-sialyltransferase 3, donnent des encéphalopathies épileptiques récessives et des déficits intellectuels.

Il est intéressant de noter que la composition en gangliosides du cerveau change au cours du développement embryonnaire, avec une prédominance initiale de GM3 et GD3, puis de gangliosides complexes (GM1, GD1a, GD1b et GT1b). Ce changement s'explique par une modification de l'expression des gènes codant pour les protéines impliquées dans la biosynthèse des gangliosides dans les tissus durant leur développement (11).

II. Les gangliosidoses à GM2

II.1. Historique

La première description clinique des gangliosidoses à GM2 remonte en avril 1881. À l'hôpital de Londres, le Dr Warren Tay faisait la première description clinique d'une tache rouge cerise au fond d'œil, chez un garçon de 12 mois qui présentait depuis ses 3 semaines une hypotonie généralisée. Malgré l'absence de consanguinité chez les parents, deux autres enfants issus de ce couple furent atteints de la même affection rétinienne, décrite comme « a conspicuous, tolerably defined, large white patch, more or less circular in outline, and showing at its centre a brownish-red, fairly circular spot, contrasting strongly with the white patch surrounding it. » (19). Deux de ces enfants décédèrent aux âges de 18 et 20 mois, et le dernier fut perdu de vue. De manière indépendante, en 1887, le Dr Bernard Sachs présenta à l'Association de Neurologie Américaine le cas d'une enfant atteinte d'hypotonie néonatale majeure, avec cécité progressive. Le Dr Herman Knapp, ophtalmologiste, décrit pour cette patiente « *Fovea centralis*, of a cherry red color, was surrounded by an intense grayish-white opacity. This opacity was most distinct in the vicinity of the *fovea centralis*, and for some little distance around it, but faded away gradually into normal retinal field. » (20). L'enfant décéda à l'âge de 2 ans, et l'autopsie ainsi que l'analyse histologique de son cortex révéla l'absence complète de cellule pyramidale normale. Sachs décrit par la suite le troisième apparenté de cette famille, atteint de la même affection, et suspecta une origine congénitale à cet arrêt de développement normal du cortex (« *agenesis corticalis* »). Il nomma cette maladie « amaurotic family idiocy » (21). Il remarqua également, en 1910, avec le Dr Strauss, que la dégénérescence des cellules ganglionnaires était due à la formation d'une substance lipophile (22). Parallèlement, en 1892, le Dr E. C. Kingdon reprit les descriptions cliniques de Sachs et de Tay, en avançant que la tache rouge cerise au fond d'œil était un signe précoce et essentiel pour le diagnostic de la maladie, qui pris progressivement l'éponyme de « Maladie de Tay-Sachs » (23).

Le profil génétique récessif de la maladie s'est confirmé par la suite entre les années 1930 et 1960 (24,25), de même que la prédisposition des Juifs Ashkénazes, comme décrite plus tôt par le Dr Sachs. Ce fut également à cette époque que la nature des lipides impliqués dans cette maladie lysosomale fut découverte. En 1942, le Dr Klenk et son équipe mirent en évidence une accumulation lysosomale de sphingolipides, qu'ils caractérisèrent comme des gangliosides, des glycosphingolipides contenant un groupement d'acide neuraminique (26). Leur structure a par la suite été précisée par Svennerholm en 1962, puis par Ladeen et Salsman en 1965 (27).

Ce n'est qu'en 1968 que Robinson et Striling découvrirent au sein d'extraits de rate, deux isoenzymes, qu'ils désignèrent sous le nom de N-acetyl- β -glucosaminidase A et B, enzymes lysosomales permettant de cliver le résidu terminal N-AcetylGalactosamine de la partie oligosaccharidique des GM2. Cependant, les travaux réalisés à l'époque montraient une activité des hexosaminidases augmentée dans les tissus cérébraux des patients atteints de la maladie de Tay-Sachs, contrairement à ce qui était attendu. Okada et O'Brien reprirent les travaux de Robinson (28), et confirmèrent la présence de deux hexosaminidases dans les tissus cérébraux, hépatiques, cutanés et rénaux : la première (A) migrant rapidement en électrophorèse, et la seconde (B) migrant lentement. Ils démontrèrent l'absence d'activité chez les patients atteints de maladie de Tay-Sachs de l'hexosaminidase A, mais une

augmentation de celle de l'hexosaminidase B. En 1969 également, Sandhoff décrit le cas d'un patient atteint de la maladie de Tay-Sachs avec accumulation rénale de globosides, dont l'activité à la fois de la β -D-N-acetyl-hexosaminidase A et B était diminuée (29,30). Fut alors faite la distinction entre la gangliosidose à GM2 type 1 (Tay-Sachs) et type 2 (Sandhoff). Ces deux pathologies étaient également appelées respectivement variant B (du fait de l'absence de composé A sensible à la chaleur) et variant O (du fait de l'absence de composé A et de composé B résistant à la chaleur) (31). Fut également décrit à cette époque le variant AB, pour lequel aucune des deux enzymes n'était retrouvée déficiente, mais dont la clinique et l'examen histologique des coupes de cerveaux étaient non distinguables d'une maladie de Tay-Sachs (32).

Avec ces découvertes vint le développement de techniques permettant aussi bien une mesure de l'activité des hexosaminidases que leur quantification. Il fut possible de proposer dans la population Ashkenaze un dépistage des parents hétérozygotes (chez qui on peut observer une diminution de l'activité de l'HexA d'environ 50 %) mais aussi un dépistage prénatal via ponction de liquide amniotique ou choriocentèse, permettant une réduction de 90 % de l'incidence de la maladie de Tay-Sachs aux USA (33), dont environ 3 % de la population Ashkenaze est conductrice (34).

En 1976, la structure des hexosaminidases fut précisée par deux équipes différentes (35,36). Lors de l'étude biochimique des mécanismes de dégradation des gangliosides GM2, il apparut que l'hexosaminidase A purifiée pouvait dégrader des composés hydrophiles synthétiques, mais n'avait pas de capacité d'hydrolyse sur les substrats hydrophobes. Fut alors mis en évidence la présence d'une protéine non-enzymatique, la GM2-AP, permettant la présentation des gangliosides GM2 et GA2 à l'hexosaminidase A (37–39), et dont le déficit est responsable des gangliosidoses à GM2 variant AB. Au même moment, la localisation chromosomique des sous-unités fut identifiée (40,41), puis plus tard vint l'isolement et le clonage de leur ADNc. L'homologie importante entre les deux sous-unités (>60 %) suggère alors un gène commun ancestral (42).

II.2. Les hexosaminidases

II.2.1. Rôles et fonctions

Les hexosaminidases regroupent trois isozymes lysosomales dimériques différentes, composées de deux sous-unités (α ou β). Leur rôle est d'hydrolyser le résidu N-AcetylGalactosamine des glycosphingolipides, et le site actif de l'enzyme est formé par l'association des sites actifs des deux sous-unités la composant.

Alors que ces trois isoenzymes peuvent hydrolyser des substrats naturels et synthétiques neutres, la présence d'une sous-unité α est nécessaire pour l'hydrolyse des composés négativement chargés, comme le GM2, car elle permet la fixation du GM2-AP (43). Le catabolisme des composés ne nécessitant pas la présence du GM2-AP est par ailleurs jusqu'à 4000 fois plus rapide que pour le GM2 (2).

L'HexA hétérodimérique ($\alpha\beta$) a pour rôle principal l'hydrolyse du GM2 négativement chargé en GM3, et elle ne peut se faire qu'en présence du cofacteur GM2-AP. Elle peut également hydrolyser les globosides en globotriaosylcéramides (Gb3), de même que l'HexB homodimérique ($\beta\beta$).

En revanche, l'hexosaminidase S homodimérique ($\alpha\alpha$) n'est pas présente chez un individu normal. Elle n'est synthétisée par l'organisme que chez les patients incapables de produire une sous-unité β fonctionnelle (2,44), c'est-à-dire ceux atteints de la maladie de Sandhoff. Elle représente alors 1-6 % de l'activité enzymatique des cellules, ce qui n'est pas suffisant pour compenser le déficit en HexA et HexB.

II.2.2. Biosynthèse et maturation

Le gène *HEXA* (OMIM*606869#272800), est situé en 15q23 (45), fait 35090bp (Chr15: 72,340,924-72,376,014 ; brin anti-sens), et comporte 14 exons. Son transcrit (ENST00000268097.10, NM_000520.6) fait 4785 bp de long. Il code pour la sous-unité α des hexosaminidases A et S (NP_000511.2), faisant 529 aa (~68 kDa). Il existe deux ARNm différents (2,0 kb majoritairement, et 2,2 kb minoritairement (2)) du fait de l'existence de deux signaux de polyadénylation en 3'UTR, mais tous deux codent pour la même protéine. Deux points de coupure majeurs ont été identifiés sur la sous-unité α :

- alanine (Ala) 22 : permet le retrait du peptide signal dans le RE ;
- histidine (His) 88 : les résidus lysine (Lys) 86 et His88 composent le signal de coupure lysosomale, permettant de retirer le propeptide Ala22_His88 (α_p , ~14 kDa) via des exopeptidases, mais qui reste cependant lié par des ponts disulfures à la chaîne principale α_m (~56 kDa).

Le gène *HEXB* (OMIM*606873#268800) quant à lui est situé en 5q13.3 (2), fait 82624bp (Chr5: 74,640,023-74,722,647 ; brin sens) et comporte également 14 exons. Son transcrit (ENST00000261416.12, NM_000521.4) fait 1812 bp de long, et code pour la sous-unité β des hexosaminidases A et B, de 556 aa (NP_000512.2, ~68 kDa). Le taux d'homologie avec le gène *HEXA* (55 % de la séquence nucléotidique et 57 % de la séquence d'acides aminés (46)) suggère un ancêtre commun. Cette sous-unité présente des étapes de maturation plus importantes que la sous-unité α (47) :

- clivage du peptide signal en Ala43 dans le RE, puis perte de quelques acides aminés exposant l'Ala45 ;
- coupure au niveau des acides aminés valine (Val) 48, thréonine (Thr) 122 et Lys315, formant ainsi 3 chaînes restant reliées par des ponts disulfures (dans l'ordre β_p de 17 kDa, β_b de 24 kDa et β_a de 28 kDa) (2) ;
- clivage des 3 acides aminés arginine (Arg) 312, glutamine (Gln) 313 et asparagine (Asn) 314 lors de la maturation de la chaîne β_a .

Il est à noter que la chaîne β_a diffère en structure selon l'isoenzyme qu'elle compose : alors que l'acide aminé initial est une Lys315 dans l'hexosaminidase B, il s'agit d'une leucine (Leu) 316 dans l'hexosaminidase A (48).

Durant la maturation post-traductionnelle de ces protéines s'effectuant dans le complexe RE-Golgi, des N-glycosylations ont lieu pour la sous-unité α au niveau des résidus Asn115-157-295, et pour la sous-unité β au niveau des résidus Asn84-142-190-327 (49). Les mannoses terminaux présents au niveau des Asn84-115-295 N-glycosylées doivent aussi être phosphorylés pour être reconnus par le récepteur au mannose-6 phosphate (M6P) (8), qui permet l'acheminement des enzymes au lysosome. Cette phosphorylation se fait par l'action séquentielle de deux enzymes, la N-acetylglucosamine-1-phosphotransférase et la N-

acetylglucosamine-1-phosphodiester- α -N-acetylglucosaminidase, et nécessite pour ce faire une conformation quasiment mature du monomère (2).

La dimérisation des sous-unités se fait durant leur parcours dans le réseau trans-Golgi, au niveau des acides aminés Arg504-Gln515-Asn518 sur la sous-unité α et Asp494-Asn497-His212 sur la sous-unité β (14), bien que ce mécanisme ne soit pas encore totalement élucidé. Les enzymes sont ensuite transportées dans l'endosome précoce, où elles rempliront leurs fonctions.

Une portion significative (environ 20 %) de ces enzymes peut aussi sortir du réseau trans-Golgi, et être exocytée dans le milieu extracellulaire, où elle sera endocytée par les cellules environnantes via des récepteurs au M6P présents à leur surface : c'est le système de sécrétion/recapture (50).

II.2.3. Sites fonctionnels

Pour l'hexosaminidase A, deux sites fonctionnels ont été décrits, chacun sur une de ses sous-unités :

- les acides glutamiques (Glu) 323 et 355 pour les sous-unités α et β respectivement, permettant la protonation de l'atome d'oxygène reliant le GalNac au Gal sur lequel est fixé le résidu NANA ;
- les acides aspartiques (Asp) 322 et 354 pour les sous-unités α et β respectivement, stabilisant la réaction sus-citée.

Il a été montré, pour expliquer la différence d'affinité entre l'HexA et l'HexB, que l'Arg424 de la sous-unité α pouvait former une liaison hydrogène avec le groupe carboxylate (RCOO-) du résidu NANA, alors que l'Asp452 de la sous-unité β le repousserait (8). Cette région Asn423_Arg424 de la sous-unité α (correspondant à la région Asp452_Leu453 sur la sous-unité β) est considéré comme la région critique permettant l'hydrolyse du N-AcetylGalactosamine (14).

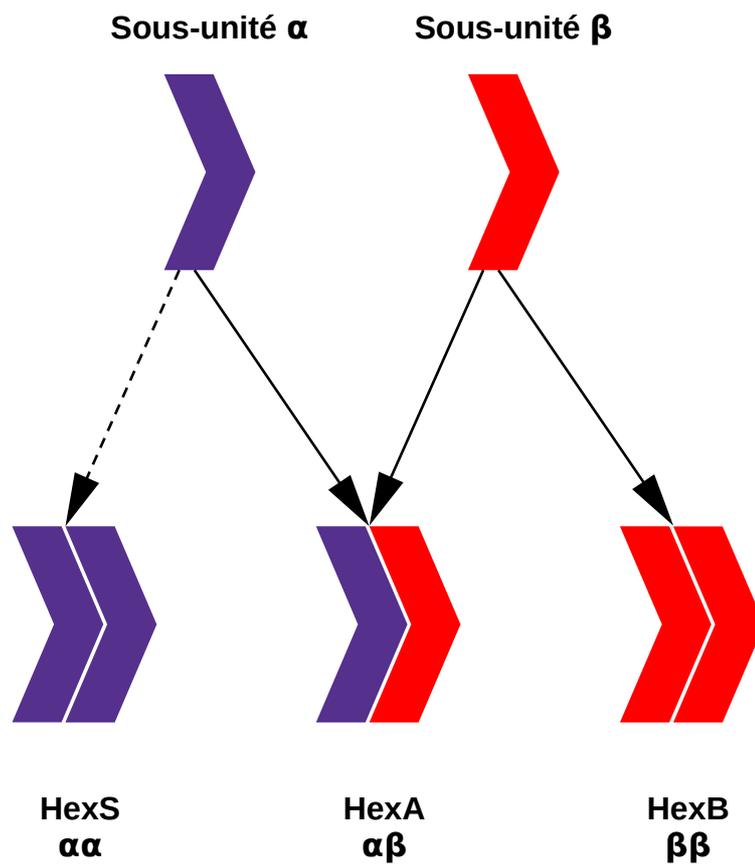


Illustration 4 : Sous-unités composant les différentes hexosaminidases.

II.3. Rôle et biosynthèse du cofacteur GM2-AP

Le rôle de la GM2-AP est de permettre la dégradation du GM2 par l'HexA, par le mécanisme de liftase décrit plus haut. Chez la souris, ce cofacteur améliorerait la dégradation du GA2 par l'HexB, mais ce mécanisme n'est pas retrouvé chez l'être humain, expliquant les différences de niveau d'accumulation des gangliosides entre les modèles murins et humains (2). Dans les deux cas, la GM2-AP ne peut se fixer sur l'HexB du fait de l'absence de la sous-unité α contenant son site de liaison, et l'HexB ne peut donc pas dégrader le GM2, y compris *in vitro*.

Cette protéine non enzymatique est codée par le gène *GM2A* (OMIM*613109#272750) situé en 5q33.1, faisant 14255bp (Chr5: 151,253,185-151,270,440 ; brin sens) et comportant 4 exons. Son transcrit (ENST00000357164.4, NM_000405.5) fait 3603 bp de long. La GM2-AP fait 193 aa (NP_000396.2, ~22 kDa), et subit aussi une maturation durant son passage dans le RE, avec excision du peptide signal de 23 aa en Ala23. Une deuxième coupure a lieu en Leu31, enlevant le propeptide, et donnant une forme mature de la chaîne de 162 aa de long. Les huit résidus cystéines (Cys) permettent à la protéine de former quatre ponts disulfures, lui assurant une grande résistance à la chaleur. Le seul site de N-glycosylation se trouve sur l'Asn63 (51).

On peut aussi noter la présence d'une isoforme courte, représentant 80 % de la quantité de GM2-AP, avec une délétion des sérines (Ser) 32 et 33.

Contrairement aux hexosaminidases, la GM2-AP n'est phosphorylée qu'à hauteur de 10 %, alors que 70 % de la quantité totale reste intracellulaire. Cette observation suggère un mécanisme principal de recapture indépendant du M6P, et la GM2-AP pourrait alors avoir d'autres rôles *in vivo*, notamment comme transporteur de glycolipides (2).

Il existe un pseudogène, le *GM2AP1* (GM2 ganglioside activator pseudogene 1), situé sur le chromosome 3, ne produisant pas de protéine.

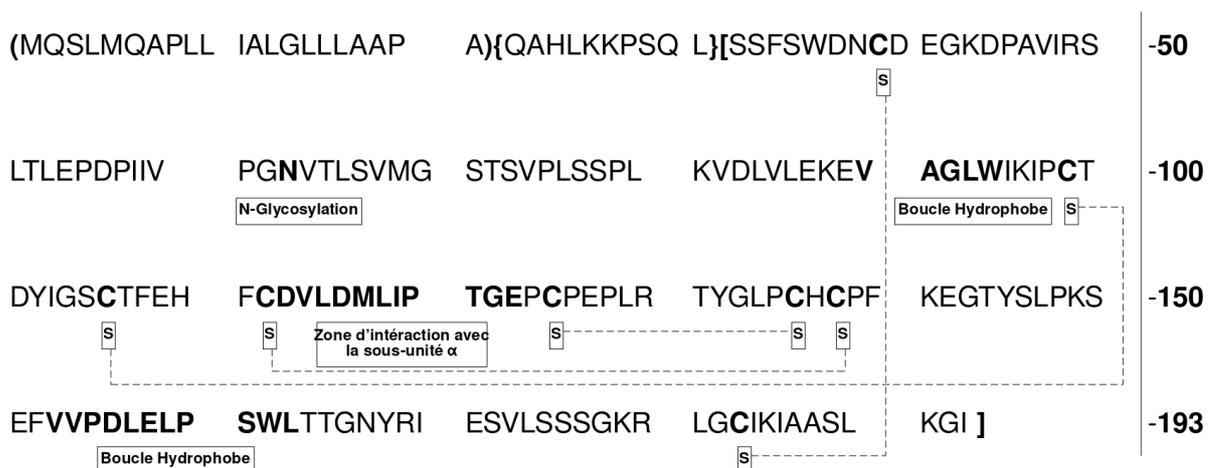


Illustration 5 : Séquence de la protéine GM2-AP, avec le peptide signal entre parenthèses et le propeptide entre accolades. La plus grande des isoformes est indiquée entre crochets. Les sites d'intérêts sont en gras.

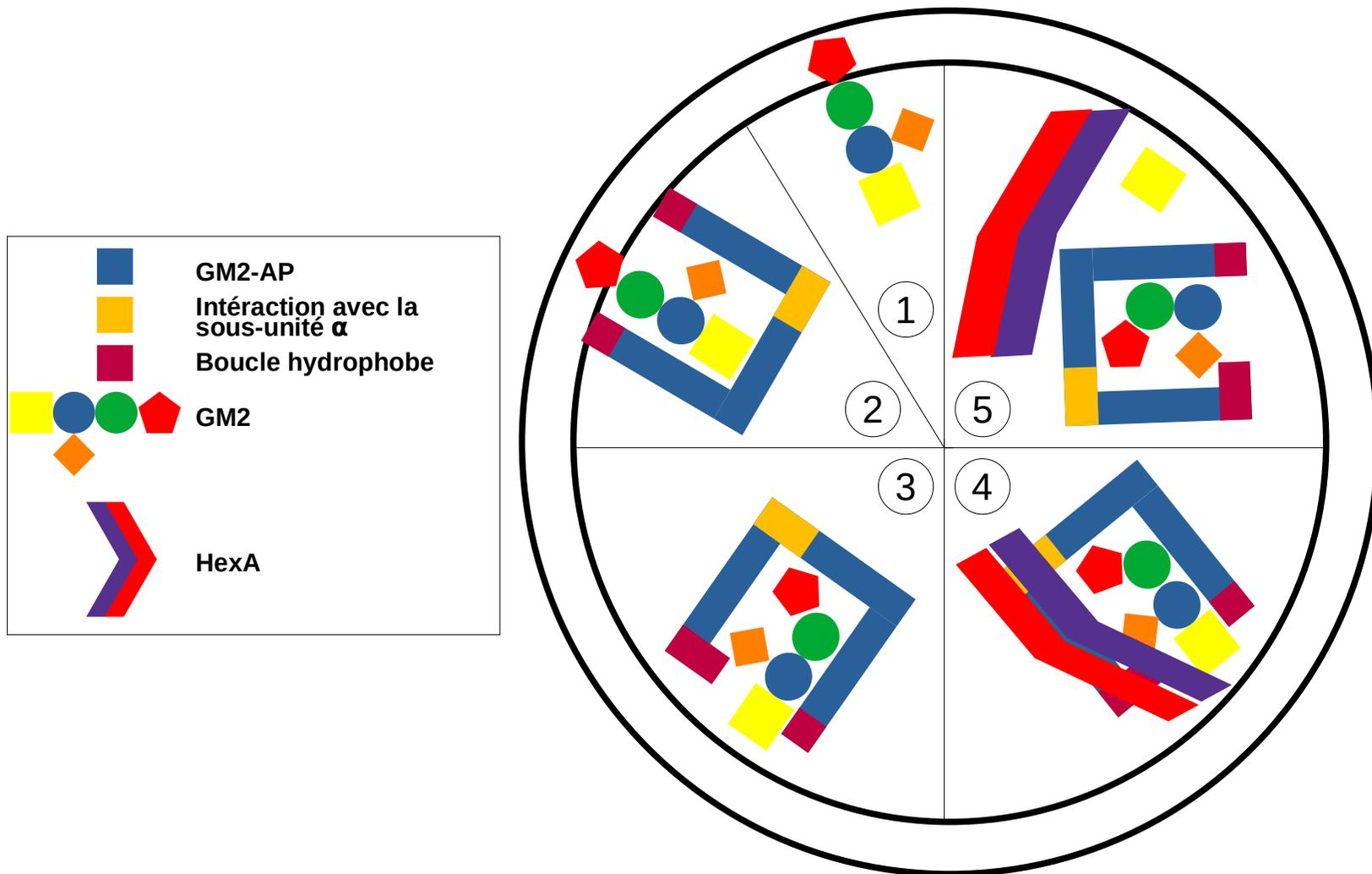


Illustration 6 : Résumé du catabolisme du GM2 par l'HexA et la GM2-AP ; 1 = Le GM2 est fiché dans la membrane lysosomale ; 2 = La GM2-AP entoure le GM2 ; 3 = Détachement du GM2 et conformation fermée de la GM2-AP ; 4 = Association avec l'HexA et stabilisation via le résidu NANA ; 5 = Hydrolyse du N-AcetylGalactosamine.

II.4. Les différentes gangliosidoses à GM2

Il existe plus de 35 maladies de surcharge lysosomales différentes (2), et elles résultent en majorité du déficit d'une seule et unique enzyme. Le déficit d'une enzyme du catabolisme entraîne la surcharge du composé non dégradé, une vacuolisation des cellules, et une mort cellulaire par apoptose.

Dans le cadre des gangliosidoses à GM2, il s'agit du déficit en HexA, permettant normalement l'hydrolyse de la particule N-AcetylGalactosamine, qui entraîne l'accumulation de GM2 causant les principaux signes cliniques, et pouvant aller jusqu'à 500 fois la concentration normale (2). L'accumulation de GA2 se voit également, et correspond à environ 10 % de la quantité de GM2 accumulée pour la maladie de Tay-Sachs, mais peut aller jusqu'à 50 % de la quantité de GM2 pour la maladie de Sandhoff et le variant AB (2).

Alors que la sous-unité β ne peut hydrolyser que des composés neutres, la sous-unité α peut hydrolyser aussi bien des composés chargés négativement (comme les GM2), que des substrats neutres, même si elle présente une préférence pour les premiers (52).

Les pertes de fonction de l'HexA peuvent donc être causées par des mutations d'un seul des gènes codant pour une des sous-unités, ou par des mutations du gène codant pour son cofacteur, la GM2-AP.

La maladie de Tay-Sachs, de Sandhoff ainsi que la gangliosidose à GM2 variant AB sont toutes de transmission autosomique récessive.

Le « gold-standard » pour le diagnostic de ces maladies est la mesure *in vitro* d'activité enzymatique des hexosaminidases A et B, sur sérum ou leucocytes, en utilisant un substrat synthétique neutre, le 4-methylumbelliferyl- β -N-acetylglucosaminide (MUG). Cependant, l'utilisation d'un tel substrat présente deux problèmes :

- incapacité à détecter les déficits en HexA dues à un déficit en GM2-AP, car le substrat est déjà hydrosoluble ;
- incapacité à détecter les variants B1, du fait de la charge neutre du substrat (forme décrite plus bas).

De ce fait, le dosage d'activité enzymatique est fait en pratique avec deux substrats :

- le MUG, non spécifique et neutre, permettant d'évaluer l'activité enzymatique couplée des hexosaminidases A et B ;
- le 4-methylumbelliferyl- β -N-acetylglucosaminide-6-sulfate (MUGS), composé anionique et donc spécifique de l'HexA, permettant d'évaluer son activité séparément.

Cependant, les composés étant synthétiques et hydrosolubles, un déficit enzymatique d'HexA par absence de GM2-AP n'est pas visible. Devant une forte suspicion de gangliosidose à GM2, même devant une activité enzymatique normale, l'analyse du gène codant pour la GM2-AP est donc essentielle.

Une revue de la littérature de 2020 (8) a référencé à partir de HGMD (The Human Gene Mutation Database) 181 variants pathogènes pour le gène *HEXA*, 103 pour le gène *HEXB* et 9 pour le gène *GM2A*, codant respectivement pour la sous-unité α , β , et la GM2-AP.

II.4.1. Mutations du gène *HEXA* et maladie de Tay-Sachs

Avant la mise en place des campagnes de dépistage dans la population juive Ashkenaze, l'incidence de la maladie de Tay-Sachs était d'environ 1/3600 naissances vivantes, mais celle-ci a été réduite de plus de 90 % depuis les années 1990 (5,33). Dans la population générale, l'incidence est environ 100 fois moins élevée (3,53) : la fréquence des patients porteurs est de 3,2 % dans la population juive Ashkenaze contre 0,39 % dans la population générale (2).

La mutation la plus fréquemment rencontrée (>70 %) chez les Ashkénazes, est une insertion de 4 nucléotides dans l'exon 11 (*HEXA*:c.1274_1277dup:p.Tyr427Ilefs*5 ; rs387906309) (54), entraînant un décalage du cadre de lecture et un codon-stop prématuré. La seconde mutation la plus fréquente dans cette population est la *HEXA*:c.1421+1G>C (rs147324677), entraînant une perte du site d'épissage (5).

La mutation la plus fréquente dans la population canadienne d'origine française est la *HEXA*:c.-207-2357_253+5128delinsG (ou NC_000015.10:g.72370592_72378536delinsC ; nssv1415009/nsv513781), correspondant à une délétion de 7,9 kb, emportant la région promotrice ainsi que l'exon 1 (55).

Les mutations classiques du gène *HEXA* entraînent une incapacité de l'enzyme à hydrolyser les composés anioniques (comme le GM2) et neutres, car la structure finale de l'enzyme et la dimérisation sont altérées. Il existe cependant des mutations affectant seulement l'activité de l'HexA envers les composés anioniques, sans perturbation de sa structure : il s'agit du variant B1 (56). Ce variant donne plutôt une forme juvénile, avec des symptômes neurodégénératifs précoces est un décès entre 20 et 30 ans. La mutation la plus fréquente du variant B1 est la *HEXA*:c.533G>A:p.Arg178His (rs28941770), dont la plus haute incidence est retrouvée au Portugal (0,84 pour 100 000 naissances vivantes (57)). Afin de le diagnostiquer, un composé anionique doit être utilisé, comme le MUGS.

Deux mutations particulières présentes dans la population juive Ashkénaze (*HEXA*:c.739C>T:p.Arg247Trp, rs121907970 ; *HEXA*:c.745C>T:p.Arg249Trp, rs138058578) donnent ce que l'on appelle des pseudodéficits en HexA (58). Il s'agit d'un phénomène purement *in vitro*, où l'hexosaminidase A est incapable d'hydrolyser le substrat synthétique, donnant ainsi une activité enzymatique effondrée, mais sans que sa fonction *in vivo* soit altérée. Environ 35 % des individus non-juifs et 2 % des Juifs Ashkenazes considérés comme porteurs hétérozygotes ont en réalité un allèle pseudodéficitaire (5).

Pour finir, la mutation la plus représentée dans les formes adultes de Tay-Sachs, et présente dans la population juive Ashkenaze, est la *HEXA*:c.805G>A:p.Gly269Ser (rs121907954) (59,60).

II.4.2. Mutations du gène *HEXB* et maladie de Sandhoff

Contrairement à la maladie de Tay-Sachs, il n'existe pas de groupe ethnique avec une fréquence particulièrement élevée de mutations du gène *HEXB* (2,61). En revanche, l'incidence de la maladie est légèrement plus élevée dans certaines régions géographiques isolées, comme dans la province de Córdoba en Argentine (*HEXB*:c.445+1G>A (62)), au Liban ou dans le Nord de la Saskatchewan, au Canada (61,63). L'incidence en population générale est moins élevée que pour la maladie de Tay-Sachs, avec 1/422 000 naissances vivantes (3,50).

En plus de l'accumulation de GM2 causant les principaux symptômes neurologiques, il existe aussi une accumulation de globosides, entraînant des viscéromégalies, notamment hépatiques et cardiaques (1,64).

La mutation la plus fréquente est une large délétion de 16 kb (nsv513799), débutant environ 2 kb avant le premier exon et finissant 1,5 kb après l'exon cinq, et représentant entre 27 % et 30 % de l'intégralité des allèles donnant une maladie de Sandhoff (2,61). Cette délétion est associée à des formes infantiles, et il existe une autre délétion, plus large, de 50 kb (RCV000004087.2 / VCV000003883.1), débutant environ 25 kb avant le premier exon et englobant les six premiers exons du gène, aussi associée aux formes infantiles, et souvent confondue avec la première (65). Pour les formes adultes, la mutation la plus fréquemment retrouvée serait la *HEXB*:c.1514G>A:p.Arg505Glu (rs121907983) (66).

II.4.3. Mutations du gène *GM2A* et variant AB

Il s'agit de la gangliosidose à GM2 la plus rare, avec moins d'une trentaine de cas dans la littérature, et il n'y a actuellement aucune forme adulte décrite (1). La revue de la littérature des différents cas ainsi que des mutations de ce gène seront présentées plus loin dans la discussion.

Gène	Sous-unité	Protéine déficitaire	Pathologie
<i>HEXA</i>	α	HexA	Tay-Sachs
<i>HEXB</i>	β	HexA HexB	Sandhoff
<i>GM2A</i>	/	GM2-AP	Variant AB

Tableau 1 : Gènes mutés dans les gangliosidoses à GM2 et leurs conséquences.

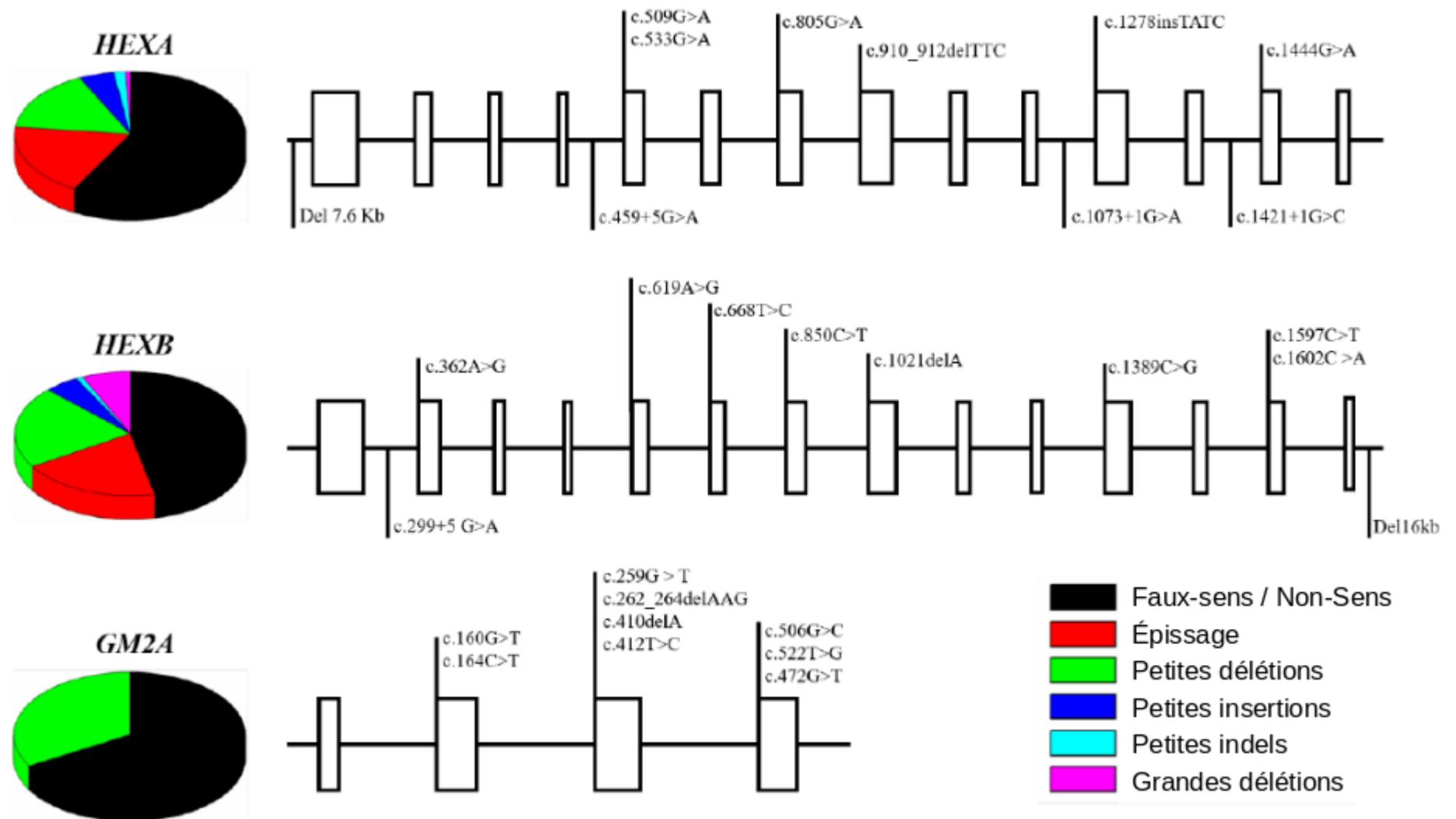


Illustration 7 : Principales mutations des gènes *HEXA*, *HEXB* et *GM2A* (Leal et al., 2020).

II.5. Physiopathologie

En cas de dysfonction de l'HexA, les GM2 s'accumulent au sein des lysosomes, donnant des ultrastructures appelées « corps cytoplasmiques membraneux », provoquant la vacuolisation des cellules, leur gonflement, puis à terme leur apoptose en induisant un stress au niveau du RE. L'accumulation du GM2, mais pas du GA2, provoque une apoptose PERK médiée (PKR-like endoplasmic reticulum kinase), qui active le facteur de transcription CHOP (C/EBP homologous protein), induisant une apoptose mitochondriale (8). Alors que l'accumulation se fait principalement dans les neurones du système nerveux central (SNC), elle se produit aussi dans les neurones des systèmes nerveux périphérique et autonome, bien que leur implication en clinique soit moindre (1). Hormis dans la maladie de Sandhoff où une accumulation de globosides est présente, il n'y a pas de manifestation extra-neurologique aux autres gangliosidoses à GM2.

En parallèle, les coupes histologiques effectuées sur des cerveaux de patients atteints de gangliosidoses à GM2 ont permis de retrouver des signes de neuro-inflammation, considérée comme une réponse à la dysfonction des radeaux lipidiques, mais aussi due à l'excès de présentation antigénique du GM2 via le CD1 à la surface des neurones (1).

La neuro-inflammation participe à la mort cellulaire neuronale, avec notamment un excès de TNF- α et d'IL1- β retrouvé, ainsi qu'une immunoréactivité accrue contre le CMH II. L'invasion de la microglie par les cellules du système immunitaire est aussi stimulée par les astrocytes, sécrétant des chemokines (CCL2 et CXCL10), et entraînant une démyélinisation par destruction des oligodendrocytes, un mécanisme fréquemment observé dans les formes infantiles.

Une corrélation existe entre le niveau d'activité résiduelle de l'hexosaminidase A et la sévérité des signes cliniques rencontrés. Une activité résiduelle entre 10 et 20 % est compatible avec une vie normale, et les patients hétérozygotes pour des mutations pathogènes des gènes *HEXA* ou *HEXB* ont un taux d'activité diminué d'environ 50 % par rapport à des patients normaux. Ainsi, plus l'activité de l'hexosaminidase A est faible, plus tôt se manifesteront les symptômes neurologiques, donnant lieu aux trois formes cliniques qui se retrouvent dans toutes les gangliosidoses à GM2 :

- infantile : la plus précoce et la plus sévère, aussi appelée forme aiguë ;
- juvénile : d'évolution variable, aussi appelée forme subaiguë ;
- adulte : la moins sévère, aussi appelée forme chronique.

- Homozygotes Sauvages
- Hétérozygotes Mutés
- Forme Adulte
- Forme Juvénile
- Forme Infantile
- ▲ Variant AB

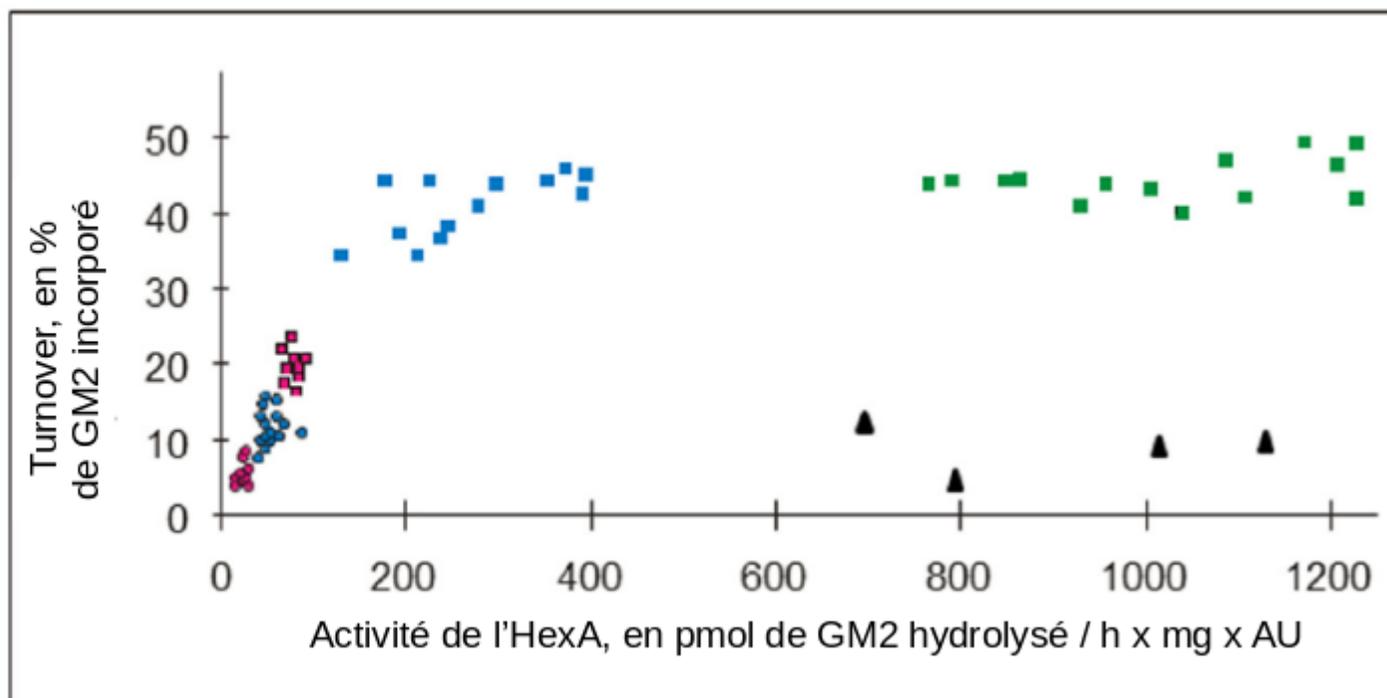


Figure 1 : Corrélation entre l'activité résiduelle de l'hexosaminidase A (mesurée sur des fibroblastes en culture avec du GM2 radiomarqué) et les formes cliniques de gangliosidoses à GM2 (Sandhoff et al., 2013).

II.6. Les différentes formes cliniques

II.6.1. Forme infantile

La forme infantile, ou forme aiguë, est la plus sévère des trois présentations cliniques, avec un début des symptômes en moyenne vers 5 mois, et un décès avant l'âge de 5 ans dans 75 % des cas (67).

Environ la moitié des patients ont un développement psychomoteur initial normal, avec des acquisitions survenant dans la norme d'âge attendue.

La principale manifestation neurologique est un arrêt du développement psychomoteur normal (>80 % des cas), avec une réaction de sursaut exagérée au bruit (hyperacousie) et une hypotonie (environ 60 % chacun). La présence d'une tache rouge cerise maculaire, due à l'accumulation de gangliosides dans les cellules ganglionnaires de la rétine, apparaît dans les trois premiers mois de vie, et est constante. Les fibres optiques se détériorent, et la cécité s'installe en moyenne entre 15 et 20 mois.

Puis, dans l'année suivant les premiers symptômes, s'ensuit une régression psychomotrice, avec perte des facultés acquises, telles que la capacité à se tenir assis sans aide ou aller chercher un objet.

Enfin, des spasticités, principalement des membres inférieurs, surviennent, et des crises d'épilepsies pharmaco-résistantes touchent la quasi-totalité des patients. Des inhalations peuvent survenir, et entraînent le décès dans environ un quart des cas.

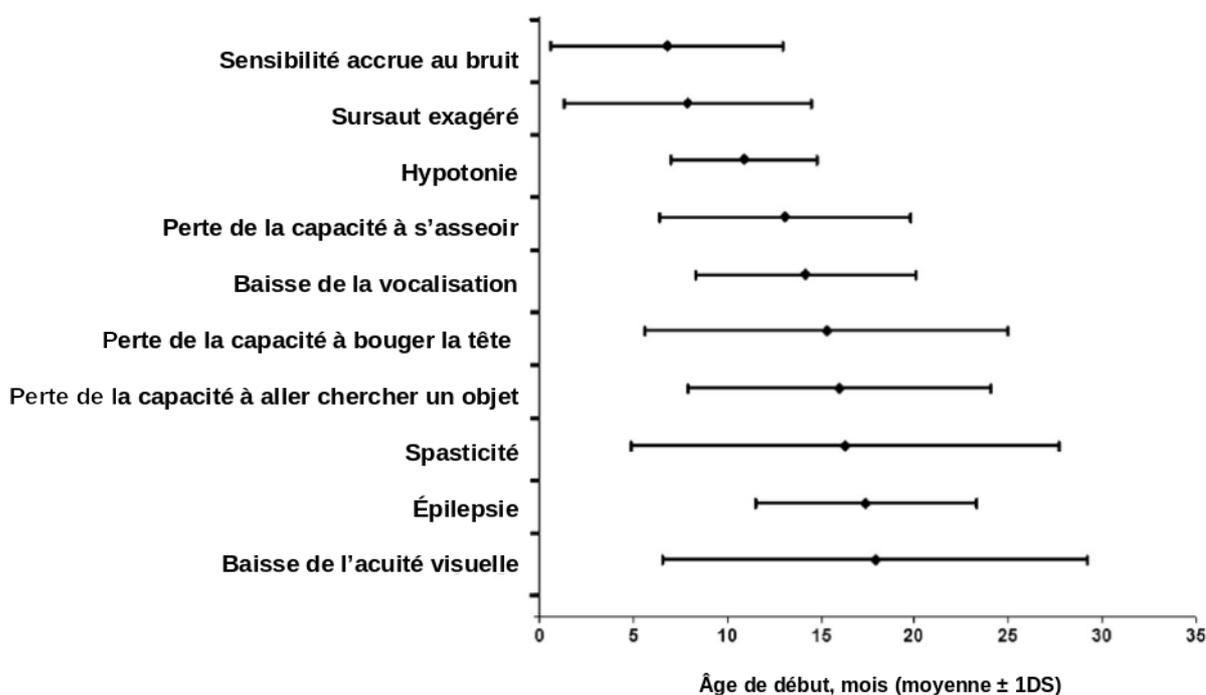


Figure 2 : Âge de survenue des symptômes dans les formes infantiles de gangliosidose à GM2 (Bley et al., 2015).

On peut également observer une macrocéphalie ainsi que des pieds bots varus équins, et bien que la dysmorphie faciale ne soit pas classique, certains patients peuvent présenter un front proéminent avec une arête du nez aplatie et un hypertélorisme (68).

Sur le plan génétique, les formes infantiles sont fréquemment dues à des délétions ou des mutations (non-sens ou frameshift) homozygotes, entraînant l'absence complète d'une des sous-unité de l'HexA ou du cofacteur GM2-AP.

II.6.2. Forme juvénile

La forme juvénile, ou subaiguë, débute plus tardivement avec un âge moyen de survenue de 5 ans (4). Classiquement, on ne retrouve pas d'hypotonie néonatale ou de tache maculaire rouge cerise comme dans la forme infantile, bien que des atrophies des nerfs optiques puissent survenir, mais plutôt des signes d'atteinte cérébelleuse et une détérioration neurologique motrice. Presque la moitié des patients décèdent avant l'âge de 10 ans, mais certains peuvent vivre jusqu'à l'âge adulte. La principale cause de décès est la survenue d'une infection bronchopulmonaire (43,4 %).

Les premiers signes cliniques sont des troubles de la marche dans un peu plus de la moitié des cas, des troubles du langage et de la coordination pour un peu plus d'un tiers, et un déficit intellectuel pour un peu moins d'un tiers des cas. Des troubles psychiatriques peuvent aussi être présents.

Le délai moyen de survenue des signes pyramidaux ainsi que de la nécessité d'un appui pour la marche est de 3,5 ans après les premiers signes cliniques, et un tiers des patients ont recours à un fauteuil roulant. Les troubles du langage évoluent en anarthrie en un peu plus de 5 ans en moyenne. Les crises d'épilepsie surviennent dans un peu moins de 40 % des cas.

Contrairement aux formes infantiles où la distinction clinique de la maladie de Tay-Sachs et de Sandhoff est difficile, on peut observer certains signes prédominants dans une forme ou dans l'autre. Chez les patients Tay-Sachs, dysphagie et incontinence surviennent sensiblement plus tôt, alors que chez les patients Sandhoff, on observe une hypotrophie musculaire plus précoce, ainsi qu'une plus forte fréquence des troubles psychiatriques.

Sur le plan radiologique, les IRM cérébrales réalisées retrouvent une atrophie cérébelleuse dans 42,8 % des cas, et une atrophie corticale généralisée dans 20 % des cas. Les anomalies de la substance blanche peuvent se voir, mais des hyper-signaux de la substance grise ne sont en revanche pas rapportés, contrairement aux formes infantiles.

Sur le plan génétique, certains variant sont plus associés à un profil évolutif. Par exemple, la mutation *HEXA*:p.Arg178His (variant B1) est associée à un âge de survenu précoce et une évolution rapide.

II.6.3. Forme adulte

Les formes adultes sont très certainement sous-diagnostiquées, car ce sont les plus variables en termes de phénotype.

Jusqu'à 40 % des patients peuvent présenter des troubles psychiatriques, isolés ou non, tels que des épisodes maniaco-dépressifs ou des psychoses. Les déficits moteurs prédominent sur les membres inférieurs, principalement sur les psoas et quadriceps, avec atrophie musculaire, crampes et fasciculations. Environ la moitié des patients sont à terme en fauteuil

roulant. Les membres supérieurs, en particulier les triceps, sont également touchés, mais à moindre mesure.

Une ataxie spinocérébelleuse est fréquente, avec un élargissement du polygone de sustentation et un nystagmus. L'IRM cérébrale peut montrer une atrophie cérébrale et cérébelleuse, bien qu'elles ne soient pas proportionnelles à l'atteinte clinique.

La dysarthrie est classique, avec un débit de parole soit rapide et pressé, soit plutôt étranglé, en lien avec une dystonie laryngée. Malgré cela, les inhalations et dysphagies sont des évènements rares (5).

Pour finir, ces patients semblent avoir une espérance de vie normale, avec le patient le plus âgé décédé à l'âge de 76 ans (1), mais ont cependant un déclin cognitif progressif.

La revue de la littérature des formes adultes de gangliosidoses à GM2 est présentée dans la discussion.

III. Présentation du patient

III.1. Histoire de la maladie

Notre patient est un jeune homme né en 1998, qui a consulté dans le service de génétique à l'âge de 22 ans pour l'exploration d'une ataxie spinocérébelleuse associée à une neuropathie motrice.

Il avait tout d'abord été suivi pour un trouble de la marche vers l'âge de 10 ans à l'hôpital des enfants à Toulouse, où il avait été remarqué une inégalité de longueur des membres inférieurs associée à des pieds creux, une spasticité et une hypotrophie musculaire, ayant été mis en cause initialement dans les troubles de la marche. À ce tableau moteur s'associaient également quelques difficultés cinétiques avec une épreuve doigt-nez difficile et une dysdiadococinésie. Il a bénéficié d'une arthrodèse du pied gauche en décembre 2014 (soit à l'âge de 16 ans), avec par la suite une aggravation rapide de ses troubles neurologiques, notamment un déséquilibre plus marqué ainsi qu'une récupération motrice longue en post-opératoire, nécessitant la mise en place d'un appui bilatéral pour ses déplacements.

III.2. Données cliniques

L'examen neurologique réalisé en janvier 2016 montrait un steppage net bilatéral, avec marche possible sur terrain plat mais nécessitant l'aide d'un tiers (ou d'un déambulateur / de béquilles), sans chute, d'une durée d'environ 30-45 min correspondant à une distance de 1 km. La marche sur la pointe des pieds ou les talons lui était impossible, les demi-tours étaient difficiles, et il présentait un déficit de la ceinture pelvienne avec un signe du tabouret franc. Les réflexes ostéo-tendineux (ROTs) achilléens étaient absents, et les rotuliens étaient faibles. Il présentait également des orteils en griffe, et le maintien pieds-joints lui était impossible.

Au niveau des membres supérieurs, il présentait une lenteur d'écriture sans dyspraxie, ni dysgraphie, et sans déficit moteur. Les ROTs étaient présents et légèrement vifs, traduisant une note pyramidale.

On notait une amyotrophie des membres inférieurs en mollet de coq, ainsi que des interosseux des mains.

Il présentait des dyspraxies bucco-linguo-faciales, sans trouble des paires crâniennes associé. Un syndrome cérébelleux cinétique et statique était présent, avec notamment des épreuves doigt-nez et des marionnettes difficiles.

Par ailleurs, il n'a pas présenté de retard psychomoteur (marche acquise à 13 mois, mais décrit comme maladroit), ni de difficultés de développement. Il ne présentait pas non plus de dysphagie, de trouble de l'oculomotricité, de signe d'atteinte extra-pyramidale, ou de trouble sensoriel.

Il n'avait pas d'activité professionnelle et n'avait pas validé son Bac pro.

Il avait été réalisé par la suite en 2020 un bilan neuropsychologique, mettant en évidence une altération globale légère des fonctions cognitives associée à des difficultés de cognition sociale compatible avec des troubles autistiques. Les déficits portaient principalement sur la

mémoire (défaut de récupération des informations, stockage altéré) et sur les fonctions exécutives (ralentissement de la vitesse de traitement et déficit de la mémoire de travail verbale sur l'échelle de WAIS IV).

III.3. Contexte familial

Il est issu d'un couple non consanguin, en bonne santé, et il existe la notion d'une tante paternelle du côté de sa mère avec paraparésie ou diplégie étiquetée souffrance néonatale.

Il a un frère né en 1999, ne présentant pas de pathologie particulière.

III.4. Examens complémentaires

III.4.1. Conduction nerveuse

L'électromyogramme réalisé en septembre 2020 montrait une atteinte motrice pure aux quatre membres, avec nette prédominance aux membres inférieurs (amplitudes motrices effondrées aux membres inférieurs, diminution des amplitudes motrices et de la vitesse de conduction au niveau du nerf ulnaire, tracés neurogènes chroniques).

III.4.2. Radiologie

Une IRM cérébrale réalisée en 2017 (soit à l'âge de 19 ans) montrait une discrète atrophie du vermis cérébelleux et de légers hyper-signaux des cornes postérieures des ventricules latéraux, sans autre atteinte de la substance blanche corticale.

III.4.3. Biologie

Un dosage d'activité enzymatique des hexosaminidases A et B a été réalisé sur sérum en juillet 2020 au CHU Necker Enfants Malades à Paris :

- hexosaminidase A : 161 nmol/h/mL (normes 80-227 nmol/h/mL) ;
- hexosaminidase A+B : 429 nmol/h/mL (normes 468-927 nmol/h/mL).

Il n'a donc pas été retrouvé de déficit en HexA ni HexB, excluant le diagnostic de maladie de Tay-Sachs et de maladie de Sandhoff.

Un bilan métabolique avec notamment analyse des acides gras à très longue chaîne était revenu normal.

III.4.4. Génétique

Les analyses génétiques initiales, envoyées à l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière (panel NGS des paraplégies spastiques, contenant 65 gènes), n'avaient pas retrouvé de mutation causale.

Par la suite, il a été retrouvé sur le panel NGS des ataxies héréditaires, paraplégies spastiques et maladies neurodégénératives du CHU de Montpellier, réalisé en 2017 (résultats obtenus début 2020, 500 gènes explorés), deux mutations dans le gène *GM2A* (NM_000405, NP_00036) :

- c.79A>T:p.Lys27* ; variant hérité du père ;
- c.415C>T:p.Pro139Ser ; variant hérité de la mère.

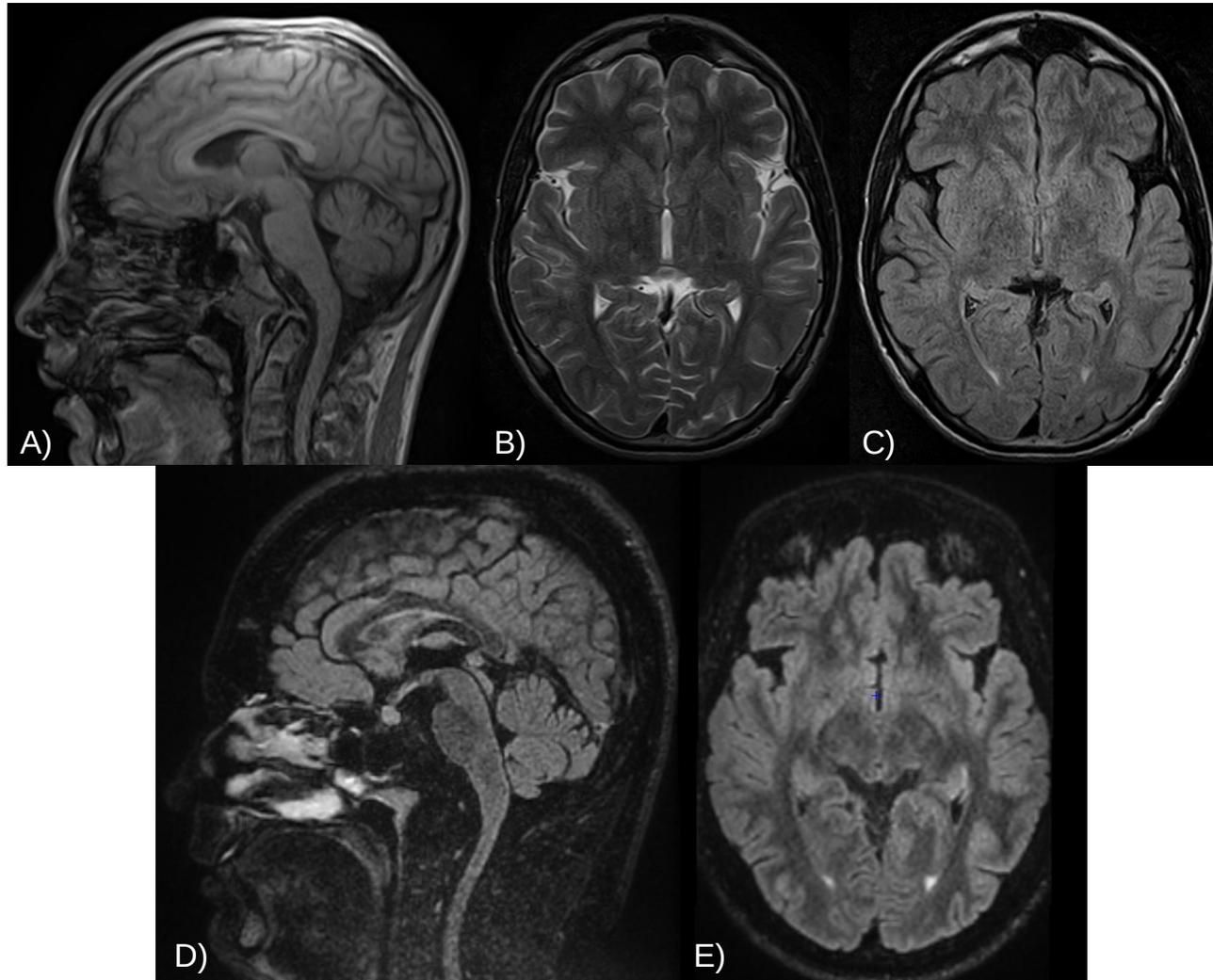


Illustration 8 : IRM Cérébrale de notre patient en 2011 avec une discrète atrophie du vermis cérébelleux en T1 (A) et de légers hyper-signaux des cornes ventriculaires postérieures en T2 et T2 FLAIR (B et C respectivement). Comparaison avec l'IRM cérébrale de 2017 en T2 FLAIR (D et E) : stabilité de l'atrophie du vermis cérébelleux, et persistance des hyper-signaux.

Ces deux mutations ont été confirmées par séquençage Sanger, chez notre patient et ses parents.

La première mutation (*GM2A:c.79A>T:p.Lys27**) correspond à une mutation non-sens précoce dans l'exon 1 du gène. Cette mutation tronquante survient avant le début du domaine de reconnaissance lipidique de la protéine, dans la structure pro-peptidique, et est donc incompatible avec une fonction conservée. Ce variant n'est pas retrouvé dans les bases de données de variations génomiques.

La deuxième mutation (*GM2A:c.415C>T:p.Pro139Ser*, rs767374072) est un variant faux-sens, situé dans l'exon 3 du gène et concerne le domaine de reconnaissance lipidique de la protéine. La proline est un acide-aminé très conservé (jusqu'au Zebrafish), codé par un codon triple C. La conservation de ces nucléotides, calculée via phyloP (score de conservation d'un seul nucléotide, permet également de calculer la « vitesse » d'évolution, un score >1.5 représente un nucléotide fortement conservé) est de 7.2 pour le nucléotide *GM2A:c.415C*. Les scores SIFT (Sorts Intolerant From Tolerant) et PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) ont été utilisés pour prédire la pathogénicité de la substitution : il s'agit de deux scores de prédiction de pathogénicité, le premier se basant plus sur la conservation des acides aminés au cours de l'évolution, et le second se basant plus sur l'impact potentiel d'une substitution sur la structure et la fonction de la protéine. Les scores étaient de 0.01 pour le SIFT (pathogène si score ≤ 0.05 (69)) et de 1 pour PolyPhen-2 (score allant de 0 à 1, 1 étant une prédiction « Probably Damaging » avec une forte confiance (70)). Nous avons également utilisé le score CADD (Combined Annotation Dependant Depletion, utilisable aussi bien pour les substitutions que les insertions/délétions (71)), et nous avons obtenu un score de 29.3, classant notre substitution parmi les 0,1 % les plus pathogènes. Ce variant existe en population latino-américaine (rs767374072, multiallélique) à une fréquence de $2,9 \times 10^{-5}$ et $8,6 \times 10^{-5}$ dans les bases de données gnomAD v2.1.1 et ExAC respectivement : il s'agit donc d'un variant extrêmement rare, absent des bases de données caucasiennes, et très fortement suspect d'entraîner un défaut de fonction de la protéine.

Bien que l'atteinte hétérozygote composite du gène *GM2A* soit compatible avec un tableau d'ataxie cérébelleuse d'aggravation progressive, l'évolution clinique de notre patient est étonnamment lente par rapport à ses pairs. En effet, bien que l'on puisse observer un retard diagnostic important dans les formes adultes de gangliosidoses à GM2, cette situation n'a pas été décrite pour les gangliosidoses dues à un déficit en GM2-AP : nous n'avons à ce jour dans la littérature que des cas d'atteinte juvénile ou infantile, avec comme tableau initial une hypotonie majeure, et de possibles crises d'épilepsie.

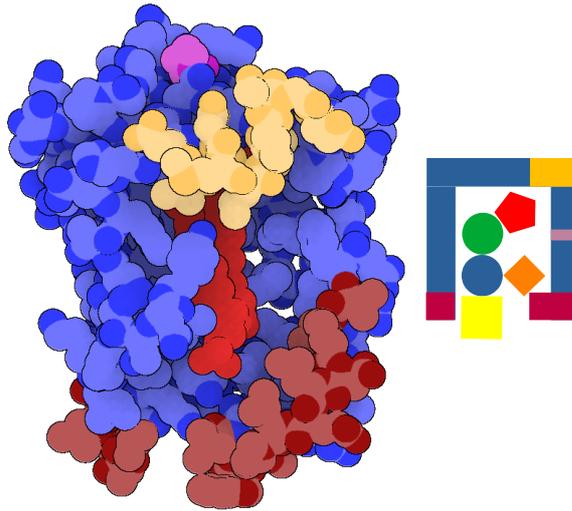


Illustration 9 : Représentation 3D de la protéine GM2-AP faite avec Protein Imager (<https://3dproteinimaging.com/protein-imager/>, Ref PDB : 1PUB). Le ligand hydrophobe est en rouge clair (céramide) sur la figure de gauche, et le GM2 est représenté en intégralité sur la figure de droite. Les boucles hydrophobes sont en rouge foncé, la zone d'interaction avec la sous-unité α est en jaune. La proline 139 mutée chez notre patient est représentée en violet.

Chez notre patient, l'atteinte initiale était relativement discrète, puisqu'il s'agissait principalement d'une inégalité de longueur des membres inférieurs accompagnée d'orteils en griffe et de spasticité, avec quelques signes d'atteinte cérébelleuse. Celle-ci ne s'est franchement aggravée qu'après l'opération orthopédique, vers l'âge de 16 ans.

Devant cette discordance entre les tableaux cliniques causés par le déficit congénital en GM2-AP et notre patient, nous avons décidé d'aller plus loin dans la caractérisation de sa maladie, en réalisant une étude fonctionnelle visant à déterminer la présence d'une accumulation de gangliosides GM2 au sein des lysosomes.

III.5. Consentement éthique

Le consentement du patient pour la publication d'éléments médicaux anonymisés le concernant est joint en annexe.

IV. Matériel et méthodes

IV.1. Choix du protocole expérimental

Nous avons choisi de réaliser une étude fonctionnelle en rapport avec l'accumulation de gangliosides GM2 pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la faisabilité des techniques : en effet, une biopsie cutanée avec déjà été réalisée chez notre patient, et un culot de fibroblastes avait été cryoconservé. D'autre part, nous avons pu retrouver des études, y compris anciennes, étudiant le métabolisme des gangliosides sur des fibroblastes (72,73). Nous avons également vérifié sur le site GTEXPportal (<https://gtexpportal.org/home/>) l'expression tissulaire de GM2-AP dans les fibroblastes en culture, et celle-ci est légèrement plus élevée que dans les différentes structures du cerveau, excepté au niveau de la moelle épinière (C1) où elle est la plus forte.

Outre l'expression tissulaire de GM2-AP au sein des fibroblastes, nous avons également vérifié dans la littérature que les études aussi bien d'immunofluorescence (IF) que de microscopie électronique (ME) étaient réalisables et pouvaient mettre en évidence une accumulation de gangliosides en rapport avec le variant AB. Plusieurs études supportant la faisabilité de l'IF ont été retrouvées, y compris sur fibroblastes (74–76), ainsi que de la ME, mais aussi de l'extraction et la quantification d'ARN messager (77). D'autres supports ont également été testés dans la littérature, comme la recherche d'accumulation de GM2 dans le liquide céphalo-rachidien (78) par chromatographie, ou sur biopsie cérébrale post-mortem par ME (31). L'incorporation de GM2 radio-marqué dans des fibroblastes en culture (79) a été également testée, mais nous avons choisi de ne pas la réaliser devant la difficulté technique.

IV.2. Culture des fibroblastes

IV.2.1. Contrôles négatifs et patient

L'étude fonctionnelle a été réalisée sur des fibroblastes cryoconservés, issus d'une biopsie cutanée, que nous avons remis en culture pour notre patient, ainsi que pour 3 patients contrôles.

Nos patients contrôles ont été anonymisés, et étaient de sexe masculin et féminin afin de pallier un éventuel biais lié au sexe. Un seul de nos patients n'avait aucune pathologie particulière, l'un avait été prélevé pour exploration d'une vascularite inflammatoire, et l'autre pour exploration d'une sclérose tubéreuse de Bourneville. Il n'a pas été retrouvé dans la littérature d'altération de la physiologie des gangliosides dans ces pathologies. L'âge à la biopsie cutanée était respectivement de 12 ans, 15 ans et 19 ans. Notre patient a été noté GUI, et nos contrôles CHA, MAC et VAL.

La culture des fibroblastes a été réalisée après décongélation rapide du culot cryoconservé selon le protocole du service en vigueur, et toutes les cultures ont été réalisées dans du milieu Chang (CliniSciences, Nanterre, France, Ref T105-100ML) en présence d'antibiotique (Mélange Pénicilline-Streptomycine ; Sigma-Aldrich, Darmstadt, Allemagne, Ref P0781-20ML) dans un flacon de 25 cm² (Dutscher, Bernolsheim, France, Ref 055409), sous 5 % de

CO₂, à 37 °C dans un incubateur. L'ensemble des cultures et repiquages ont par la suite été réalisés avec 5 mL de milieu Chang par flacon.

La fréquence des repiquages et les changements de milieu dépendaient de la densité cellulaire des cultures et de leur confluence.

Par ailleurs, des cultures cellulaires sur lame LabTek (Dutscher, Bernolsheim, France, Ref 055072), en présence de 2mL de milieu Chang ont été réalisées pendant 24 h pour la microscopie électronique et l'immunofluorescence.

Les protocoles mis en œuvre dans le service de Cytogénétique, génétique médicale et biologie de la reproduction, sont joints en annexe.

IV.2.2. Contrôle positif

Les gangliosidoses à GM2 étant des maladies rares, nous n'avions pas à notre disposition des fibroblastes congelés appartenant à des patients atteints. Dans la littérature, des contrôles positifs ont été réalisés à partir de fibroblastes traités par l'Imipramine, un antidépresseur tricyclique commercialisé sous le nom de Tofranil®.

L'étude de Palmeri et al. (80) a comparé l'activité enzymatique de l'HexA après imprégnation pendant 24 h d'Imipramine et/ou de Dexaméthasone des fibroblastes en cultures : à une concentration de 10⁻⁴ M d'Imipramine, il ne restait alors que 40 % d'activité enzymatique pour l'HexA versus 88 % à la concentration de 2 × 10⁻⁹ M de Dexaméthasone. L'addition des deux produits à ces concentrations n'abaissait l'activité enzymatique qu'à 53 % de l'activité initiale. Une autre étude (81) supportait ces résultats, en montrant également la réversibilité de l'Imipramine.

L'existence d'un tel effet secondaire s'expliquerait par la modification de la charge ionique à la surface des lysosomes lorsque ceux-ci sont imprégnés de médicaments amphiphiles cationiques (CADs) : l'HexA ainsi que la GM2-AP étant chargées positivement, une diminution des charges négatives présentes à la surface des lysosomes perturberait leur fonctionnement (82). Dans cette étude, une réduction de l'activité de l'HexA de 66 % avait été mise en évidence à une concentration de 40 mM d'Imipramine, mais avec des conditions expérimentales mimant l'activité lysosomale *in vitro*, et non sur des cultures de fibroblastes.

L'Imipramine (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Allemagne, Ref I7379) a été utilisée à la concentration de 10 mM (20 µL par LabTek, pour obtenir une concentration finale d'Imipramine de 100 µM dans 2 mL de milieu Chang). Il s'agit là de la plus forte concentration efficace retrouvée dans les études. L'Imipramine (initialement en poudre) a été reconstituée dans du milieu PBS (Tampon Phosphate Salin) chauffé à 37 °C dans un bain-marie, du fait de la présence de cristaux dans la dilution. Nous avons également filtré la solution finale à l'aide d'un filtre Millex-FG (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Allemagne, Ref SLFG025LS), afin d'éviter la présence de cristaux dans le milieu de culture. Ainsi, la concentration finale a pu être inférieure à la concentration initialement prévue. Cependant, la concentration minimale efficace d'Imipramine dans le milieu de culture que nous avons pu retrouver dans la littérature était de 20 µM. Il aurait donc fallu atteindre une concentration inférieure à 2 mM, et il semble peu probable que nous ayons pu passer en deçà seulement sur la filtration.

Nous aurions pu choisir une autre alternative pour induire l'accumulation lysosomale de GM2, notamment en apportant du GM1 en grande concentration dans le milieu de culture,

afin de surcharger les capacités enzymatiques des fibroblastes. Cette approche a déjà été rapportée dans la littérature (83), en utilisant un milieu de culture enrichi avec des gangliosides de cerveau bovin (contenant du GM1, du GD1a/b, et du GT1), et a permis de mettre en évidence une importante accumulation de GM2 dans les fibroblastes de patients atteints (après 5 jours de culture à une concentration de 6 mg/15 mL), notamment de formes juvéniles de maladies de Tay-Sachs et de Sandhoff. Cependant, le GM1 peut se révéler toxique pour les fibroblastes s'il est mis au-delà des concentrations physiologiques rencontrées habituellement (84), et c'est pour cela que nous avons choisi l'Imipramine.

IV.3. Étude de l'expression génique du gène *GM2A* par RT-PCRq

L'expression génique du gène *GM2A* par RT-PCRq (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) a été étudiée pour évaluer l'impact des mutations sur la quantité de transcrits (ARNm).

L'extraction d'ARN a été réalisée selon le protocole du service joint en annexe et les recommandations du fournisseur, à l'aide du kit d'extraction miRNeasy Mini (Qiagen, Hilden, Allemagne, Ref 217004), à partir de deux flacons de cultures de fibroblastes pour chacun des contrôles, et de quatre flacons pour notre patient. La transcription inverse a été réalisée avec le kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen, Hilden, Allemagne, Ref 205311), selon les recommandations du fournisseur.

La PCR en temps réel a été réalisée avec le kit Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Allemagne, Ref 204074) et le thermocycleur Corbett Research RG-6000 (Corbett Research, Australie). Les amorces utilisées ont été élaborées manuellement à l'aide du logiciel Primer Blast (National Center for Biotechnology Information, Rockville Pike Bethesda, États-Unis), et fournies par la société Sigma-Aldrich. Leurs séquences sont disponibles en annexe.

La PCR en temps réel permet de mesurer la fluorescence émise par le SYBR Green à chaque fin de cycle de PCR. Cette intensité de fluorescence sert à la quantification génique (expression génique). Cependant, n'ayant pas de gamme de plasmide à notre disposition, la mesure de l'expression du gène *GM2A* ne peut se faire en quantification absolue. Nous avons donc décidé d'utiliser une méthode de quantification relative, en déterminant l'expression génique au cycle seuil (Ct), par la méthode des Δ Ct, après normalisation de la quantité de *GM2A* par rapport à celle de nos gènes de référence.

Les PCR ont été réalisées en duplicata pour les amorces *GM2A*, et en triplicata pour les amorces de chaque gène de référence.

Pour le choix des gènes de références, il est conseillé dans la littérature d'en choisir plusieurs (85,86), afin d'éviter un biais d'expression dû à un gène mal exprimé. Nous avons tout d'abord choisi les gènes *HPRT* (Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyltransferase 1, OMIM*308000#300322#300323) et *TBP* (TATA Box Binding Protein, OMIM*600075#607136#168600), car ils présentent un niveau d'expression similaire aussi bien dans les fibroblastes que dans les lymphocytes (86,87). De plus, *TBP* est stable dans les fibroblastes, y compris chez d'autres espèces que l'être humain (88). *GUSB* (Beta Glucuronidase, OMIM*611499#253220) est un gène également stable en expression dans les fibroblastes, y compris lors de leur vieillissement, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (89). Son niveau d'expression étant similaire dans les fibroblastes à celle de *TBP* et *HPRT*, nous avons décidé de l'inclure.

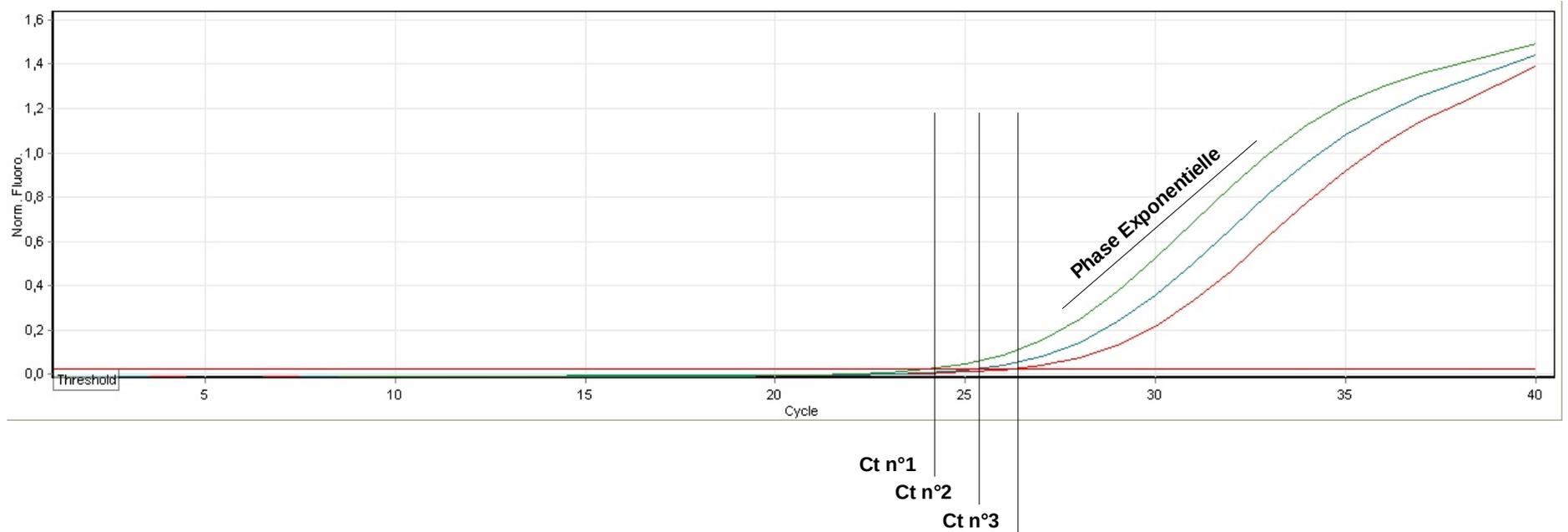


Illustration 10 : Méthode de détermination des Ct (Cycle Threshold ou Cycle Seuil) pour la PCR en temps réel. Les Ct correspondent à l'intersection entre le début de la phase exponentielle de la PCR et la ligne seuil. Au cycle seuil, les trois courbes ont toutes le même niveau de fluorescence, représentatif de leur quantité d'ADN respective, ce qui permet de les comparer.

IV.4. Étude de l'accumulation des gangliosides GM2

IV.4.1. Microscopie électronique

Nous avons observé au microscope électronique l'ultrastructure des fibroblastes cultivés de notre patient, d'un contrôle négatif et d'un contrôle positif (fibroblastes traités par Imipramine). Ces cultures ont été réalisées sur lames LabTek, comme décrit plus haut.

La microscopie électronique a été réalisée au laboratoire de Neuropathologie. Les fibroblastes en culture ont été fixés au glutaraldéhyde 2,5 % puis post-fixés au tétroxyde d'osmium (OsO₄) à 2 %. Ils ont ensuite été déshydratés par des bains successifs d'éthanol de concentration croissante avant d'être inclus dans la résine d'époxy.

Les coupes ultrafines ont été réalisées à l'ultramicrotome puis contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb. Les coupes disposées sur des grilles de cuivre ont été observées au microscope électronique à transmission JEOL JEM-1400 Flash du service de Neurologie, couplé à une caméra Morada G3 (Electron Optic Instrument, West Orange, New Jersey). Le microscope électronique à transmission possède un canon composé d'un filament de tungstène qui émet un faisceau d'électrons. Ce faisceau se focalise sur l'échantillon par l'intermédiaire de condenseurs et de lentilles électromagnétiques qui forment l'image. Puis celle-ci est projetée sur un écran fluorescent sensible aux électrons et qui émet une couleur verte dans le spectre visible.

IV.4.2. Immunofluorescence indirecte

L'immunofluorescence indirecte est une technique permettant de révéler la présence d'un antigène à l'aide de deux anticorps : un anticorps monoclonal spécifique de l'antigène (anticorps primaire), et un anticorps polyclonal marqué par un fluorochrome, fixant le premier anticorps (anticorps secondaire). L'avantage de cette technique est la réutilisation possible de l'anticorps secondaire marqué, réduisant ainsi les coûts.

L'anticorps primaire utilisé est un anti-GM2 monoclonal dérivé de souris, clone GMB28 (EMD Millipore Corporation, Temecula, États-Unis, Ref MABN2550-100UL). La concentration initiale était de 0,5 mg/mL et nous l'avons testé en utilisant quatre dilutions : 1:100, 1:200, 1:300 et 1:400.

Nous avons utilisé comme anticorps secondaire un Alexa Fluor 488 Goat anti-mouse IgM μ chain (Thermo Fisher Scientific, Oregon, États-Unis, Ref A21042), correspondant aux spectres d'émission dans le vert (515-525 nm). La concentration initiale était de 2 mg/mL et nous avons utilisé une dilution au 1:1000.

Les fibroblastes cultivés pendant 24 h sur lame LabTek ont été lavés 2 fois au PBS pendant 5 minutes, puis fixés avec 1 mL de paraformaldéhyde 4 % pendant 15 minutes, rincés 2 fois avec du PBS pendant 5 minutes et 1 fois pendant 10 minutes. Les fibroblastes étalés et fixés ont été conservés dans 1 mL de milieu PBS au réfrigérateur à 4 °C.

La perméabilisation des cellules a été réalisée avec du Triton X-100 à 0.1 % pendant 2 minutes, puis nous avons saturé la solution avec du BSA (Bovine Serum Albumine) 1 % pendant 45 minutes.

L'incubation avec l'anticorps primaire a été d'environ 16 h (une nuit complète), de même que l'incubation avec l'anticorps secondaire. Une contre-coloration des noyaux a été réalisée au DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole), agent intercalant émettant dans le bleu brillant (450-490 nm).

Les lames ont été conservées à 4 °C, dans l'obscurité.

Elles ont été observées à l'aide du microscope à épifluorescence Metafer (MetaSystems), et les images ont été capturées en utilisant le logiciel Isis (MetaSystems). Nous avons utilisé le filtre DAPI pour localiser les noyaux, et avons évalué l'intensité de fluorescence cytoplasmique des cellules à l'aide du filtre vert.

IV.4.3. Chromatographie couplée à une spectrométrie de masse en tandem

Le dosage des gangliosides dans le plasma est une technique mise au point et réalisée à Paris, à l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière. Elle se base sur une méthode de chromatographie en phase liquide avec spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS, sur l'Acquity UPLC couplée à un spectromètre TOD et une colonne UPLC BEH C18). Pour la validation de méthode, 14 échantillons patients et 50 échantillons contrôles (46 % de femmes, médiane d'âge 38,5 ans) ont été utilisés, issus de donneurs volontaires sains, sans différence de mesure de gangliosides entre les deux sexes (excepté le GM2 38:1, plus haut chez les femmes). Le sang a été prélevé sur tube EDTA, et 20 µL de plasma ont été mélangés avec deux phases mobiles différentes pour l'analyse (Formiate d'ammonium/méthanol d'une part, et isopropanolol d'autre part, Sigma Aldrich). Les contrôles bas et hauts ont été réalisés à partir de plasma témoin, mélangé à des solutions standards de gangliosides, issus de cerveaux bovins (GM3/GD3 d'Avanti Polar Lipids, Industrial Park Drive Alabaster, Alabama, États-Unis ; GM2 de Sigma Aldrich) ou de lait ovine (GM1 d'Avanti Polar Lipids). Les gangliosides obtenus par extraction (en utilisant l'éthanol pour la précipitation des protéines) en plus grandes quantités sont, dans l'ordre décroissant : GM3 34:1, GM3 36:1, GM3 42:1, GM2 36:1, GD2 34:1 et GM2 34:1. Les cut-offs déterminés optimaux pour la distinction des patients atteints de gangliosidose à GM2 étaient de 58,9 nM pour le GM2 34:1 et de 0,032 pour le ratio GM2 34:1 / GM3 34:1, permettant d'obtenir une sensibilité et une spécificité de 100 %. Cette technique a également été utilisée sur d'autres patients atteints de gangliosidose : Niemann-Pick A/B (n=3), Fabry (n=3), Gaucher (n=2), gangliosidose à GM1 (n=1), Krabbe (n=1) et Niemann-Pick C (n=3). Aucun de ces patients ne présentait une élévation de GM2 34:1 (Article en cours de publication : « Plasma GM2 ganglioside : a sensitive and specific biomarker for GM2-Gangliosidosis diagnosis, prognosis and disease monitoring. », Chloé MARCELINO, Ichraf KRAOUA, Yann NADJAR, Foudil LAMARI).

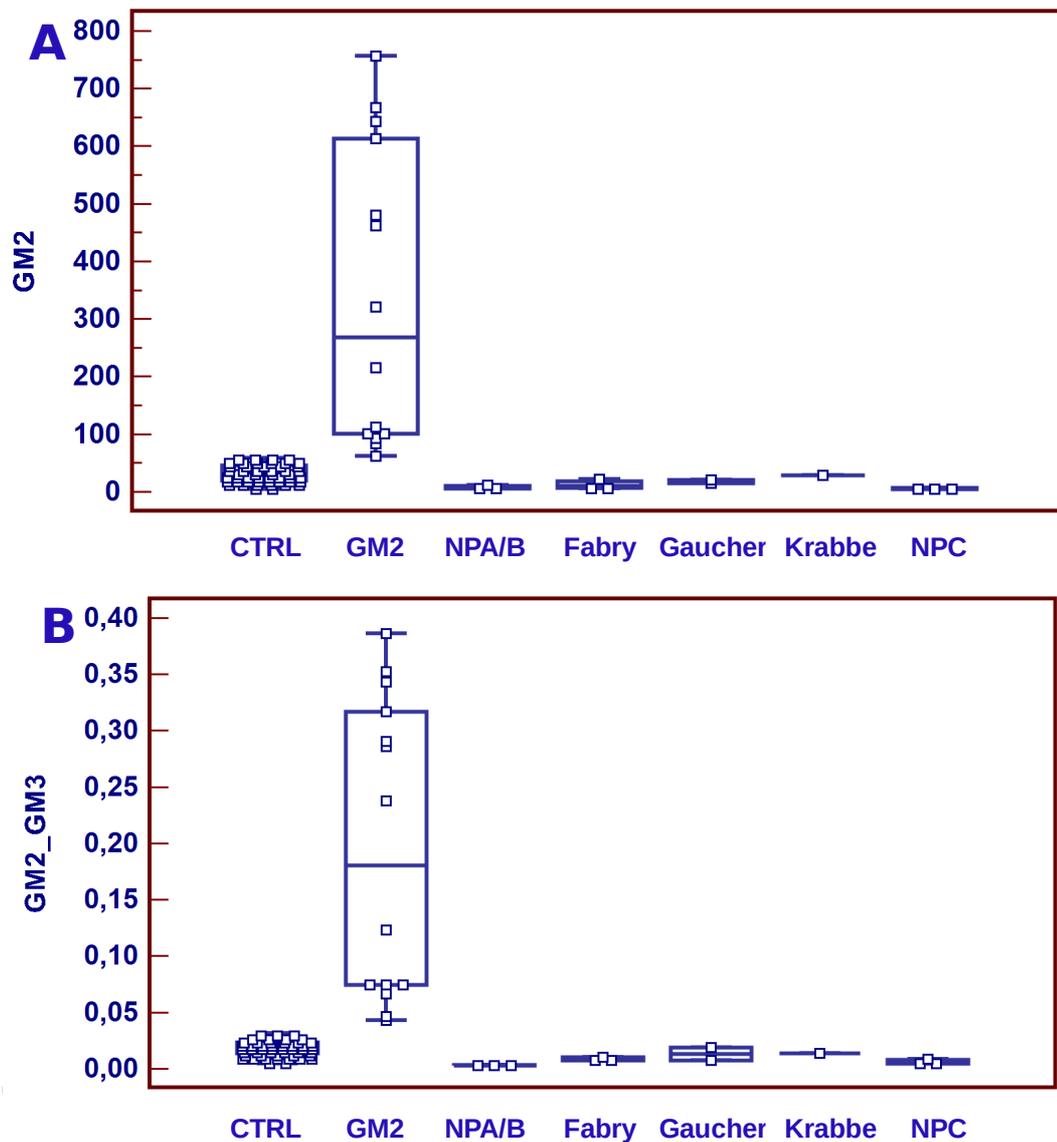


Figure 3 : Mesure de la concentration en GM2 et du ratio GM2/GM3 par LC-MS/MS dans différentes maladies de surcharge lysosomale.

V. Résultats

V.1. Expression génique du gène *GM2A*

V.1.1. Validation des amorces

Avant d'étudier notre patient, nous avons tout d'abord testé toutes nos amorces avec l'ADNc d'un de nos contrôles négatifs : les couples d'amorces TBP-E3E4 et TBP-E4E5, ainsi que l'amorce GM2A-E1E2-R1.2 n'ont pas permis d'obtenir un produit d'amplification, et nous ne les avons donc pas utilisés par la suite.

V.1.1.1. Gènes de référence

Nous avons dans un premier temps réalisé une analyse statistique de nos résultats afin de pouvoir valider les amorces des gènes de référence, en étudiant la dispersion des Ct obtenus.

La dispersion des Ct était faible pour les gènes *GUSB* et *HPRT*, aussi bien pour notre patient que pour les contrôles négatifs. En revanche, la dispersion des Ct pour le gène *TBP* était plus importante, avec un coefficient de variation de 5,2 % contre 4 % et 4,1 % pour les gènes *GUSB* et *HPRT* respectivement. Nous avons également réalisé une analyse de nos gènes de référence à l'aide du logiciel RefFinder (<https://www.heartcure.com.au/reffinder/>), qui classait *TBP* comme le moins stable, et *HPRT* comme le plus stable.

Nous avons donc décidé d'exclure *TBP* de la suite de l'analyse statistique.

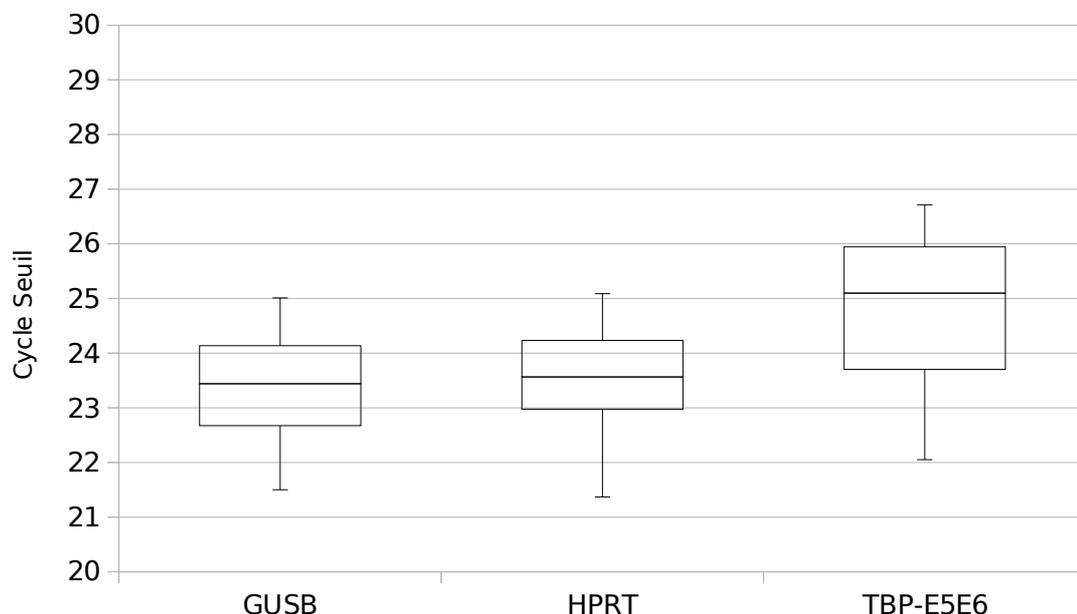


Figure 4 : Analyse de la dispersion des Ct de nos gènes de référence (*GUSB*, *HPRT* et *TBP*).

V.1.1.2. Gène *GM2A*

Nous avons également étudié la dispersion des Ct pour les quatre amorces retenues du gène *GM2A*. Nous avons exclu de la suite des analyses l'amorce GM2A-E1E2-FR2 du fait d'une trop grande variabilité par rapport aux autres amorces, avec un coefficient de variation de 3,9 % et 7 % pour notre patient et nos contrôles négatifs respectivement.

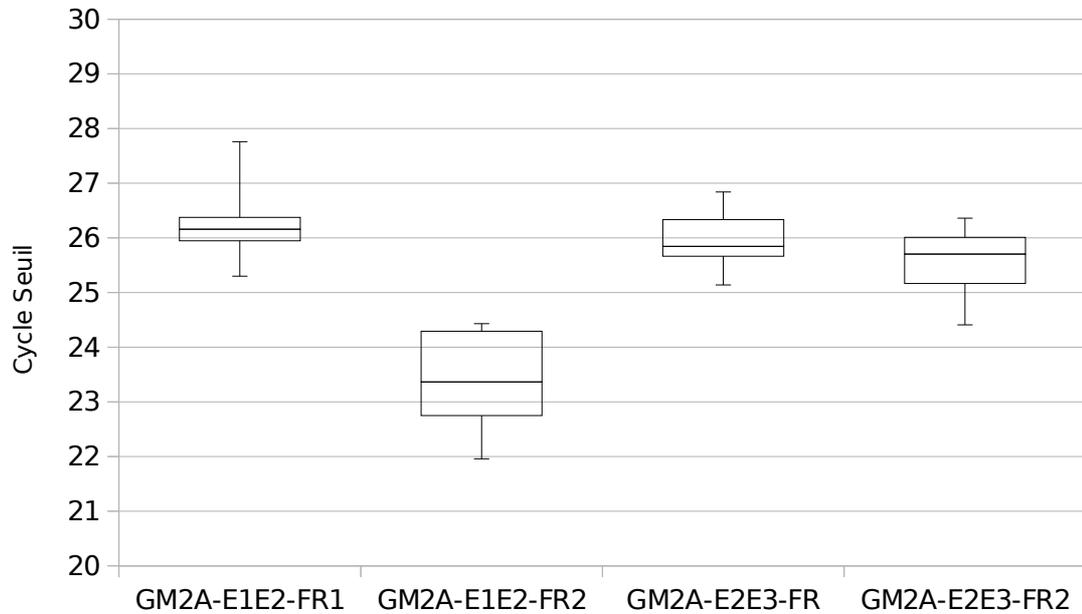


Figure 5 : Analyse de la dispersion des Ct pour les différentes amorces du gène *GM2A* chez notre patient.

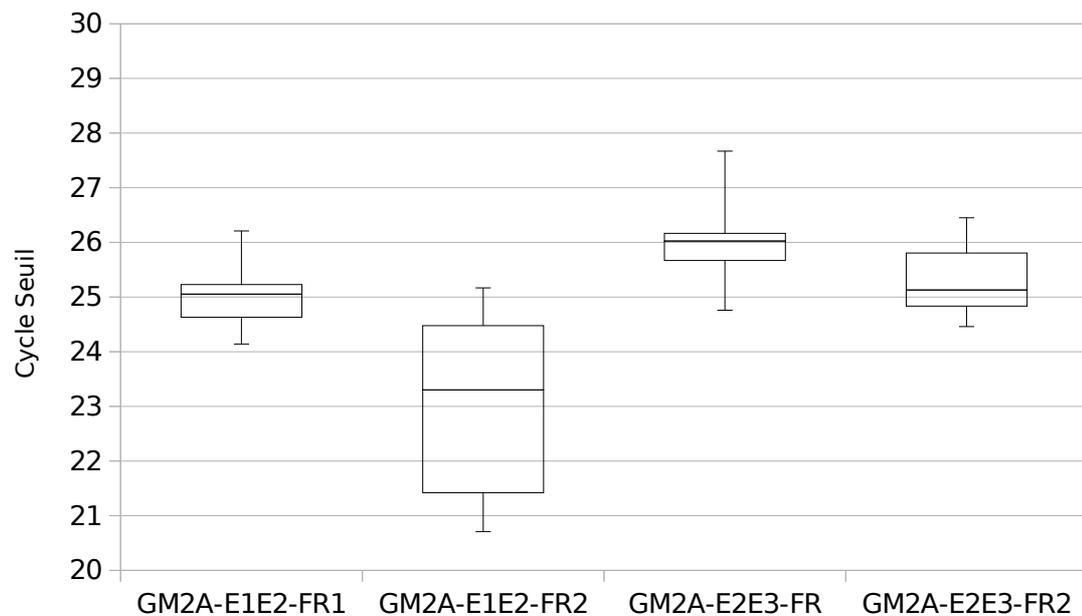


Figure 6 : Analyse de la dispersion des Ct pour les différentes amorces du gène *GM2A* chez nos contrôles négatifs.

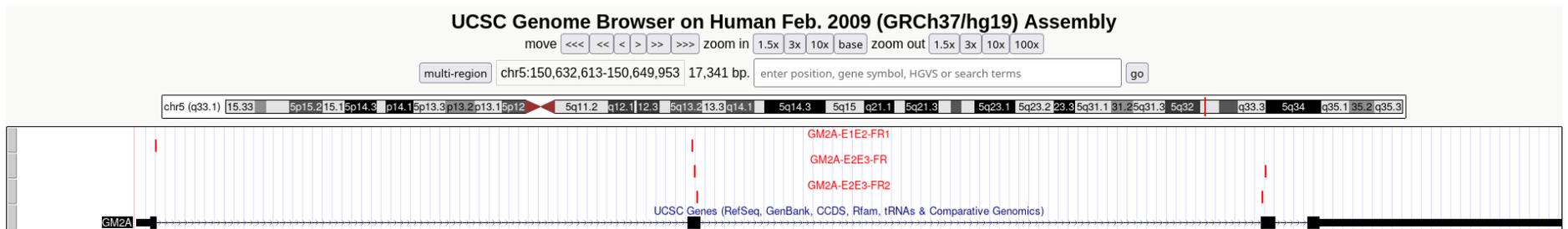


Illustration 11 : Emplacement des amorces retenues pour GM2A. Réalisé avec UCSC (<https://genome-euro.ucsc.edu/index.html>).

V.1.2. Résultats de l'expression génique

V.1.2.1. Méthode de calcul

L'expression génique a été déterminée en normalisant la quantité d'ADNc calculée du gène *GM2A* par rapport à celle des gènes de référence par la méthode des ΔCt ($2^{-(Ct \text{ gène} / Ct \text{ gène de référence})}$). Cette quantité normalisée (Q_N) ou expression génique a été calculée pour chaque run du patient (n=4) et des contrôles négatifs (n=6).

$$Q_N = \frac{Q \text{ Gène}}{Q \text{ Gène ref}} = \frac{2^{-Ct \text{ gène}}}{2^{-Ct \text{ gène ref}}} = 2^{-(Ct \text{ gène} - Ct \text{ gène ref})} = 2^{-\Delta Ct}$$

V.1.2.2. Méthode 1 : moyenne géométrique des Ct

Afin de gagner en précision pour l'expression génique, nous avons décidé d'utiliser à la place du « Ct gène ref », indiqué plus haut dans la formule des ΔCt , la moyenne géométrique des Ct des gènes de référence *GUSB* et *HPRT* (86).

De la même manière, nous avons décidé d'utiliser la moyenne géométrique des Ct des 3 couples d'amorces de *GM2A* sélectionnées (*GM2A-E1E2-FR1*, *GM2A-E2E3-FR*, et *GM2A-E2E3-FR2*), pour les différents runs du patient (n=4) et des contrôles négatifs (n=6).

L'analyse statistique des Q_N ainsi obtenus a été réalisée avec un test de Wilcoxon – Mann Whitney, sur le site BiostaTGV (<https://biostatgv.sentiweb.fr/>), et a permis de montrer une différence significative entre notre patient et nos contrôles négatifs (p-value = 0,038), avec des moyennes de Q_N respectivement de 0,459 [0,452-0,462] et 0,475 [0,462-0,485].

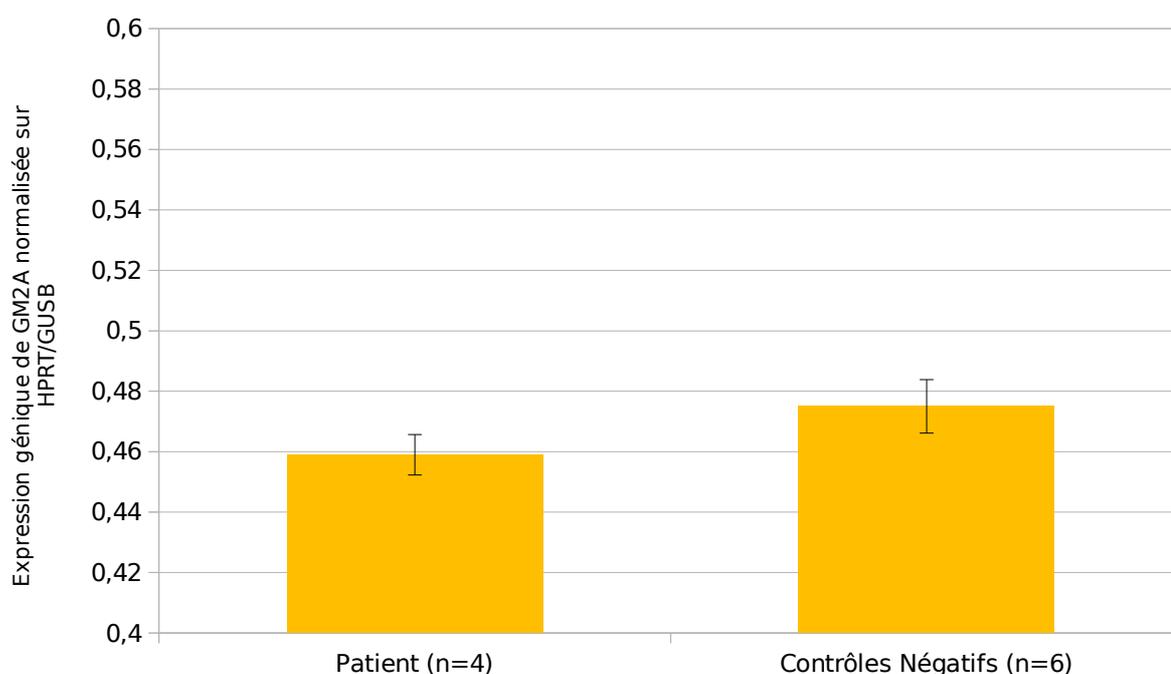


Figure 7 : Comparaison des Q_N obtenus par la moyenne géométrique des Ct.

V.1.2.3. Méthode 2 : moyenne géométrique des Qn

Nous avons également réalisé dans un deuxième temps une analyse statistique non pas en faisant la moyenne géométrique des Ct des amorces du gène *GM2A* avant le calcul des Qn, mais en calculant d'abord les Qn pour chaque amorce de *GM2A* séparément, puis en comparant la moyenne géométrique des Qn ainsi obtenues. Nous avons en revanche conservé l'utilisation de la moyenne géométrique des Ct pour nos gènes de référence, conformément aux recommandations de la littérature.

L'analyse statistique ne mettait alors pas en évidence une différence significative (p -value = 0,26) entre les Qn de notre patient et de nos contrôles négatifs, dont les moyennes des Qn étaient respectivement de 0,474 [0,433-0,495] et 0,488 [0,460-0,508].

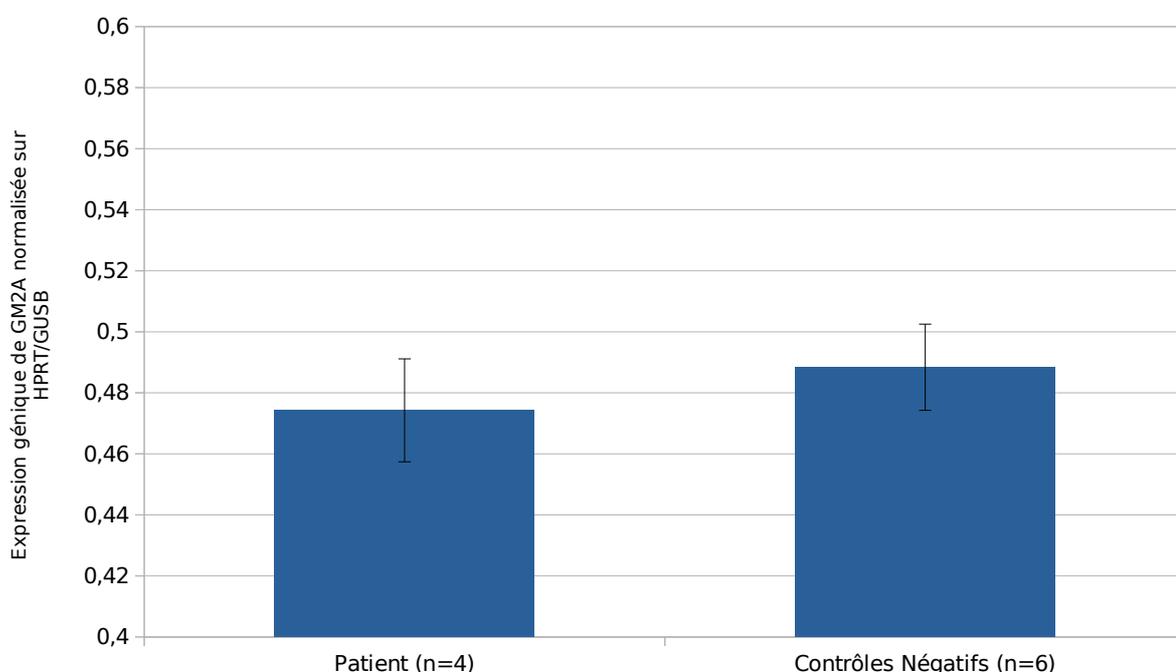


Figure 8 : Comparaison des Qn obtenus par la moyenne géométrique des Qn.

V.2. Étude de l'accumulation des gangliosides GM2

V.2.1. Microscopie électronique

Nous avons pu mettre en évidence la présence d'une accumulation de gangliosides dans les lysosomes de notre patient, sous forme d'inclusions lamellaires concentriques caractéristiques des pathologies associées à une accumulation de gangliosides (90), mais ne permettant pas cependant de différencier une maladie de Tay-Sachs ou un variant AB d'une maladie de Fabry.

Visuellement, notre contrôle positif présente sensiblement plus de lysosomes caractéristiques d'une accumulation de gangliosides, et comportant des inclusions lamellaires, mais nous ne sommes en revanche pas en mesure de différencier significativement notre patient et notre contrôle négatif.

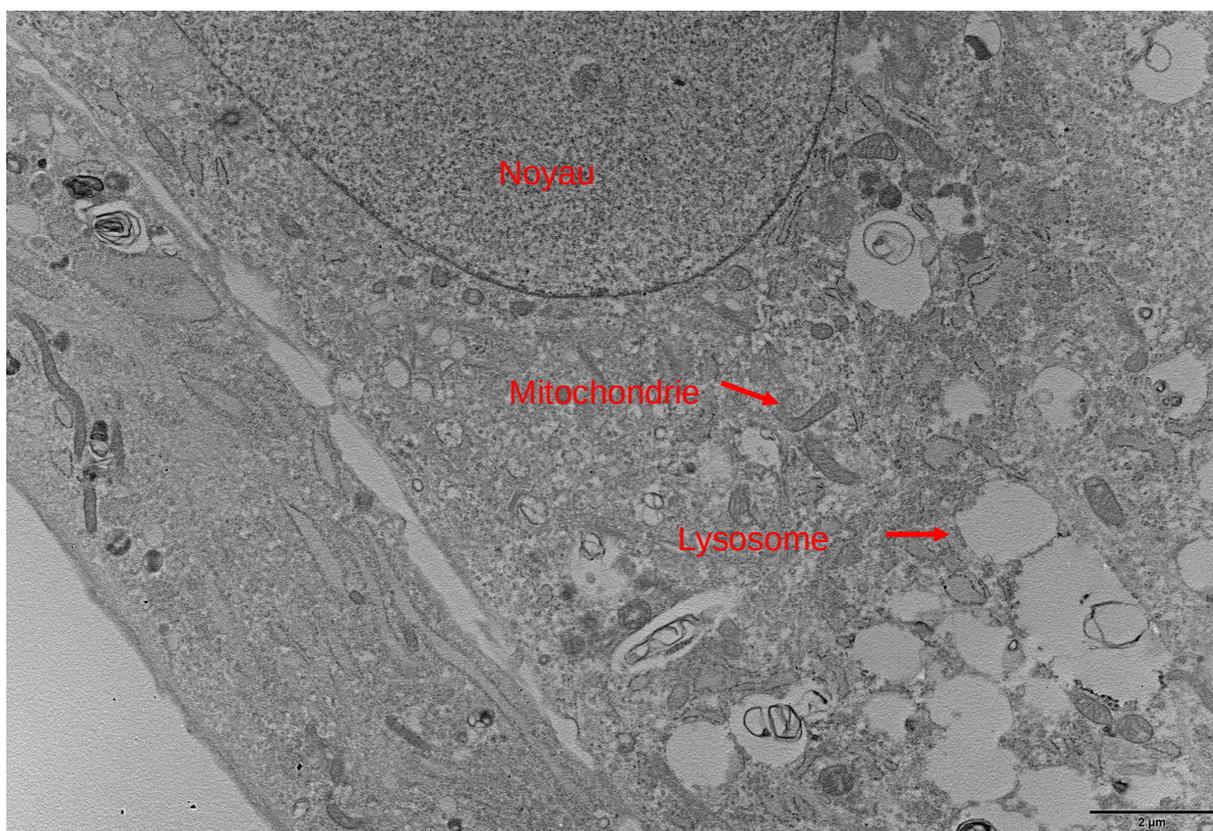


Illustration 12 : ME de notre contrôle négatif.

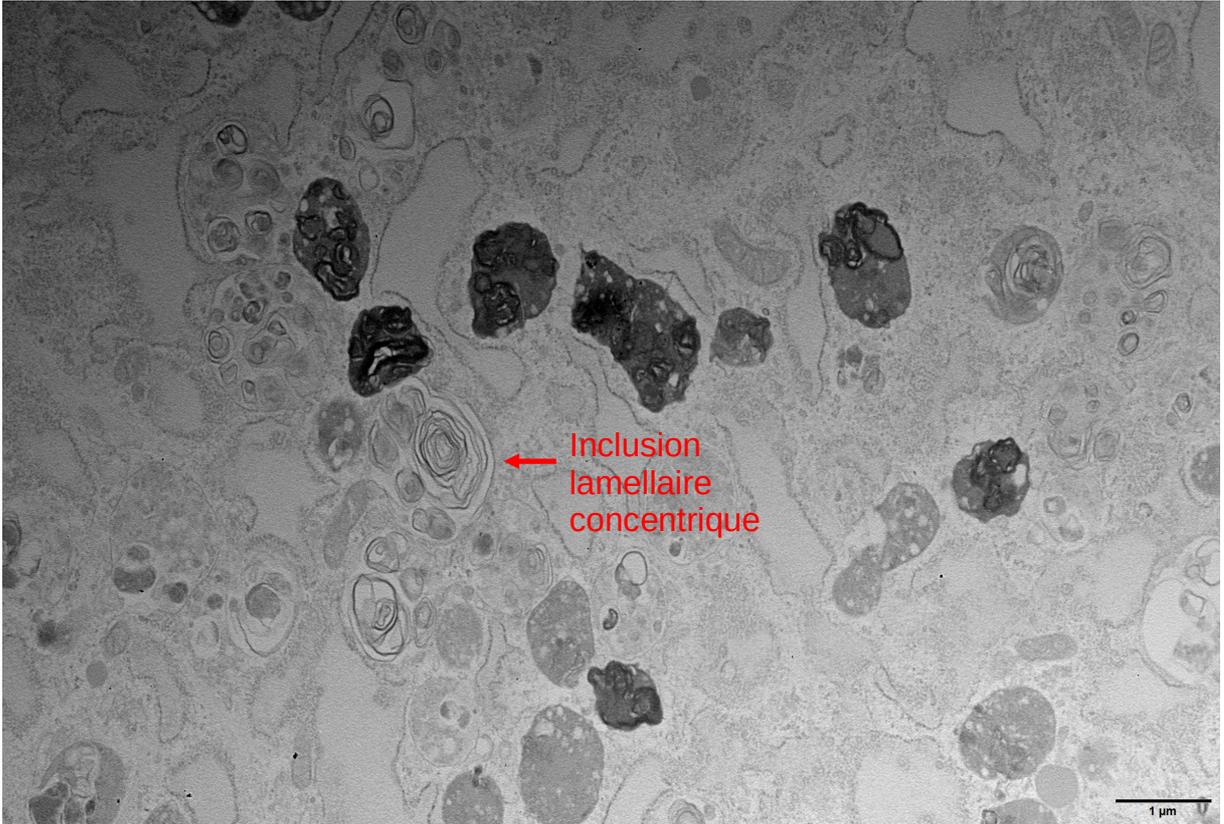


Illustration 13 : ME de notre contrôle positif.

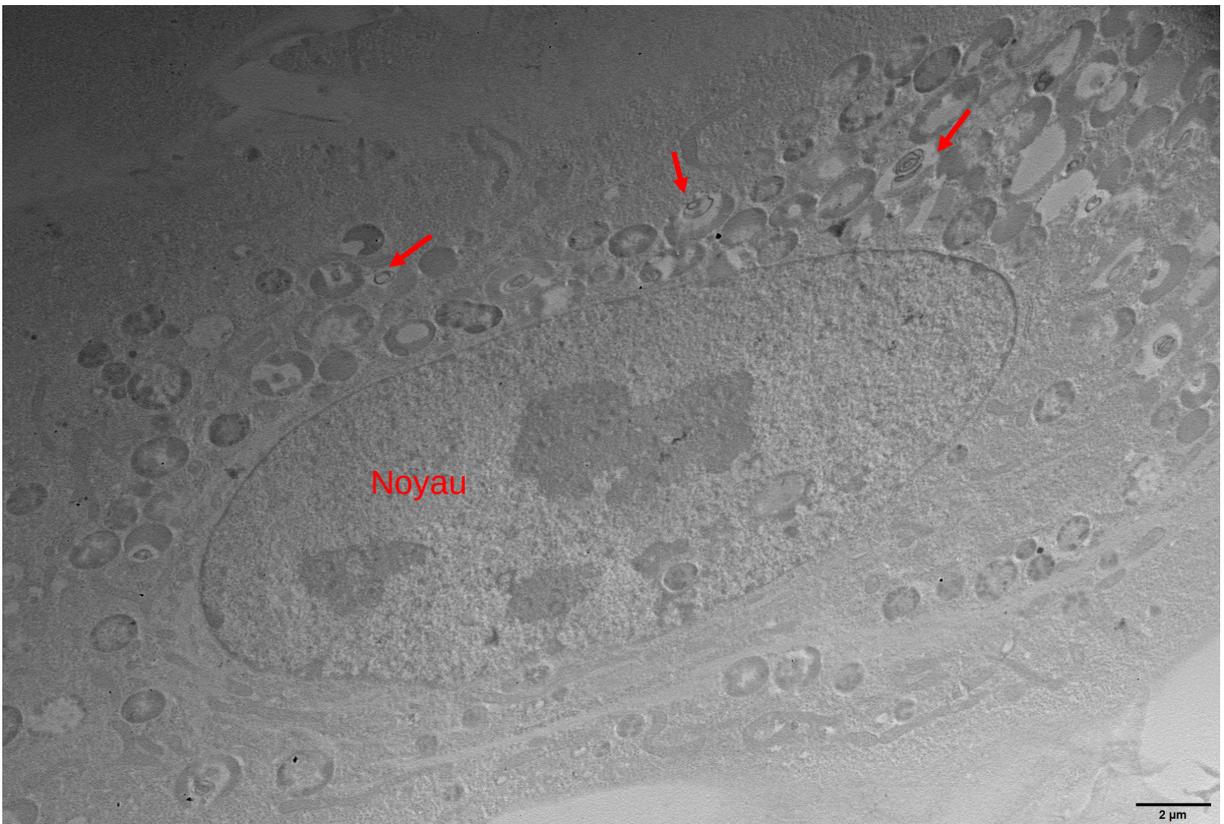


Illustration 14 : ME de notre patient, les inclusions lamellaires concentriques sont indiquées par des flèches rouges.

V.2.2. Immunofluorescence indirecte

Le marquage des fibroblastes a été réalisé avec 4 dilutions différentes de l'anticorps primaire anti-GM2 (1:100, 1:200, 1:300 et 1:400) pour le patient, le contrôle négatif et le contrôle positif.

Pour chaque lame marquée en IF, nous avons compté une centaine de cellules au microscope à épifluorescence, et avons calculé un pourcentage de cellules présentant des inclusions cytoplasmiques fluorescentes, caractéristiques d'une accumulation lysosomale de GM2.

Sur l'ensemble des lames (patient et contrôles), la dilution 1:300 présentait un marquage trop faible ou artéfactuel (absence complète de fluorescence ou taches rendant impossible le comptage) : nous l'avons donc exclue de l'analyse finale. Nous avons exclu de l'analyse une des lames de notre patient à la dilution 1:400 du fait de l'absence complète de fluorescence sur la lame, puis avons décidé d'exclure également la dilution 1:400 de nos contrôles par souci de comparaison.

La moyenne de fluorescence des dilutions 1:100 et 1:200 était pour le contrôle négatif de 26,8 % (n=2 lames), pour le contrôle positif de 42,6 % (n=2 lames) et pour notre patient de 26,1 % (n=4 lames).

Ne retrouvant pas de différence entre ces deux dilutions d'anticorps primaire, nous avons essayé de compter les cellules en les classant selon leur intensité de fluorescence (cotée +, ++ et +++). Nous retrouvons un nombre de cellules de forte intensité de fluorescence en plus faible nombre chez notre patient par rapport à notre contrôle négatif.

Nous ne sommes donc pas en mesure de mettre en évidence une accumulation de gangliosides par l'immunofluorescence chez notre patient, étant donné qu'il présente un taux de fluorescence même inférieur à celui de notre contrôle négatif.

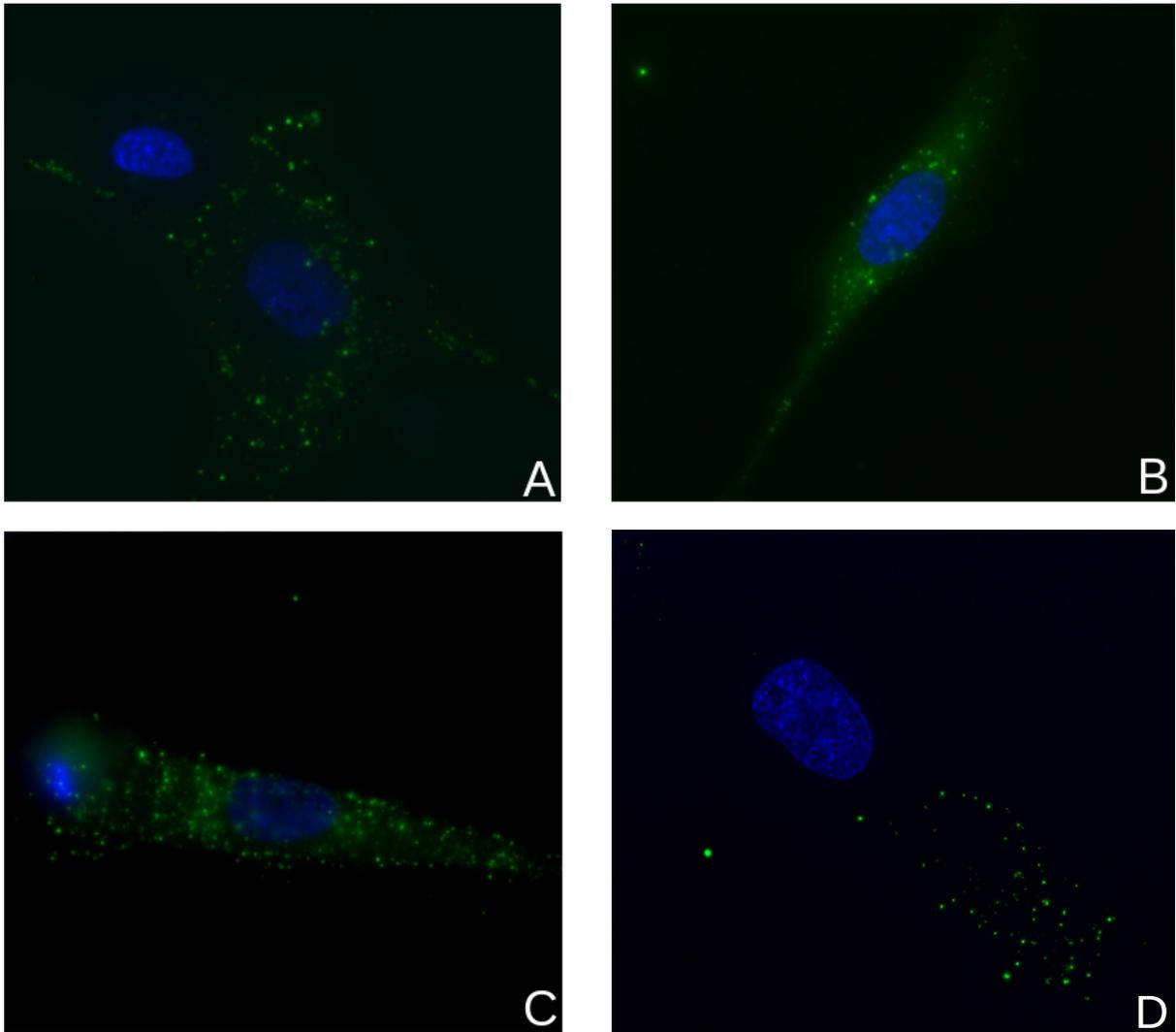


Illustration 15 : Immunofluorescence indirecte. Contrôle négatif au 1:200 (A), contrôle positif au 1:100 (B), patient au 1:200 (C) et 1:100 (D).

V.2.3. Chromatographie couplée à une spectrométrie de masse en tandem

L'analyse par LC-MS/MS du plasma de notre patient nous a permis de mettre en évidence une légère augmentation du taux de GM2 34:1 (83,5 nmol/L pour une médiane contrôle à 30,2 nmol/L [19,7-46,8]), ainsi que du ratio GM2 34:1 / GM3 34:1 (0,066 pour une médiane contrôle à 0,019).

Notre patient se trouve dans le premier quartile de la série de patients ayant une maladie de Tay-Sachs et Sandhoff, et le niveau de GM2 proche des formes adultes de ces maladies correspond bien à son profil clinique lentement évolutif.

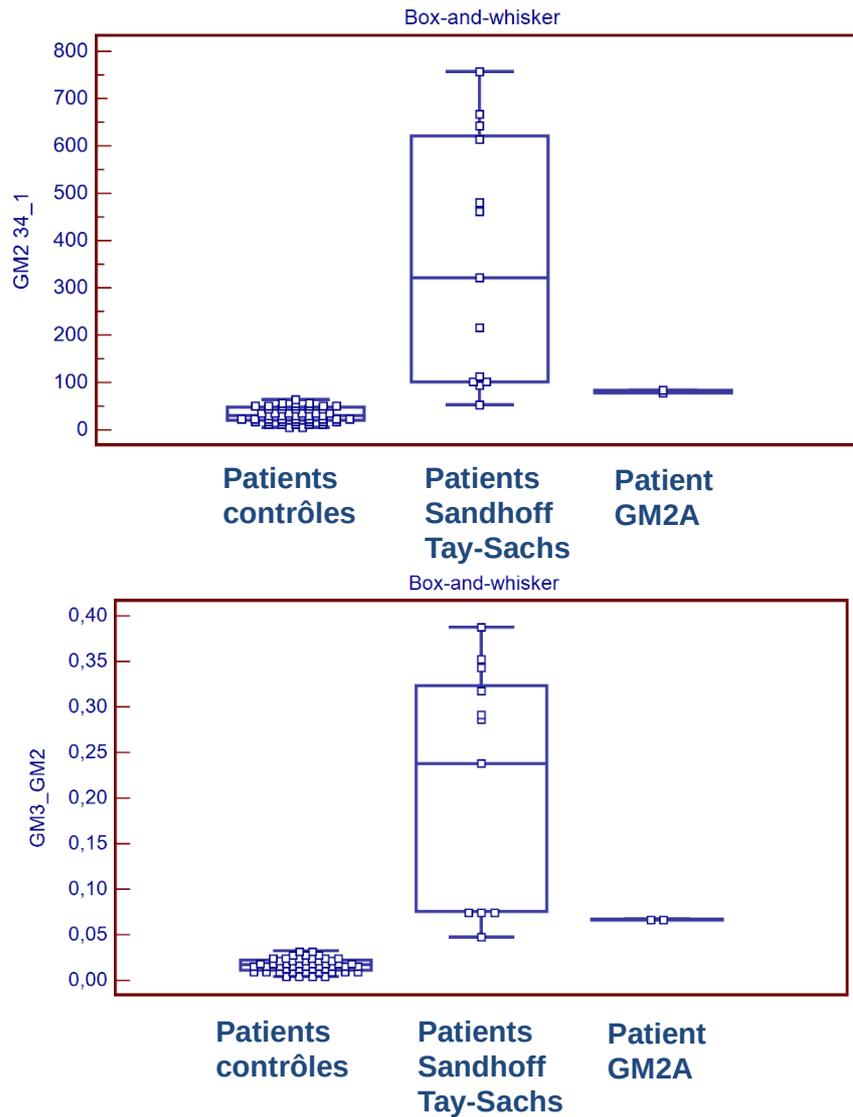


Figure 9 : Diagramme en boîte de la concentration en GM2 34:1 et du rapport GM2 34:1 / GM3 34:1.

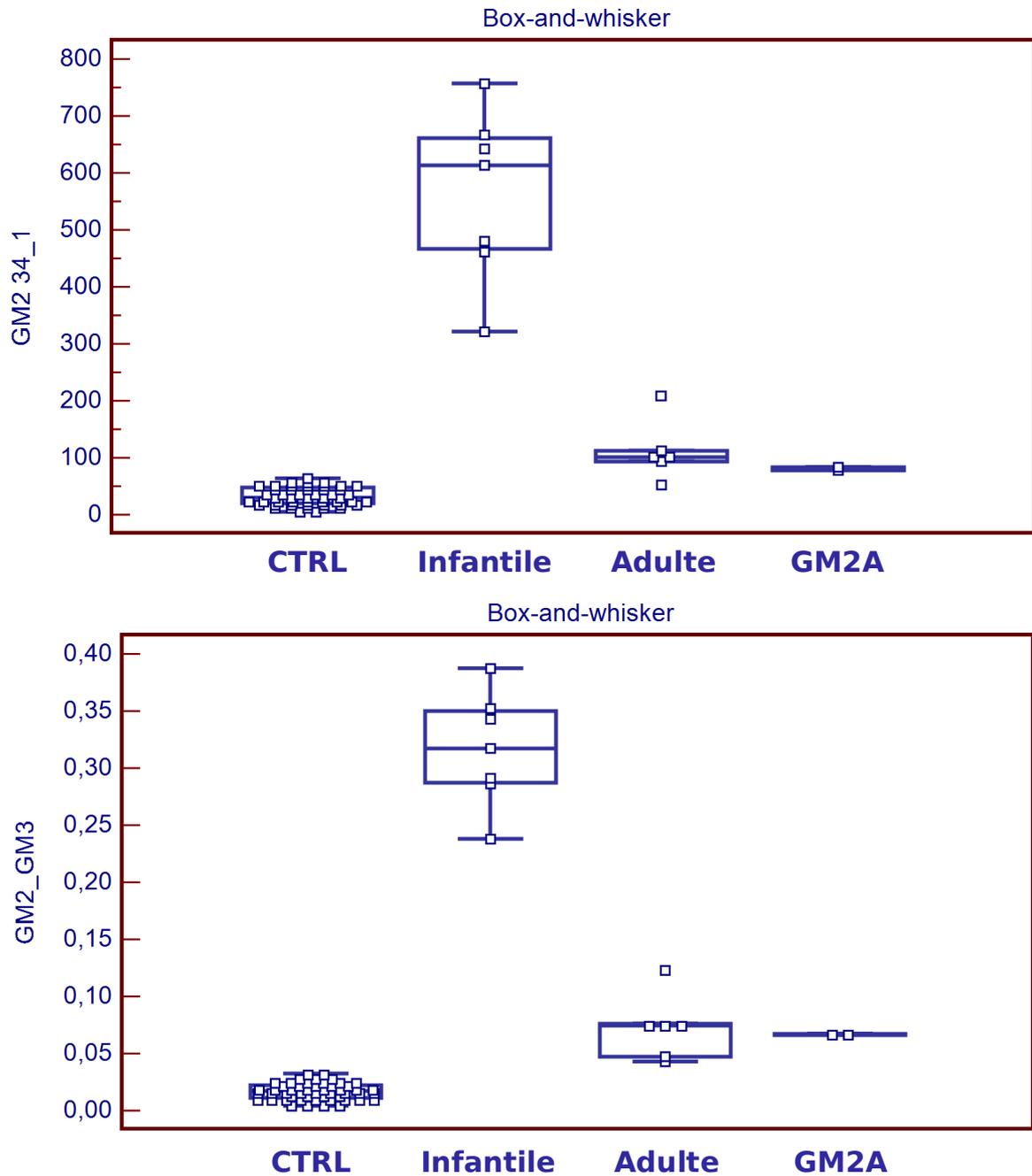


Figure 10 : Diagramme en boîte de la concentration en GM2 34:1 et du rapport GM2 34:1 / GM3 34:1 en fonction l'âge de début des signes cliniques.

VI. Discussion

VI.1. Revue de la littérature des gangliosidoses à GM2 variant AB

Peu de cas de gangliosidoses variant AB ont été rapportés dans la littérature, et il s'agit principalement de formes infantiles, graves, se manifestant avant 12 mois de vie et s'accompagnant systématiquement d'une tache maculaire rouge cerise. Les principaux signes cliniques rapportés sont un retard psychomoteur, des crises d'épilepsie, une hypotonie axiale et une hyperacousie. Une hypertonie et une spasticité des quatre membres sont également recensées pour un des patients (77).

Le seul patient ayant présenté des symptômes à 12 mois de vie sans tache maculaire, et avec une hypertonie axiale et une ataxie en plus des signes cliniques « classiques » sus-cités, était le patient hétérozygote composite recensé par Martins et al. en 2017 (91). Celui-ci présentait à la fois un variant non-sens (p.Glu87*) et un variant faux-sens (p.Pro55Leu). Ce variant faux-sens avait déjà été décrit pathogène dans la littérature à l'état homozygote par Salih et al. en 2015, dans une famille indienne, pour laquelle trois apparentés ont développé une chorée dans l'enfance (7-8 ans), mais n'avait pas de tache maculaire rouge cerise (92). Ceux-ci présentaient également à l'IRM une atrophie cérébrale sans anomalie de signal, de même que le patient présenté par Martins et al.

La quantité de GM2-AP a été évaluée, soit par Western Blot soit en utilisant de la cystéine radiomarquée, chez six des patients recensés dans le tableau 2. Cette dernière était soit nulle, soit marquée comme faible, sans évaluation relative de la quantité de protéine par rapport aux contrôles négatifs.

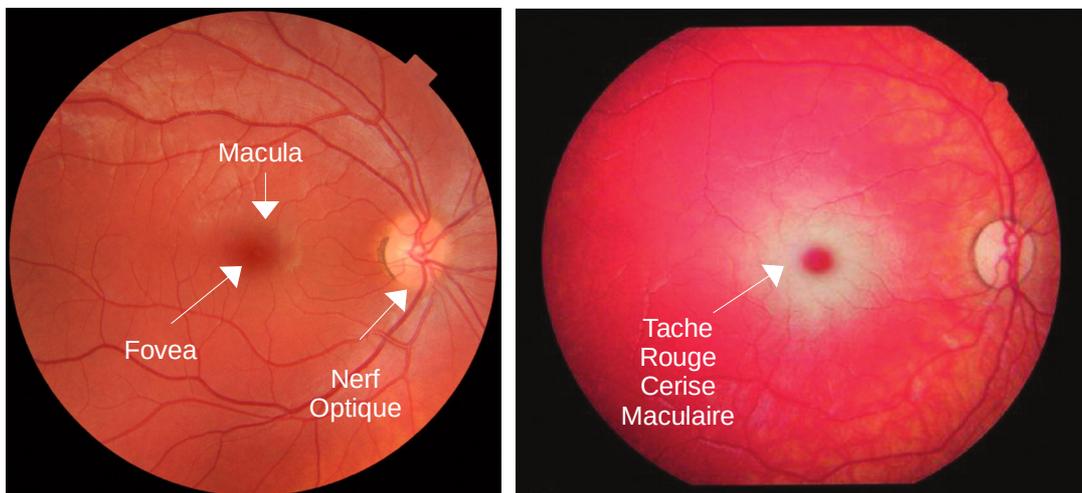


Illustration 16 : Fond d'œil d'un patient atteint de gangliosidose à GM2 variant AB infantile (Brackmann F, 2017 ; Patient 1).

Génotype	Gène	Protéine	Type de mutation	Quantité de GM2-AP	Quantité d'ARNm	IRM Cérébrale	Âge de début	Tâche Rouge Cerise Maculaire	Référence
Homozygote	c.412T>C	p.Cys138Arg	Missense	Absente	Normale	n.a	9mo	Oui	Xie B, 1992
Homozygote	c.262_264delAGA	p.Lys88Del	InFrameDeletion	Absente	Normale	n.a	8mo	Oui	Schepers U, 1996 (Patient A)
Homozygote	c.410delA	p.His137Profs*34	Frameshift	Faible	Normale	n.a	7mo	Oui	Schepers U, 1996 (Patient B)
Homozygote	c.506G>C	p.Arg169Pro	Missense	Faible	Normale	n.a	5mo	Oui	Schröder M, 1993
Homozygote	c.262_264delAGA	p.Lys88Del	InFrameDeletion	Non Évaluée	Non Évaluée	Hyper-intensité périventriculaire et des noyaux gris centraux	9mo	Oui	Brackmann F, 2017 (Patient 1)
Homozygote	c.369_371delinsATTAA	p.Pro124Leufs*48	Frameshift	Non Évaluée	Non Évaluée	Hyper-intensité des noyaux gris centraux et de la partie postérieure du thalamus, retard de myélinisation	10mo	Oui	Brackmann F, 2017 (Patient 2)
Homozygote	c.160G>T	p.Glu54*	Nonsense	Absente	Absente	Hyper-intensité périventriculaire et altération du signal des noyaux gris centraux	5mo	Oui	Chen B, 1999
Homozygote	c.472G>T	p.Glu158*	Nonsense	Non Évaluée	Non Évaluée	Hyper-intensité du putamen, hypo-intensité thalamique et retard de myélinisation	12mo	Oui	Sheth J, 2016
Homozygote	c.160G>T	p.Glu54*	Nonsense	Non Évaluée	Non Évaluée	Hyper-intensité de la partie postérieure du thalamus avec hypo-intensité de sa partie antérieure, retard de myélinisation	4mo	Oui	Renaud D, 2016
Hétérozygote Composite	c.259G>T + c.164C>T	p.Glu87* + p.Pro55Leu	Nonsense + Missense	Absente	Non Évaluée	Atrophie cérébrale diffuse et élargissement ventriculaire sans anomalie de signal	12mo	Non	Martins C, 2017
Homozygote	c.164C>T	p.Pro55Leu	Missense	Non Évaluée	Non Évaluée	Atrophie cérébrale	7yo	Non	Salih MA, 2015 (Patient 1)
Homozygote	c.164C>T	p.Pro55Leu	Missense	Non Évaluée	Non Évaluée	Atrophie cérébrale	8yo	Non	Salih MA, 2015 (Patient 2)
Homozygote	c.164C>T	p.Pro55Leu	Missense	Non Évaluée	Non Évaluée	Atrophie cérébrale	8yo	Non	Salih MA, 2015 (Patient 3)
Homozygote	c.522T>G	p.Leu174Arg	Missense	Non Évaluée	Non Évaluée	n.a	11mo	Oui	Kolodny E, 2008
Homozygote	c.312delC	p.Ser105Alafs*14	Frameshift	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	Encarnação M, 2020
Homozygote	c.333delC	p.Cys112Valfs*7	Frameshift	n.a	n.a	n.a	12mo	n.a	Fernández-Marmiesse A, 2014
Homozygote	c.412T>C	p.Cys138Arg	Missense	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	Schröder M, 1991

Tableau 2 : Revue de la littérature des patients atteints de gangliosidose à GM2 variant AB dont les mutations ont été décrites (Nomenclature HGVS 2016).

La mesure de la quantité d'ARNm avait été réalisée par Northern Blot, et n'avait pas montré de changement de taille ou de quantité d'ARNm de *GM2A* pour quatre des patients (77,93,94) par rapport aux contrôles négatifs. Un seul patient dans tous les cas recensés dans le tableau 2 présentait une absence d'ARNm (95). Il s'agissait d'un patient homozygote pour la mutation non-sens p.Glu54*, raccourcissant donc considérablement la protéine finale, comparé aux autres patients homozygotes pour une mutation faux-sens (p.Cys138Arg ou p.Arg169Pro), une mutation délétion inframe (p.Lys88Del) ou une mutation frameshift (p.His137Profs*34).

L'équipe de Chen et al. (95) avait complété son analyse par une RT-PCR, permettant de mettre en évidence deux bandes d'ADNc de 691 pb et 529 pb. La première bande (correspondant à la taille d'ARNm de *GM2A* attendue) était d'intensité plus faible que les contrôles négatifs, et la seconde n'était présente qu'à l'état de trace. Cet allèle de 529 pb (correspondant à une délétion de 162 pb, soit l'intégralité de l'exon 2 de *GM2A*) a été retrouvé chez les contrôles négatifs, mais là aussi en très faible quantité. Cet allèle peut donc correspondre à un épissage alternatif, puisque celui-ci peut concerner jusqu'à 95 % des gènes multi-exoniques (96). Cependant, la présence de cet isoforme de la protéine n'a pas été mise en évidence dans d'autres études, et il se peut que la présence de ce second allèle alternatif soit due aux conditions techniques de l'expérimentation.

L'absence d'ARNm chez ce patient présenté par Chen et al. peut s'expliquer par la présence d'un codon-stop prématuré. En effet, il existe au sein des cellules eucaryotes un système appelé « Nonsense-Mediated mRNA Decay » (97), qui dégrade les ARNm présentant des codons-stops prématurés. Ce mécanisme permet d'éviter l'accumulation de protéines tronquées non efficaces, et est associé également aux « Open Reading Frames » et aux régions 3'UTR longues. Une mesure de la quantité d'ARNm chez le patient de Renaud et al. (98) aurait permis de vérifier cette hypothèse.

Parmi l'ensemble des examens complémentaires effectués, certains patients ont pu bénéficier d'une IRM cérébrale, et les lésions visibles sont extrêmement proches. Parmi les patients pour lesquels les signes cliniques ont débuté avant 12 mois, deux (95,99) ont présenté des hyper-signaux T2 périventriculaires et des noyaux gris centraux, et trois (98–100) ont présenté des hyper-signaux des noyaux gris centraux (variables au niveau du thalamus) avec un retard de myélinisation. Seuls les patients porteurs de la mutation p.Pro55Leu, à l'état hétérozygote (91) ou homozygote (92), présentaient une atrophie cérébrale sans anomalie de signal. Notre patient en revanche, ne présentait pas d'atrophie cérébrale, mais une très discrète atrophie du vermis cérébelleux et de légers hyper-signaux des cornes postérieures des ventricules latéraux, atteinte comparable à celle des formes adultes de maladie de Tay-Sachs.

De même, comparé aux patients rapportés dans la littérature, notre patient est le premier à présenter des signes cliniques aussi tardivement, et principalement une hypertonie/spasticité des membres inférieurs associées à une ataxie spinocérébelleuse. Bien qu'il ne présente pas de retard psychomoteur, l'évaluation neuropsychologique a révélé une altération légère des fonctions cognitives, comparable également aux formes adultes de maladie de Tay-Sachs.

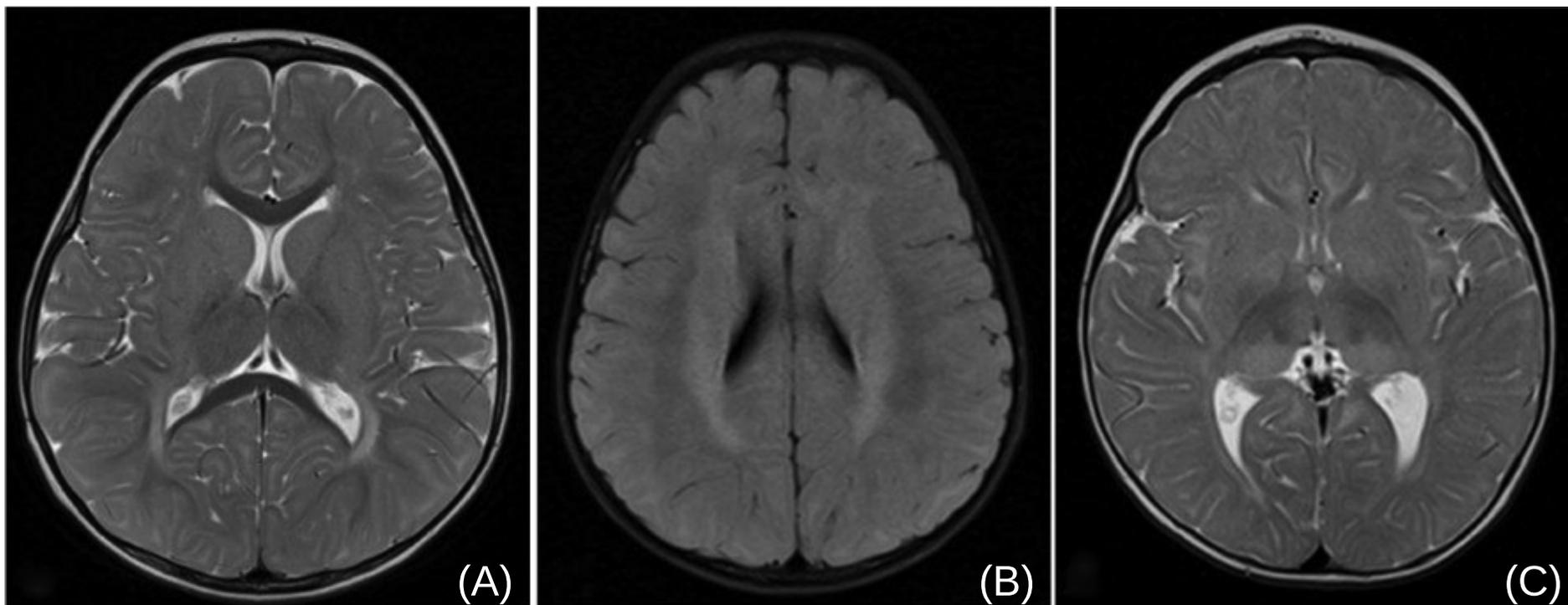


Illustration 17 : IRM cérébrale de patients atteints de gangliosidose à GM2 variant AB infantile (Brackmann F, 2017). Le patient 1 présente des hyper-signaux du centre semi-ovale et des ganglions de la base (A = T2 ; B = T2 inversion-récupération), et le patient 2 présente des hyper-signaux des ganglions de la base, de la partie postérieure du thalamus et au niveau des radiations optiques (C = T2).

VI.2. Revue de la littérature des formes adultes de gangliosidoses à GM2

L'équipe de Masingue et al. a effectué en 2020 un recueil de données des formes adultes de gangliosidoses à GM2 afin de préciser leur phénotype (66). En tout, deux cohortes ont pu être étudiées : une cohorte française de 12 patients (4 Sandhoff et 8 Tay-Sachs) et une cohorte issue de la littérature de 45 patients (13 Sandhoff et 32 Tay-Sachs).

La moyenne d'âge de survenue des signes cliniques était de 19 ans pour les patients Tay-Sachs (± 7 [10-42]) et de 27 ans (± 14 [10-54]) pour les patients Sandhoff. Il est intéressant de noter que parmi 35 patients pour lesquels les informations sur leur développement psychomoteur étaient précises, 49 % (n=17/35, 1 seul patient Sandhoff) ont manifesté dans leur enfance des signes cliniques subtils sur le plan moteur (maladresse, difficultés pour courir ou marcher, dysarthrie), qui ne s'étaient pas aggravés par ailleurs, mais auxquels vinrent s'ajouter par la suite les déficits liés à l'atteinte du motoneurone inférieur. D'autres signes précoces furent aussi observés : difficultés d'apprentissage modérées et dysarthrie/bégaiement (n=6/35 et n=3/35 respectivement, uniquement chez les patients Tay-Sachs).

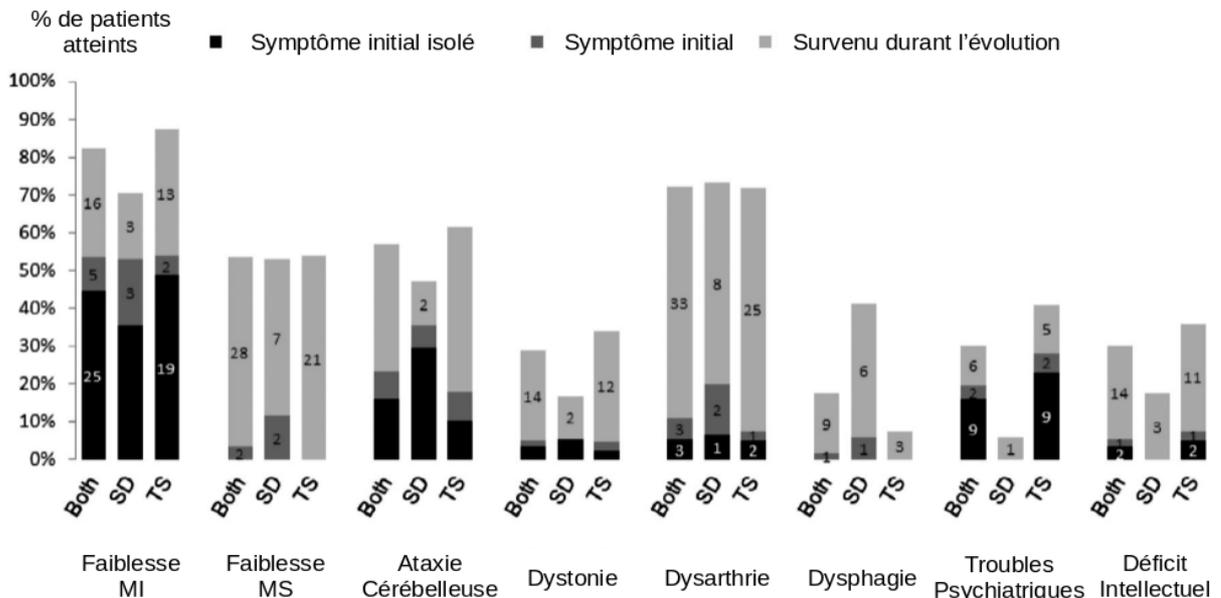


Figure 11 : Signes cliniques des patients adultes atteints de gangliosidoses à GM2 (Masingue et al., 2020) ; SD = Sandhoff, TS = Tay-Sachs, MI = Membres Inférieurs, MS = Membres Supérieurs.

VI.2.1. Atteinte neurologique

La manifestation neurologique la plus fréquente et la plus précoce était une faiblesse des membres inférieurs (81 % des patients) due systématiquement à une atteinte du motoneurone inférieur (atteinte vérifiée par électromyogramme), le psoas étant le premier et le plus sévèrement touché, suivi par les quadriceps.

L'atteinte des membres supérieurs était moins constante, ne touchant que 53 % des patients, et survenant plus tardivement (jamais retrouvée comme premier signe de la maladie). Une caractéristique particulière est l'atteinte plus précoce et importante des triceps ainsi que des interosseux par rapport aux biceps, avec une atteinte initiale prédominante sur le nerf ulnaire à l'électromyogramme. Une neuropathie axonale sensitive était présente chez 25 % des patients (n=14/55), dont 69 % (n=11/14) atteints de la maladie de Sandhoff.

Le syndrome cérébelleux concernait 57 % des patients, et était le symptôme princeps isolé pour 9 d'entre eux. L'IRM a montré chez 73 % des patients (n=30/41) une atrophie cérébelleuse (y compris en l'absence de syndrome cérébelleux) et 15 % (n=6/41) présentaient une atrophie cérébrale diffuse.

Les troubles de la marche concernaient 95 % des patients, et la moitié d'entre eux auront eu besoin d'un fauteuil roulant au-delà de 20 ans d'évolution de la maladie. Le pattern et la vitesse d'évolution de ces troubles étaient cependant hétérogènes.

La dysarthrie était le deuxième symptôme le plus fréquent (70 %), mais rarement présent au début de la maladie (n=6/57). La dysphagie quant à elle ne concernait que 18 % (n=10/57) des patients, mais touchait 41 % des patients atteints de la maladie de Sandhoff contre 8 % des patients atteints de maladie de Tay-Sachs.

Une autre étude de Neudorfer et al. en 2005 (101) avait recensé 21 individus (83,3 % d'origine Ashkénaze) atteints de forme adulte de maladie de Tay-Sachs, et avait mis en évidence une atteinte musculaire identique : faiblesse aux membres inférieurs prédominante sur les psoas et les quadriceps (57,2 % des patients utilisant une canne, un déambulateur ou un fauteuil roulant), et aux membres supérieurs prédominante sur les triceps, avec cependant une force relativement conservée. Une IRM cérébrale a pu être réalisée chez 86 % des patients (n=18/21), et tous présentaient une atrophie cérébelleuse marquée.

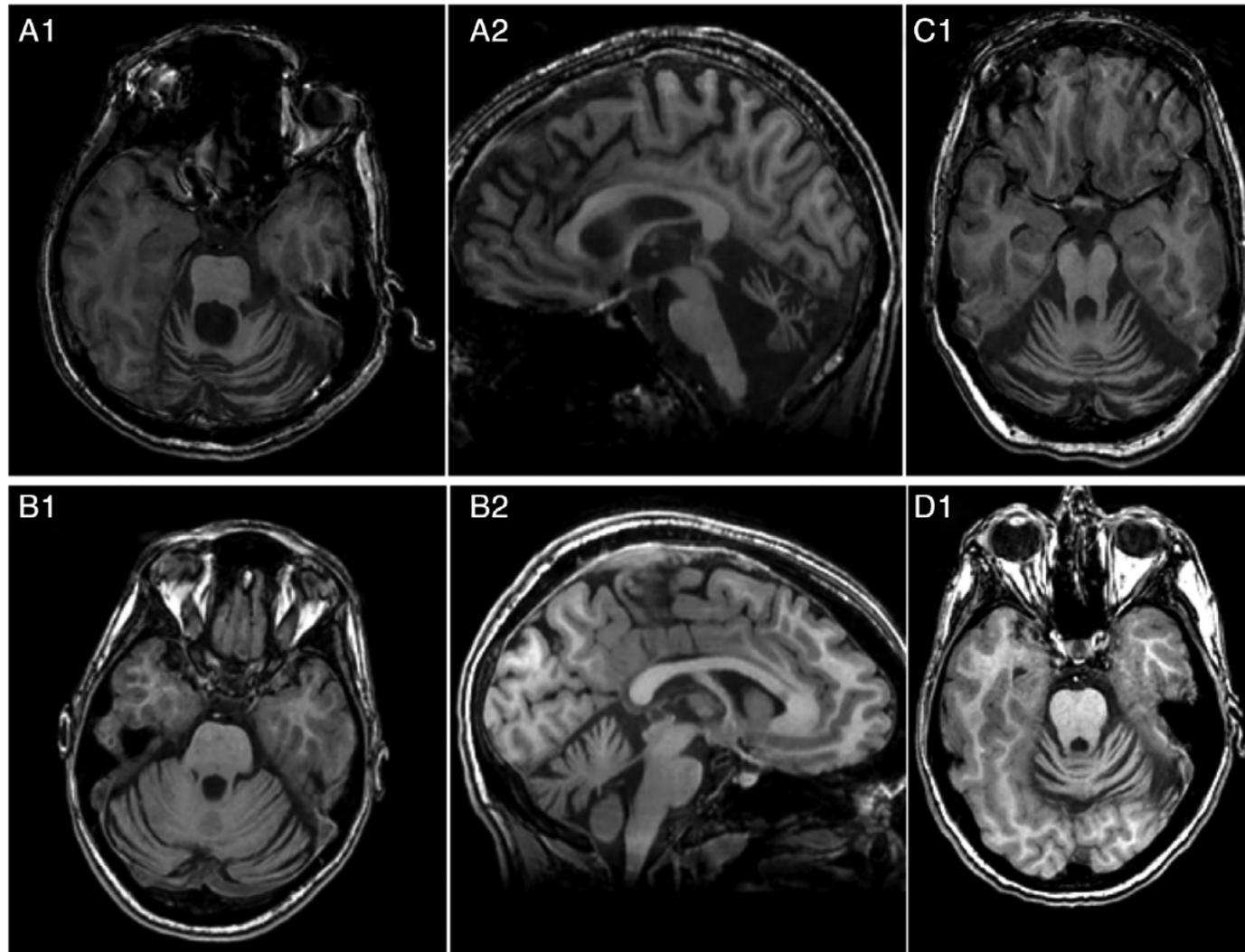


Illustration 18 : Atrophie cérébelleuse chez des patients atteints de forme adulte de maladie de Tay-Sachs (Masingue et al., 2020) ; Patient A = Ataxie cérébelleuse ; Patient B, C et D = Déficit du motoneurone inférieur isolé sans syndrome cérébelleux.

VI.2.2. Atteinte neurocognitive

Au total, 30 % des patients présentaient des difficultés d'apprentissage modérées sans critère de démence (66). Les troubles psychiatriques étaient tout aussi fréquents mais majoritairement sévères (dépression, trouble maniaco-dépressif, psychose), et 94 % des patients touchés (n=16/17) étaient atteints de la maladie de Tay-Sachs. Il est à noter que les troubles psychiatriques étaient isolés pour 9 patients.

Cette fréquence de symptôme est cohérente avec une revue de la littérature antérieure, qui s'était concentrée sur les symptômes neuropsychologiques des patients atteints de forme adulte de maladie de Tay-Sachs (102). Dans cette étude, sur 62 patients, 27 (44 %) présentaient une dysfonction cognitive, et parmi eux, 21 ont pu bénéficier d'un suivi sur le long terme : 8 sont restés stables, et 13 ont décliné progressivement, principalement sur le plan de la mémoire et des fonctions exécutives. Sur les 19 patients présentant un déficit cognitif et pour lesquels les données d'IRM étaient disponibles, 26 % (n=5/19) présentaient une atrophie corticale, contre 15 % pour les patients ne présentant pas de déficit (n=2/13).

Dans l'étude de Neudorfer et al. (101), la proportion de patient atteints de troubles psychiatriques était plus importante que dans l'étude de Masingue et al. (85,7 % vs 30 %). Aucun des patients ne présentait cependant de déclin cognitif majeur, de démence ou de dysphagie, similairement à une autre étude de 2019 sur les formes adultes de maladie de Tay-Sachs (103).

VI.2.3. Présentations initiales et évolution

L'étude de Masingue et al. a permis de mettre en évidence quatre présentations initiales différentes des gangliosidoses à GM2 chez l'adulte :

- atteinte proximale des membres inférieurs et du motoneurone inférieur, puis progression aux membres supérieurs ;
- ataxie cérébelleuse (plus fréquemment isolée chez les patients Sandhoff) ;
- trouble psychiatrique (maladie de Tay-Sachs uniquement) ;
- mélange des trois phénotypes sus-cités.

Dans cette optique, l'équipe de Masingue et al. recommande une recherche des gangliosidoses à GM2 chez l'adulte en cas d'association d'une atrophie cérébelleuse et d'une atteinte du motoneurone inférieur, d'ataxie isolée (avec ou sans anomalie à l'IRM cérébrale) et en cas de troubles psychiatriques sévères résistants au traitement, ou s'associant de manière inhabituelle à un déclin cognitif.

Par rapport à notre patient, la progression de sa maladie ressemble fortement, de manière logique, à un profil évolutif adulte de patient atteint de la maladie de Tay-Sachs : atteinte initiale aux membres inférieurs avec signes discrets dans l'enfance d'atteinte psychomotrice (maladresse), diffusion de l'atteinte neurologique aux membres supérieurs avec atteinte du nerf ulnaire et des interosseux, discrète atrophie cérébelleuse et légers troubles cognitifs. Le risque évolutif de la maladie sera principalement marqué par la nécessité d'utiliser un fauteuil roulant pour se déplacer, le risque de développer des symptômes psychiatriques ainsi que la survenue d'un déclin cognitif.

VI.2.4. Génétique et activité enzymatique

Les études de Masingue et al. et de Neudorfer et al. ont retrouvé toutes les deux le variant le plus fréquent dans les formes adultes de Tay-Sachs (5), à savoir *HEXA:c.805G>A:p.Glu269Ser*, et qui fut parmi les premiers variants identifiés dans la population Ashkenaze en 1989 (59).

Cette corrélation entre génétique et phénotype provient de l'activité résiduelle enzymatique de l'hexosaminidase A. En effet, on voit une différence légère entre les niveaux d'activité résiduelle selon les formes cliniques : 0,1 % pour les formes infantiles, 0,5 % pour les formes juvéniles et 2-4 % pour les formes adultes (104). Notons qu'une activité d'au moins 10 % de l'hexosaminidase A est compatible avec une dégradation normale des gangliosides GM2 (105).

VI.2.5. Diagnostics cliniques différentiels

Sur le plan clinique, certains signes viennent s'ajouter à l'examen et peuvent aider à affiner la suspicion diagnostique (101) : diminution ou abolition des réflexes tricipitaux et rotuliens, tremblements des extrémités, fasciculations et réflexe palmo-mentonnier. La difficulté sur le plan sémiologique est notamment de faire la différence avec une amyotrophie spinale infantile de forme adulte (SMA Type 4) ou une sclérose latérale amyotrophique (SLA).

La présence de signes pyramidaux peut aider à distinguer une maladie de Tay-Sachs d'une SMA, mais ils ne sont cependant pas constants, et l'atteinte musculaire prédomine dans les deux pathologies sur les triceps et les psoas (106). L'IRM cérébrale reste un bon moyen de les distinguer, puisque l'on verra une atrophie cérébelleuse dans la première, et plutôt une atrophie de la corde spinale cervicale dans la seconde (107).

L'atrophie cérébelleuse peut cependant se retrouver dans le cadre des expansions d'hexanucléotides GGGGCC du gène *C9orf72* (OMIM*614260#105550), mais s'accompagne d'une démence fronto-temporale dont nous n'avons pas les critères ici, et survient en majorité après 35 ans (108). De plus, l'atteinte préférentielle proximale des muscles et l'absence d'atteinte bulbaire nous permet aussi de différencier une forme adulte de Tay-Sachs d'une SLA.

L'équipe de Salman et al. (109) a également exploré en 2001 la possible atteinte du système nerveux autonome chez quatre patients atteints de forme adulte de gangliosidose à GM2 (un seul patient Tay-Sachs) : le réflexe de sudation était anormal chez tous les patients, et aucun ne présentait de trouble aux tests d'hypotension orthostatique et d'inclinaison.

Un autre point important mis en valeur par ces deux études, est le délai important séparant le début des signes cliniques et le diagnostic : 17 ans en moyenne pour l'étude de Masingue et al. et 9 ans pour l'étude de Neudorfer et al.

VI.2.6. Cohérence des données de la littérature avec notre patient

Les données retrouvées dans la littérature sont parfaitement cohérentes avec la présentation clinique de notre patient, et les formes adultes de gangliosidoses variant AB pourraient se rapprocher fortement des formes adultes de Tay-Sachs.

Bien entendu, notre patient étant le seul représentant de la forme adulte de variant AB, il est difficile de mettre en avant d'éventuelles différences sur le plan clinique. Nous retrouvons

une atteinte motrice prédominante aux membres inférieurs, une ataxie cérébelleuse avec discrète atrophie du vermis cérébelleux, ainsi qu'une légère atteinte des fonctions cognitives, dont les particularités sont les mêmes que les formes adultes de Tay-Sachs (prédominance sur la mémoire et les fonctions exécutives (110)). De même, les petits signes moteurs initiaux décrits dans l'étude de Masingue et al. sont aussi retrouvés chez notre patient durant son enfance. On peut cependant noter la prédominance clinique initiale de l'amyotrophie distale (mollets de coq et interosseux des mains), pouvant orienter à tort vers une SLA.

VI.3. Avantages et limites des méthodes d'analyse

VI.3.1. Expression génique

Contrairement aux découvertes faites par l'équipe de Chen et al. en 1999 (95), nous n'avons pas mis en évidence de différence en termes d'expression génique et de quantité d'ARNm entre notre patient et nos contrôles négatifs, malgré la présence d'un allèle non-sens.

En effet, en fonction de l'analyse réalisée, nous avons deux p-value contradictoires ($p=0,038$ et $p=0,26$). Cette disparité peut s'expliquer par plusieurs points : d'une part, le faible nombre d'échantillons, d'autre part la variabilité analytique induite par les différents runs réalisés de notre patient et de nos contrôles négatifs. Ainsi, l'analyse statistique est de faible puissance, et ne nous permet pas d'affirmer ou d'infirmer avec certitude une différence significative de l'expression génique de *GM2A*.

Si nous calculons le ratio de l'expression génique de notre patient par rapport à celle de chaque contrôle négatif séparément et par rapport à leur moyenne de Q_n , nous obtenons une moyenne à 0,97 [0,95-0,98], soit une expression génique de *GM2A* normale chez notre patient.

Il aurait été intéressant de bénéficier de plus de patients afin de préciser la présence ou l'absence d'ARNm en cas de codon-stop prématuré, cependant cette donnée ne présagerait pas de l'importance des signes cliniques ou de l'accumulation de GM2.

VI.3.2. Microscopie électronique et immunofluorescence

Dans notre étude, ni la ME, ni l'IF n'ont permis de mettre en évidence une différence d'accumulation de GM2 dans les fibroblastes de notre patient par rapport à ceux de nos contrôles négatifs.

La ME avait déjà été utilisée dans le cadre des gangliosidoses à GM2 variant AB, notamment avant le diagnostic génétique, et l'équipe de Goldman et al. (111) avait présenté en 1980 deux patients atteints de forme infantile de cette pathologie. Les analyses de coupes de cerveau et de cervelet montraient l'accumulation de GM2 au sein des neurones et des astrocytes, majoritairement sous forme d'inclusions lamellaires concentriques comme nous avons pu le décrire avec notre contrôle positif, mais aussi la présence d'inclusions de tailles variables, correspondant à des agrégats de GM2 et incluant des formations lamellaires. Cette découverte est cohérente avec l'étude de de Baecque et al. (31) réalisée 5 ans plus tôt sur un patient également atteint d'une forme infantile de gangliosidose à GM2 variant AB. Par ailleurs, ces inclusions neuronales sont indistinguables de celles observées chez les patients atteints de maladie de Tay-Sachs, ou d'autres maladies de surcharges lysosomales comme la maladie de Fabry (112).

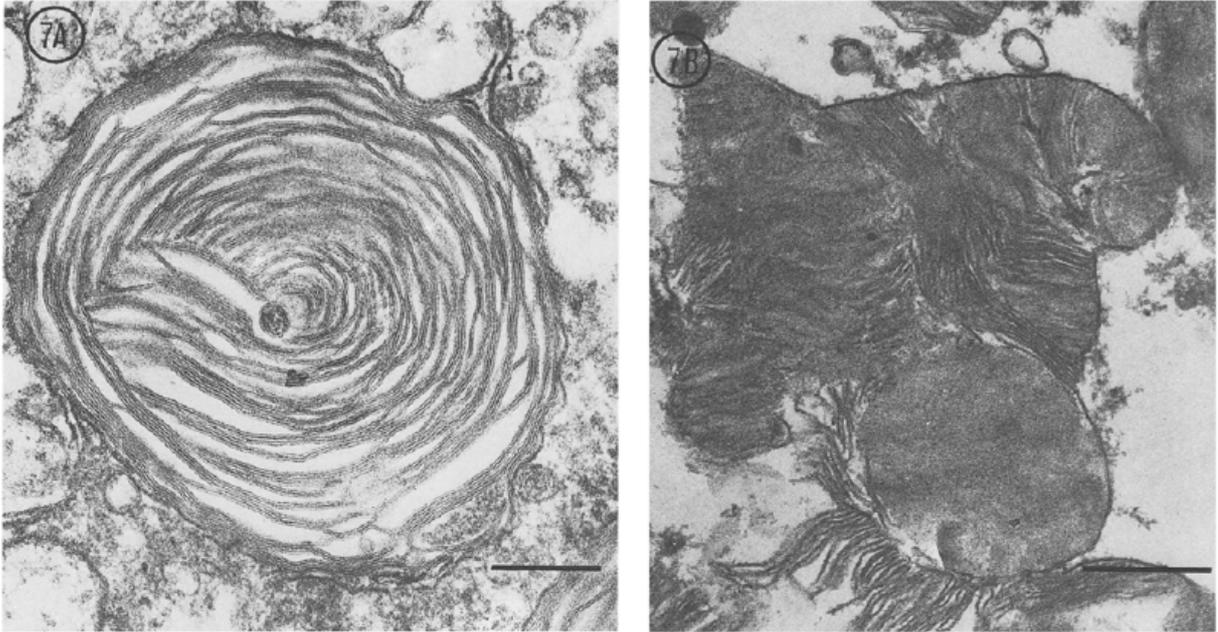


Illustration 19 : Inclusions intraneurales visibles en microscopie électronique (Goldman et al., 1980) ; 7A = Inclusions lamellaires concentriques ; 7B = Inclusions irrégulières résultant d'un agrégat de lamelles.

L'IF n'a, à notre connaissance, été utilisée que chez un seul patient atteint de gangliosidose à GM2 variant AB, dans l'étude de Martins et al. (91), sur des fibroblastes cultivés. Le patient présentait une forme juvénile de la maladie, et le nombre de cellules fluorescentes était estimé à environ 60 %, contre presque 40 % pour leurs contrôles négatifs.

L'absence de différence notable entre notre patient et nos contrôles négatifs, aussi bien avec la ME qu'avec l'IF, peut s'expliquer par la présence d'une activité résiduelle de l'HexA, permettant une dégradation des gangliosides GM2 en GM3, de la même manière que pour les formes adultes de maladie de Tay-Sachs. L'accumulation de GM2 serait alors plus faible, et la ME ainsi que l'IF ne seraient pas assez sensibles pour la mettre en évidence dans les formes adultes. Ces techniques constitueraient cependant une approche intéressante en cas de suspicion clinique de gangliosidose à GM2 de forme infantile ou juvénile, mais ne permettraient pas de poser précisément le diagnostic, ni de l'infirmier avec certitude.

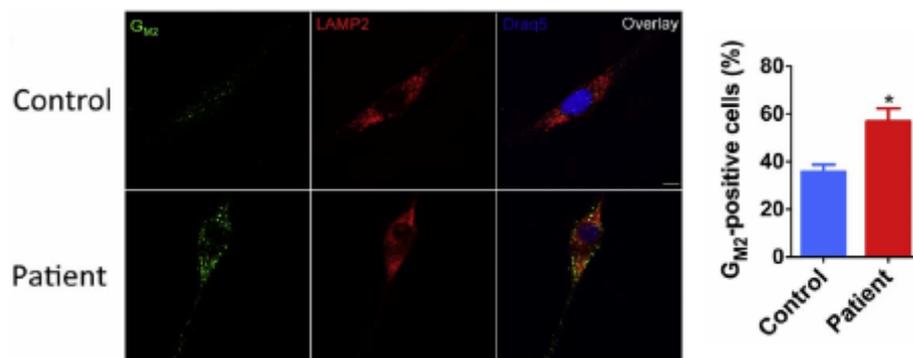


Illustration 20 : Immunofluorescence sur culture de fibroblastes (Martins et al., 2017) ; GM2 = Anticorps anti-GM2, LAMP2 = Anticorps anti-LAMP2 (Lysosomal-associated membrane protein).

VI.3.3. Western Blot

Étant donné la nature non-enzymatique de la protéine GM2-AP, sa quantité n'est pas évaluable via une mesure de l'activité enzymatique, comme c'est le cas pour les hexosaminidases A et B. Une technique utilisée pour mettre en évidence son absence est le Western Blot, mais nous avons décidé de ne pas réaliser cette technique dans notre étude pour plusieurs raisons.

Tout d'abord, nous avons préféré nous concentrer sur l'aspect fonctionnel de la protéine, et avons cherché à mettre en évidence une accumulation de gangliosides GM2. Dans la littérature, les cinq études que nous avons retrouvées et qui estimaient la quantité de GM2-AP (quatre avec la technique de Western Blot, et une utilisant une technique de quantification par cystéine radiomarquée et immunoprécipitation (77)) retrouvaient une quantité de protéine soit faible, soit nulle. De plus, il aurait fallu pour pouvoir évaluer et comparer correctement la quantité de GM2-AP, utiliser des tissus riches en GM2-AP, comme des extraits hépatiques, ce qui a été fait dans l'étude de Xie et al. (93), ou des extraits rénaux comme dans l'étude de Conzelmann et al. (37).

VI.3.4. Chromatographie

La technique de dosage des gangliosides par LC-MS/MS, mise au point par l'équipe du Dr Lamari à l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière, permet de distinguer les patients présentant une gangliosidose à GM2 des contrôles négatifs avec une sensibilité et une spécificité de 100 %, et ce y compris pour les formes adultes.

Leur validation de méthode s'est basée sur des prélèvements de plasma de 14 patients différents (8 Tay-Sachs, 5 Sandhoff, 1 variant AB), dont 7 patients atteints de forme adulte. Concernant le dosage des gangliosides GM2 34:1, une différence significative ($p=0,003$) a été retrouvée entre les patients présentant une forme infantile/juvénile (moyenne à 613,5 nM [470,8-654,5]) et ceux présentant une forme adulte (moyenne à 101,9 nM [100,5-112,3]), supportant la théorie d'une activité enzymatique résiduelle.

Cette technique de dosage avait déjà été testée et approuvée par une équipe américaine (113), dans des conditions expérimentales et d'extraction des gangliosides similaires. Cependant, cette technique avait été testée sur 20 échantillons de plasma normaux, et 6 patients atteints de déficit en GM3 synthase, dont les gangliosides GM2 et GM3 étaient de ce fait indosables.

L'équipe de Gu et al. (114) avait également utilisé une technique de LC-MS/MS pour le dosage des gangliosides GM1 et GM2, mais sur du liquide céphalo-rachidien de patients atteints de forme infantile de Tay-Sachs ($n=5$), et montrait l'augmentation de GM2 chez les patients par rapport aux témoins (moyenne à 167,52 ng/mL [92,6-313,0] et à 2,88 ng/mL [0,8-5,3] respectivement). Un des patients de cette étude a bénéficié d'une greffe de moelle osseuse, et le dosage du liquide céphalo-rachidien a montré une diminution de la quantité de GM2.

Cette étude est donc la première à ouvrir la voie à une technique de dosage facilement réalisable chez les patients car peu invasive, reproductible et précise, et surtout pourrait permettre un suivi efficace des patients en cas de traitement.

Une autre technique que nous avons pu retrouver dans la littérature, est le dosage par LC-MS/MS de Lyso-GM2 (Lyso-monosialoganglioside GM2), un composé retrouvé dans des extraits de cerveaux de patients dont l'hexosaminidase A est déficitaire. La formation de ce composé serait due à l'accumulation de gangliosides GM2 au sein des lysosomes, qui perdraient l'acide gras de leur céramide sous l'action d'une céramidase acide. Ce mécanisme a été prouvé expérimentalement pour les maladies de Gaucher, Krabbe et Fabry, mais pas pour les gangliosidoses à GM2 (115).

Deux études ont évalué l'intérêt potentiel du Lyso-GM2. Dans la première de Kodama et al. (116), le dosage a été effectué sur le plasma de 8 patients (2 Sandhoff dont 1 adulte, 5 Tay-Sachs infantile, 1 variant AB infantile) : chez les contrôles négatifs ainsi que chez le patient variant AB, le taux de Lyso-GM2 était $<2,0$ nmol/L contrairement aux patients Tay-Sachs et Sandhoff (moyenne 24,9 nmol/L [2,9-39,9]). Dans la seconde étude de Pettazoni et al. (117), la détection de Lyso-GM2 chez les patients Tay-Sachs (n=4) ou Sandhoff (n=9) n'atteignait une sensibilité que de 77 %, et n'était pas détectable chez deux patients atteints de forme adulte (Tay-Sachs et Sandhoff) et chez un patient atteint de forme infantile de Sandhoff. La détection de Lyso-GM2 semble donc être moins performante que la détection du GM2, en particulier pour les gangliosidoses variant AB, où la quantité d'HexA présente serait suffisante pour dégrader le Lyso-GM2, qui est hydrophile.

VI.4. Traitements

À l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement curatif pour aucune des gangliosidoses à GM2. Alors que quelques essais cliniques sont en cours pour les maladies de Tay-Sachs et Sandhoff, aucun n'est en cours pour les gangliosidoses à GM2 variant AB.

Nous avons cependant décidé de faire la revue de la littérature des différentes thérapeutiques qui ont été explorées au cours des dernières années, afin de mieux comprendre les difficultés associées à la mise en œuvre d'un traitement.

VI.4.1. Enzymothérapies

VI.4.1.1. Substitutive

Le concept de l'enzymothérapie substitutive remonte en 1964 (118,119), et elle s'est développée pour de nombreuses maladies de surcharges lysosomales : elle est actuellement le principal traitement pour la maladie de Gaucher type I et III, mais est aussi disponible pour la maladie de Fabry, la maladie de Pompe, et les mucopolysaccharidoses (types I, II et VI).

Cette approche a été testée pour les gangliosidoses à GM2 dès les années 1970, avec des injections d'HexA purifiée chez des enfants atteints de forme infantile de maladie de Tay-Sachs. Des injections intraveineuses (120) ont permis de retrouver de l'HexA dans le foie mais pas dans le liquide cérébro-spinal, mettant ainsi en évidence l'absence de passage de la barrière hémato-encéphalique par l'HexA. L'injection intrathécale (121) a aussi été testée, et a permis d'augmenter la quantité d'enzyme retrouvée dans le système nerveux central. Ces deux études n'ont cependant pas montré de bénéfice clinique.

L'équipe de Tsuji et al. (122) a exploré des injections intra-ventriculaires d'HexA recombinante humaine chez des modèles souris de Sandhoff, et ont permis d'améliorer la

survie de 12,9 % (environ 2 semaines) et de retarder la détérioration motrice d'environ 1 semaine, soit des résultats restant plutôt modestes.

Une autre approche réalisée par l'équipe de Matsuoka et al. (123) fut de modifier la sous-unité β de l'hexosaminidase de souris, en lui rajoutant les portions de séquences qui permettent à la sous-unité α d'interagir avec la GM2-AP et de dégrader les GM2. Des injections intra-cérébro-ventriculaires de cette sous-unité β modifiée ont permis chez des souris Sandhoff de réduire d'environ un facteur 2 l'importance de l'accumulation de GM2 comparé aux souris non traitées.

VI.4.1.2. Par réduction de substrat

Une autre approche enzymatique serait de réduire le substrat de l'HexA, afin de ralentir l'accumulation intra-lysosomale de gangliosides. Le Miglustat (N-Butyldeoxynojirimycin), un inhibiteur de la glucosylcéramide synthase, est capable de passer la barrière hémato-encéphalique (à hauteur d'environ 20 % de sa concentration plasmatique (50)). Des essais sur des modèles murins de Tay-Sachs ont montré une réduction de l'accumulation intra-cérébrale de GM2, et une amélioration des signes neurologiques (124). Deux essais sur des formes infantiles (125) et juvéniles (126) de gangliosidoses à GM2 ont été réalisés avec le Miglustat, mais aucun n'a retrouvé de modification de leur évolution clinique, et tous les patients se sont aggravés sur le plan neurologique. Il est à noter que tous ces patients ont été traités après la survenue de leurs premiers symptômes, conséquences de l'accumulation de gangliosides et de la neuro-inflammation, pouvant jouer en défaveur de l'efficacité du traitement.

VI.4.2. Greffe de cellules souches (CS)

VI.4.2.1. CS Hématopoïétiques

Les greffes de moelles osseuses sont rares dans le cadre des gangliosidoses. Les premiers essais sur les modèles murins de maladie de Sandhoff (127) ont montré une amélioration de la survie (4,5 à 8 mois) et des symptômes neurologiques, mais sans régression complète de ces derniers.

Chez l'être humain, peu d'essais ont été tentés. Le premier a été réalisé en 2005 (128), chez un garçon âgé alors de 3 ans et 10 mois, diagnostiqué pré-symptomatiquement d'une maladie de Tay-Sachs. Il a pu bénéficier d'une greffe allogénique, et alors que l'activité enzymatique de l'HexA était parvenue à des taux normaux peu de temps après la greffe, les taux plasmatiques sont restés bien en dessous de la norme. La greffe n'a cependant pas modifié le cours de sa maladie, et la détérioration neurologique a eu lieu durant les 6 mois suivant la greffe. Du Miglustat avait été administré à partir de l'âge de 5 ans et demi, sans effet.

Le second essai a eu lieu chez un patient de 23 ans atteint d'une forme juvénile de Tay-Sachs (129), et présentant comme principaux symptômes des tremblements des extrémités et une dysphagie. Il a bénéficié à l'âge de 15 ans d'une greffe de moelle d'un apparenté HLA-compatible, permettant d'arrêter la progression de ses tremblements et d'améliorer sa dysphagie. Comme pour le précédent patient, l'activité de l'HexA était devenue normale dans les leucocytes, mais bien inférieure à la norme dans le plasma.

L'étude de Bley et al. (67) référence également 5 patients ayant bénéficié d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques (2 Sandhoff et 3 Tay-Sachs, seulement des formes infantiles), sans différence en termes d'amélioration neurologique et de survie.

VI.4.2.2. CS Neurales

Du fait de l'absence de passage de la barrière hémato-encéphalique par les hexosaminidases, une thérapeutique intéressante serait la greffe de cellules souches neurales et l'utilisation de leur capacité de homing. Des essais ont été réalisés sur des modèles souris Sandhoff, en injectant en intra-parenchymateux des lignées cellulaires pluripotentes neurales, permettant une amélioration des fonctions motrices, un ralentissement de leur détérioration neurologique et une prolongation de leur durée de vie, aussi bien chez des souris en période néonatale et pré-symptomatique (130), qu'en tout début de symptomatologie (131).

VI.4.3. Molécules Chaperonnes

Pour les pertes de fonctions d'hexosaminidase par mutation faux-sens, l'utilisation de molécules chaperonnes peut améliorer la stabilisation de la conformation 3D de l'enzyme (132), et lui permettre de passer du réticulum endoplasmique au lysosome.

Un essai de différentes molécules chaperonnes pharmaceutiques (133) (dont la 6-acetamido-6-deoxycastanospermine ou ACAS, et la N-acetylglucosamine thiazoline ou NGT), fonctionnant comme des inhibiteurs compétitifs de l'HexA, a montré leur efficacité *in vitro* sur des fibroblastes de patients atteints de forme adulte de maladie de Tay-Sachs (homozygotes *HEXA*:p.Gly269Ser). Ces molécules ont permis d'augmenter le taux d'activité enzymatique à 35 % de celle d'une personne non mutée, un taux compatible avec un catabolisme normal de GM2. Ces deux molécules ont aussi permis la stabilisation de la sous-unité β dans des fibroblastes de patients atteints de forme adulte de Sandhoff (homozygotes *HEXB*:p.Pro504Ser).

Un essai clinique de phase I/II a eu lieu en 2009 (134) pour mesurer la tolérance d'un traitement par Pyriméthamine, un médicament utilisé dans le traitement du paludisme et de la toxoplasmose, qui est également un inhibiteur compétitif de l'HexA. La tolérance était correcte, et a permis une augmentation jusqu'à 4 fois le taux de base de l'activité de l'HexA chez des patients atteints de forme adulte, pour un dosage journalier de 50 mg.

Un essai pilote a été réalisé en 2015 (135) sur 4 patients atteints de forme adulte de maladie de Tay-Sachs. La Pyriméthamine avait été administrée à faible dose (6,25 mg x 3/semaine) et avait permis d'augmenter le taux d'activité de base de l'HexA par un facteur de 2,24 [1,87-3], soit une activité moyenne à 2.2 % par rapport à la norme, et donc bien en dessous du seuil de 10-20 % considéré comme compatible avec une vie normale. Aucune franche amélioration clinique n'avait été observée.

VI.4.4. Thérapies géniques

Une approche qui reste bien sûr intéressante pour les maladies génétiques constitutionnelles est la correction d'un déficit par l'intégration d'une copie saine du gène concerné. Le premier essai sur des modèles murins de gangliosidose à GM2 remonte à 1999 (136), avec comme vecteurs des adénovirus recombinants. Il fut alors mis en évidence que pour obtenir un bénéfice maximal, il fallait que les cellules soit co-infectées par des vecteurs portant la sous-unité α et la sous-unité β .

Cette découverte a été supportée quelques années plus tard (50), en infectant des modèles murins de Sandhoff à l'âge de 4-5 semaines avec des virus adeno-associés recombinants (VAAr). Les injections intra-parenchymateuses ont permis une amélioration neurologique franche de ces souris ainsi qu'une prolongation de leur durée de vie jusqu'à 2 ans, contre 5 mois maximum pour les souris mutées non traitées. Des injections intra-ventriculaires ont eu les mêmes résultats. Leur espérance de vie restait cependant inférieure à celle des souris sauvages. Il est à noter qu'une telle amélioration ne s'est vue que pour les souris traitées en phase pré-symptomatique ou au tout début de leurs symptômes, mais n'a eu aucun effet chez les souris déjà symptomatiques.

Afin de pallier les difficultés techniques d'injection de deux vecteurs différents, l'équipe de Tropak et al. (43) a mis au point une sous-unité d'hexosaminidase hybride (μ) se combinant en un homodimère nommé HexM. Cette sous-unité associe la partie active de la sous-unité α , la partie stable de la sous-unité β et la zone d'interaction avec la GM2-AP. Des essais sur des modèles murins de Tay-Sachs ont permis de mettre en évidence une amélioration du catabolisme des gangliosides à GM2 lors de l'injection de VAAr en intra-parenchymateux. Des injections intraveineuses ont aussi été essayées, réduisant le taux de GM2 intra-cérébral, mais n'atteignant pas des taux normaux.

Cependant, dans l'étude de Golebiowski et al. (137), des injections intra-parenchymateuses et intra-ventriculaires de VAAr portant les sous-unités α et β chez des macaques, ont entraîné une nécrose importante aussi bien de la substance blanche que grise, avec développement d'une ataxie, dyskinésie, voire apathie. L'hypothèse expliquant la neurotoxicité était alors l'hyper-expression de l'HexA cérébrale.

Conclusion

Ainsi, notre patient hétérozygote composite pour le gène *GM2A*, porteur des variants *GM2A:c.79A>T:p.Lys27** et *GM2A:c.415C>T:p.Pro139Ser* présente bel et bien une gangliosidose à GM2 variant AB. Comme nous avons pu le voir dans la littérature, le profil clinique des gangliosidoses à GM2 est très dépendant des mutations sous-jacentes, avec certaines mutations faux-sens beaucoup plus représentées chez les formes adultes pour les maladies de Tay-Sachs et Sandhoff par exemple. Nous pouvons ainsi supposer que le variant p.Pro139Ser, s'il était présent à l'état homozygote, entraînerait une forme adulte comme chez notre patient.

Notre démarche d'étude fonctionnelle nous a permis d'affirmer la pathogénicité du variant p.Pro139Ser, dont l'interprétation était délicate. Cela montre bien la difficulté que peuvent poser certaines mutations, et parfois la nécessité d'aller plus loin que les bases de données et les scores *in silico*.

Nous avons pu également évaluer la sensibilité de différentes méthodes d'étude fonctionnelle explorant l'accumulation de GM2 au sein de fibroblastes, et avons mis en évidence que certaines techniques, notamment la ME et l'IF, ne permettent pas de distinguer un patient normal d'un patient atteint d'une forme adulte de gangliosidose à GM2. De même, l'étude de l'expression génique par RT-PCRq n'a pas permis de mettre en évidence une diminution de l'expression de *GM2A*. Seule la technique réalisée à l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière à Paris nous a permis de mettre en évidence l'accumulation de GM2 chez notre patient, et de montrer que son taux de GM2 était très proche de patients atteints d'une forme adulte de maladie de Tay-Sachs et Sandhoff.

Malheureusement, les progrès thérapeutiques dans les gangliosidoses à GM2 sont très faibles, et il n'existe à l'heure actuellement aucune thérapie curative, même si les progrès récents en thérapie génique ouvrent la voie à de nouveaux traitements. Le variant AB étant la plus rare des formes de gangliosidoses à GM2, avec moins d'une trentaine de cas décrits dans la littérature, il n'y a actuellement aucun essai clinique en cours.

Au vu de l'évolution clinique rapportée dans les différentes revues de la littérature sur les formes adultes de gangliosidose à GM2, nous ne pouvons qu'appuyer la nécessité d'un support soutenu aussi bien sur le plan physique, afin de retarder le plus possible la dégradation motrice, que psychologique, afin de prévenir au mieux des troubles pouvant survenir.

Références bibliographiques

1. Sandhoff K, Harzer K. Gangliosides and Gangliosidoses: Principles of Molecular and Metabolic Pathogenesis. *J Neurosci*. 2013 Jun 19;33(25):10195–208.
2. Mahuran DJ. Biochemical consequences of mutations causing the GM2 gangliosidoses. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Oct 8;1455(2–3):105–38.
3. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA*. 1999 Jan 20;281(3):249–54.
4. Maegawa GHB, Stockley T, Tropak M, Banwell B, Blaser S, Kok F, et al. The natural history of juvenile or subacute GM2 gangliosidosis: 21 new cases and literature review of 134 previously reported. *Pediatrics*. 2006 Nov;118(5):e1550-1562.
5. Toro C, Shirvan L, Tiffet C. HEXA Disorders. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Mirzaa G, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cited 2021 Jul 11]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1218/>
6. Klima H, Tanaka A, Schnabel D, Nakano T, Schröder M, Suzuki K, et al. Characterization of full-length cDNAs and the gene coding for the human GM2 activator protein. *FEBS Lett*. 1991 Sep 9;289(2):260–4.
7. Swallow DM, Islam I, Fox MF, Povey S, Klima H, Schepers U, et al. Regional localization of the gene coding for the GM2 activator protein (GM2A) to chromosome 5q32-33 and confirmation of the assignment of GM2AP to chromosome 3. *Ann Hum Genet*. 1993 Jul;57(3):187–93.
8. Leal AF, Benincore-Flórez E, Solano-Galarza D, Garzón Jaramillo RG, Echeverri-Peña OY, Suarez DA, et al. GM2 Gangliosidoses: Clinical Features, Pathophysiological Aspects, and Current Therapies. *Int J Mol Sci*. 2020 Aug 27;21(17).
9. Schnaar RL. The Biology of Gangliosides. *Adv Carbohydr Chem Biochem*. 2019;76:113–48.
10. Nakayama J, Fukuda MN, Hirabayashi Y, Kanamori A, Sasaki K, Nishi T, et al. Expression Cloning of a Human GT3 Synthase: GD3 AND GT3 ARE SYNTHESIZED BY A SINGLE ENZYME (*). *Journal of Biological Chemistry*. 1996 Feb 16;271(7):3684–91.
11. Yu RK, Tsai Y-T, Ariga T, Yanagisawa M. Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides--an overview. *J Oleo Sci*. 2011;60(10):537–44.
12. Wendeler M, Hoernschemeyer J, Hoffmann D, Kolter T, Schwarzmann G, Sandhoff K. Photoaffinity labelling of the human GM2-activator protein. Mechanistic insight into ganglioside GM2 degradation. *Eur J Biochem*. 2004 Feb;271(3):614–27.
13. Wendeler M, Werth N, Maier T, Schwarzmann G, Kolter T, Schoeniger M, et al. The enzyme-binding region of human GM2-activator protein. *FEBS J*. 2006 Mar;273(5):982–91.

14. Lemieux MJ, Mark BL, Cherney MM, Withers SG, Mahuran DJ, James MNG. Crystallographic structure of human beta-hexosaminidase A: interpretation of Tay-Sachs mutations and loss of GM2 ganglioside hydrolysis. *J Mol Biol.* 2006 Jun 16;359(4):913–29.
15. Seyrantepe V, Demir SA, Timur ZK, Von Gerichten J, Marsching C, Erdemli E, et al. Murine Sialidase Neu3 facilitates GM2 degradation and bypass in mouse model of Tay-Sachs disease. *Exp Neurol.* 2018 Jan;299(Pt A):26–41.
16. Wang Y, Yamaguchi K, Shimada Y, Zhao X, Miyagi T. Site-directed mutagenesis of human membrane-associated ganglioside sialidase: identification of amino-acid residues contributing to substrate specificity. *Eur J Biochem.* 2001 Apr;268(8):2201–8.
17. Aureli M, Mauri L, Ciampa MG, Prinetti A, Toffano G, Secchieri C, et al. GM1 Ganglioside: Past Studies and Future Potential. *Mol Neurobiol.* 2016 Apr;53(3):1824–42.
18. Prokazova NV, Samovilova NN, Gracheva EV, Golovanova NK. Ganglioside GM3 and its biological functions. *Biochemistry (Mosc).* 2009 Mar;74(3):235–49.
19. Tay W. Symmetrical changes in the region of the yellow spot in each eye of an infant. *Trans Oph- thalmol Soc UK.* 1881;
20. Sachs B. On arrested cerebral development, with special reference to its cortical pathology. *J Nerv Ment Dis.* 1887;
21. Sachs B. A family form of idiocy, generally fatal, associated with early blindness (amaurotic family idiocy). *J Nerv Ment Dis.* 1896;
22. Sachs B., Strauss I. The cell changes in amaurotic family idiocy. *J Exp Med.* 1910;
23. Kingdon EC, Russell JSR. Infantile cerebral degeneration with symmetrical changes in the macula. *Proc Royal Med Chirurgical Soc.* 1896;
24. Aronson SM, Valsamis MP, Volk BW. Infantile amaurotic family idiocy. Occurrence, genetic considerations and pathophysiology in the non-Jewish infant. *Pediatrics.* 1960 Aug;26:229–42.
25. Slome D. The genetic basis of amaurotic family idiocy. *J Genet.* 1933;
26. Klenk E. Über die Ganglioside des Gehirns bei der infantilen amaurotischen Idiotie vom Typus Tay-Sachs. *Ber Dtsch Chem Ges.* 1942;
27. Kaback MM, Desnick RJ. Tay-Sachs disease: from clinical description to molecular defect. *Adv Genet.* 2001;44:1–9.
28. Okada S, O'Brien JS. Tay-Sachs disease: generalized absence of a beta-D-N-acetylhexosaminidase component. *Science.* 1969 Aug 15;165(3894):698–700.
29. Sandhoff K. Variation of beta-N-acetylhexosaminidase-pattern in Tay-Sachs disease. *FEBS Lett.* 1969 Aug;4(4):351–4.

30. Sandhoff K, Andrae U, Jatzkewitz H. Deficient hexosaminidase activity in an exceptional case of Tay-Sachs disease with additional storage of kidney globoside in visceral organs. *Life Sci.* 1968 Mar 15;7(6):283–8.
31. de Baecque CM, Suzuki K, Rapin I, Johnson AB, Whethers DL. GM2-gangliosidosis, AB variant: clinico-pathological study of a case. *Acta Neuropathol.* 1975 Dec 19;33(3):207–26.
32. Sandhoff K, Harzer K, Wässle W, Jatzkewitz H. Enzyme alterations and lipid storage in three variants of Tay-Sachs disease. *J Neurochem.* 1971 Dec;18(12):2469–89.
33. Kaback M, Lim-Steele J, Dabholkar D, Brown D, Levy N, Zeiger K. Tay-Sachs disease--carrier screening, prenatal diagnosis, and the molecular era. An international perspective, 1970 to 1993. The International TSD Data Collection Network. *JAMA.* 1993 Nov 17;270(19):2307–15.
34. Neufeld EF. Natural history and inherited disorders of a lysosomal enzyme, beta-hexosaminidase. *J Biol Chem.* 1989 Jul 5;264(19):10927–30.
35. Beutler E, Yoshida A, Kuhl W, Lee JE. The subunits of human hexosaminidase A. *Biochem J.* 1976 Dec 1;159(3):541–3.
36. Geiger B, Arnon R. Chemical characterization and subunit structure of human N-acetylhexosaminidases A and B. *Biochemistry.* 1976 Aug 10;15(16):3484–93.
37. Conzelmann E, Sandhoff K. AB variant of infantile GM2 gangliosidosis: deficiency of a factor necessary for stimulation of hexosaminidase A-catalyzed degradation of ganglioside GM2 and glycolipid GA2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978 Aug;75(8):3979–83.
38. Conzelmann E, Sandhoff K. Purification and characterization of an activator protein for the degradation of glycolipids GM2 and GA2 by hexosaminidase A. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1979 Dec;360(12):1837–49.
39. Meier EM, Schwarzmann G, Fürst W, Sandhoff K. The human GM2 activator protein. A substrate specific cofactor of beta-hexosaminidase A. *J Biol Chem.* 1991 Jan 25;266(3):1879–87.
40. Boedecker HJ, Mellman WJ, Tedesco TA, Croce CM. Assignment of the human gene for hexosaminidase B to chromosome 5. *Exp Cell Res.* 1975 Jul;93(2):468–72.
41. Chern CJ, Kennett R, Engel E, Mellman WJ, Croce CM. Assignment of the structural genes for the alpha subunit of hexosaminidase A, mannosephosphate isomerase, and pyruvate kinase to the region q22-qter of human chromosome 15. *Somatic Cell Genet.* 1977 Nov;3(6):553–60.
42. Triggs-Raine BL, Akerman BR, Clarke JT, Gravel RA. Sequence of DNA flanking the exons of the HEXA gene, and identification of mutations in Tay-Sachs disease. *Am J Hum Genet.* 1991 Nov;49(5):1041–54.
43. Tropak MB, Yonekawa S, Karumuthil-Melethil S, Thompson P, Wakarchuk W, Gray SJ, et al. Construction of a hybrid β -hexosaminidase subunit capable of forming stable

homodimers that hydrolyze GM2 ganglioside in vivo. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2016;3:15057.

44. Ikonne JU, Rattazzi MC, Desnick RJ. Characterization of Hex S, the major residual beta hexosaminidase activity in type O Gm2 gangliosidosis (Sandhoff-Jatzkewitz disease). *Am J Hum Genet.* 1975 Sep;27(5):639–50.
45. Nakai H, Byers MG, Nowak NJ, Shows TB. Assignment of beta-hexosaminidase A alpha-subunit to human chromosomal region 15q23---q24. *Cytogenet Cell Genet.* 1991;56(3–4):164.
46. Korneluk RG, Mahuran DJ, Neote K, Klavins MH, O'Dowd BF, Tropak M, et al. Isolation of cDNA clones coding for the alpha-subunit of human beta-hexosaminidase. Extensive homology between the alpha- and beta-subunits and studies on Tay-Sachs disease. *J Biol Chem.* 1986 Jun 25;261(18):8407–13.
47. Quon DV, Proia RL, Fowler AV, Bleibaum J, Neufeld EF. Proteolytic processing of the beta-subunit of the lysosomal enzyme, beta-hexosaminidase, in normal human fibroblasts. *J Biol Chem.* 1989 Feb 25;264(6):3380–4.
48. Mahuran DJ, Neote K, Klavins MH, Leung A, Gravel RA. Proteolytic processing of pro-alpha and pro-beta precursors from human beta-hexosaminidase. Generation of the mature alpha and beta a beta b subunits. *J Biol Chem.* 1988 Apr 5;263(10):4612–8.
49. O'Dowd BF, Cumming DA, Gravel RA, Mahuran D. Oligosaccharide structure and amino acid sequence of the major glycopeptides of mature human beta-hexosaminidase. *Biochemistry.* 1988 Jul 12;27(14):5216–26.
50. Cachon-Gonzalez MB, Zaccariotto E, Cox TM. Genetics and Therapies for GM2 Gangliosidosis. *Curr Gene Ther.* 2018;18(2):68–89.
51. Fürst W, Schubert J, Machleidt W, Meyer HE, Sandhoff K. The complete amino-acid sequences of human ganglioside GM2 activator protein and cerebroside sulfate activator protein. *Eur J Biochem.* 1990 Sep 24;192(3):709–14.
52. Hou Y, Tse R, Mahuran DJ. Direct determination of the substrate specificity of the alpha-active site in heterodimeric beta-hexosaminidase A. *Biochemistry.* 1996 Apr 2;35(13):3963–9.
53. Kaplan F. Tay-Sachs disease carrier screening: a model for prevention of genetic disease. *Genet Test.* 1998;2(4):271–92.
54. Myerowitz R, Costigan FC. The major defect in Ashkenazi Jews with Tay-Sachs disease is an insertion in the gene for the alpha-chain of beta-hexosaminidase. *J Biol Chem.* 1988 Dec 15;263(35):18587–9.
55. Myerowitz R, Hogikyan ND. A deletion involving Alu sequences in the beta-hexosaminidase alpha-chain gene of French Canadians with Tay-Sachs disease. *J Biol Chem.* 1987 Nov 15;262(32):15396–9.

56. Kytzia HJ, Hinrichs U, Maire I, Suzuki K, Sandhoff K. Variant of GM2-gangliosidosis with hexosaminidase A having a severely changed substrate specificity. *EMBO J*. 1983;2(7):1201–5.
57. Tutor JC. Biochemical characterization of the GM2 gangliosidosis B1 variant. *Braz J Med Biol Res*. 2004 Jun;37(6):777–83.
58. Cao Z, Natowicz MR, Kaback MM, Lim-Steele JS, Prencz EM, Brown D, et al. A second mutation associated with apparent beta-hexosaminidase A pseudodeficiency: identification and frequency estimation. *Am J Hum Genet*. 1993 Dec;53(6):1198–205.
59. Navon R, Proia RL. The mutations in Ashkenazi Jews with adult GM2 gangliosidosis, the adult form of Tay-Sachs disease. *Science*. 1989 Mar 17;243(4897):1471–4.
60. Paw BH, Kaback MM, Neufeld EF. Molecular basis of adult-onset and chronic GM2 gangliosidoses in patients of Ashkenazi Jewish origin: substitution of serine for glycine at position 269 of the alpha-subunit of beta-hexosaminidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Apr;86(7):2413–7.
61. Neote K, McInnes B, Mahuran DJ, Gravel RA. Structure and distribution of an Alu-type deletion mutation in Sandhoff disease. *J Clin Invest*. 1990 Nov;86(5):1524–31.
62. Kleiman FE, de Kremer RD, de Ramirez AO, Gravel RA, Argaraña CE. Sandhoff disease in Argentina: high frequency of a splice site mutation in the HEXB gene and correlation between enzyme and DNA-based tests for heterozygote detection. *Hum Genet*. 1994 Sep;94(3):279–82.
63. Kremer RD, Boldini CD, Capra AP, Levstein IM, Bainttein N, Hidalgo PK, et al. Sandhoff disease: 36 cases from Cordoba, Argentina. *J Inher Metab Dis*. 1985;8(1):46.
64. Venugopalan P, Joshi SN. Cardiac involvement in infantile Sandhoff disease. *J Paediatr Child Health*. 2002 Feb;38(1):98–100.
65. Zhang ZX, Wakamatsu N, Akerman BR, Mules EH, Thomas GH, Gravel RA. A second, large deletion in the HEXB gene in a patient with infantile Sandhoff disease. *Hum Mol Genet*. 1995 Apr;4(4):777–80.
66. Masingue M, Dufour L, Lenglet T, Saleille L, Goizet C, Ayrignac X, et al. Natural History of Adult Patients with GM2 Gangliosidosis. *Ann Neurol*. 2020 Apr;87(4):609–17.
67. Bley AE, Giannikopoulos OA, Hayden D, Kubilus K, Tift CJ, Eichler FS. Natural history of infantile G(M2) gangliosidosis. *Pediatrics*. 2011 Nov;128(5):e1233-1241.
68. Er E, Canda E, Yazıcı H, Eraslan C, Sozmen E, Ucar S, et al. Evaluation Of Demographic And Clinical Characteristics Of Patients With GM2 Gangliosidosis. *The Journal of Pediatric Research*. 2018 Jan 17;
69. Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res*. 2001 May;11(5):863–74.
70. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet*. 2013 Jan;Chapter 7:Unit7.20.

71. Rentzsch P, Witten D, Cooper GM, Shendure J, Kircher M. CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan 8;47(D1):D886–94.
72. Chigorno V, Riva C, Valsecchi M, Nicolini M, Brocca P, Sonnino S. Metabolic processing of gangliosides by human fibroblasts in culture--formation and recycling of separate pools of sphingosine. *Eur J Biochem.* 1997 Dec 15;250(3):661–9.
73. O'Brien JS, Norden GW, Miller AL, Frost RG, Kelly TE. Ganglioside GM2 N-acetyl-beta-D-galactosaminidase and asialo GM2 (GA2) N-acetyl-beta-D-galactosaminidase; studies in human skin fibroblasts. *Clin Genet.* 1977 Mar;11(3):171–83.
74. Banerjee A, Burg J, Conzelmann E, Carroll M, Sandhoff K. Enzyme-linked immunosorbent assay for the ganglioside GM2-activator protein. Screening of normal human tissues and body fluids, of tissues of GM2 gangliosidosis, and for its subcellular localization. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1984 Mar;365(3):347–56.
75. Sakuraba H, Itoh K, Shimmoto M, Utsumi K, Kase R, Hashimoto Y, et al. GM2 gangliosidosis AB variant: clinical and biochemical studies of a Japanese patient. *Neurology.* 1999 Jan 15;52(2):372–7.
76. Tsuji D, Higashine Y, Matsuoka K, Sakuraba H, Itoh K. Therapeutic evaluation of GM2 gangliosidoses by ELISA using anti-GM2 ganglioside antibodies. *Clin Chim Acta.* 2007 Mar;378(1–2):38–41.
77. Schepers U, Glombitza G, Lemm T, Hoffmann A, Chabas A, Ozand P, et al. Molecular analysis of a GM2-activator deficiency in two patients with GM2-gangliosidosis AB variant. *Am J Hum Genet.* 1996 Nov;59(5):1048–56.
78. Pullarkat RK, Reha H, Beratis NG. Accumulation of ganglioside Gm2 in cerebrospinal fluid of a patient with the variant AB of infantile Gm2 gangliosidosis. *Pediatrics.* 1981 Jul;68(1):106–8.
79. Raghavan SS, Krusell A, Krusell J, Lyerla TA, Kolodny EH. GM2-ganglioside metabolism in hexosaminidase A deficiency states: determination in situ using labeled GM2 added to fibroblast cultures. *Am J Hum Genet.* 1985 Nov;37(6):1071–82.
80. Palmeri S, Mangano L, Battisti C, Malandrini A, Federico A. Imipramine induced lipidosis and dexamethasone effect: morphological and biochemical study in normal and chronic GM2 gangliosidosis fibroblasts. *J Neurol Sci.* 1992 Jul;110(1–2):215–21.
81. Navon R, Baram D. Depletion of cellular beta-hexosaminidase by imipramine is prevented by dexamethasone; implications for treating psychotic hexosaminidase-A deficient patients. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987 Nov 13;148(3):1098–103.
82. Anheuser S, Breiden B, Sandhoff K. Ganglioside GM2 catabolism is inhibited by storage compounds of mucopolysaccharidoses and by cationic amphiphilic drugs. *Mol Genet Metab.* 2019 Oct;128(1–2):75–83.
83. Charrow J, Binns HJ. Ganglioside loading of cultured fibroblasts: a provocative method for the diagnosis of the GM2 gangliosidoses. *Clin Chim Acta.* 1986 Apr 15;156(1):41–9.

84. Slevin M, Kumar S, He X, Gaffney J. Physiological concentrations of gangliosides gm1, gm2 and gm3 differentially modify basic-fibroblast-growth-factor-induced mitogenesis and the associated signalling pathway in endothelial cells. *International Journal of Cancer*. 1999;82(3):412–23.
85. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009 Apr;55(4):611–22.
86. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;3(7):research0034.1-research0034.11.
87. Curis E, Nepost C, Grillault Laroche D, Courtin C, Laplanche J-L, Etain B, et al. Selecting reference genes in RT-qPCR based on equivalence tests: a network based approach. *Sci Rep*. 2019 Nov 7;9:16231.
88. Toorani T, Mackie PM, Mastromonaco GF. Validation of reference genes for use in untreated bovine fibroblasts. *Sci Rep*. 2021 May 13;11:10253.
89. González-Bermúdez L, Anglada T, Genescà A, Martín M, Terradas M. Identification of reference genes for RT-qPCR data normalisation in aging studies. *Sci Rep*. 2019 Sep 27;9:13970.
90. Ferreira CR, Gahl WA. Lysosomal storage diseases. *Translational Science of Rare Diseases*. 2017 Jan 1;2(1–2):1–71.
91. Martins C, Brunel-Guitton C, Lortie A, Gauvin F, Morales CR, Mitchell GA, et al. Atypical juvenile presentation of GM2 gangliosidosis AB in a patient compound-heterozygote for c.259G > T and c.164C > T mutations in the GM2A gene. *Mol Genet Metab Rep*. 2017 Jun;11:24–9.
92. Salih MA, Seidahmed MZ, El Khashab HY, Hamad MHA, Bosley TM, Burn S, et al. Mutation in GM2A Leads to a Progressive Chorea-dementia Syndrome. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)*. 2015;5:306.
93. Xie B, Wang W, Mahuran DJ. A Cys138-to-Arg substitution in the GM2 activator protein is associated with the AB variant form of GM2 gangliosidosis. *Am J Hum Genet*. 1992 May;50(5):1046–52.
94. Schröder M, Schnabel D, Hurwitz R, Young E, Suzuki K, Sandhoff K. Molecular genetics of GM2-gangliosidosis AB variant: a novel mutation and expression in BHK cells. *Hum Genet*. 1993 Nov;92(5):437–40.
95. Chen B, Rigat B, Curry C, Mahuran DJ. Structure of the GM2A gene: identification of an exon 2 nonsense mutation and a naturally occurring transcript with an in-frame deletion of exon 2. *Am J Hum Genet*. 1999 Jul;65(1):77–87.
96. Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet*. 2008 Dec;40(12):1413–5.

97. García-Moreno JF, Romão L. Perspective in Alternative Splicing Coupled to Nonsense-Mediated mRNA Decay. *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 10;21(24):9424.
98. Renaud D, Brodsky M. GM2-Gangliosidosis, AB Variant: Clinical, Ophthalmological, MRI, and Molecular Findings. *JIMD Rep*. 2016;25:83–6.
99. Brackmann F, Kehrer C, Kustermann W, Böhringer J, Krägeloh-Mann I, Trollmann R. Rare Variant of GM2 Gangliosidosis through Activator-Protein Deficiency. *Neuropediatrics*. 2017 Apr;48(2):127–30.
100. Sheth J, Datar C, Mistri M, Bhavsar R, Sheth F, Shah K. GM2 gangliosidosis AB variant: novel mutation from India - a case report with a review. *BMC Pediatr*. 2016 Jul 11;16:88.
101. Neudorfer O, Pastores GM, Zeng BJ, Gianutsos J, Zaroff CM, Kolodny EH. Late-onset Tay-Sachs disease: phenotypic characterization and genotypic correlations in 21 affected patients. *Genet Med*. 2005 Feb;7(2):119–23.
102. Frey LC, Ringel SP, Filley CM. The natural history of cognitive dysfunction in late-onset GM2 gangliosidosis. *Arch Neurol*. 2005 Jun;62(6):989–94.
103. Jahnová H, Poupětová H, Jirečková J, Vlášková H, Košťálová E, Mazanec R, et al. Amyotrophy, cerebellar impairment and psychiatric disease are the main symptoms in a cohort of 14 Czech patients with the late-onset form of Tay-Sachs disease. *J Neurol*. 2019 Aug;266(8):1953–9.
104. Conzelmann E, Kytzia HJ, Navon R, Sandhoff K. Ganglioside GM2 N-acetyl-beta-D-galactosaminidase activity in cultured fibroblasts of late-infantile and adult GM2 gangliosidosis patients and of healthy probands with low hexosaminidase level. *Am J Hum Genet*. 1983 Sep;35(5):900–13.
105. Leinekugel P, Michel S, Conzelmann E, Sandhoff K. Quantitative correlation between the residual activity of beta-hexosaminidase A and arylsulfatase A and the severity of the resulting lysosomal storage disease. *Hum Genet*. 1992 Mar;88(5):513–23.
106. Juntas Morales R, Pageot N, Taieb G, Camu W. Adult-onset spinal muscular atrophy: An update. *Revue Neurologique*. 2017 May 1;173(5):308–19.
107. Mendili M-ME, Lenglet T, Stojkovic T, Behin A, Guimarães-Costa R, Salachas F, et al. Cervical Spinal Cord Atrophy Profile in Adult SMN1-Linked SMA. *PLOS ONE*. 2016 Apr 18;11(4):e0152439.
108. Cooper-Knock J, Shaw PJ, Kirby J. The widening spectrum of C9ORF72-related disease; genotype/phenotype correlations and potential modifiers of clinical phenotype. *Acta Neuropathol*. 2014 Mar;127(3):333–45.
109. Salman MS, Clarke JT, Midroni G, Waxman MB. Peripheral and autonomic nervous system involvement in chronic GM2-gangliosidosis. *J Inherit Metab Dis*. 2001 Feb;24(1):65–71.
110. Barritt AW, Anderson SJ, Leigh PN, Ridha BH. Late-onset Tay-Sachs disease. *Pract Neurol*. 2017 Oct;17(5):396–9.

111. Goldman JE, Yamanaka T, Rapin I, Adachi M, Suzuki K, Suzuki K. The AB-variant of GM2-gangliosidosis. Clinical, biochemical, and pathological studies of two patients. *Acta Neuropathol.* 1980;52(3):189–202.
112. Kamensky E, Philippart M, Cancilla P, Frommes SP. Cultured skin fibroblasts in storage disorders. An analysis of ultrastructural features. *Am J Pathol.* 1973 Oct;73(1):59–80.
113. Huang Q, Zhou X, Liu D, Xin B, Cechner K, Wang H, et al. A new liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for quantification of gangliosides in human plasma. *Anal Biochem.* 2014 Jun 15;455:26–34.
114. Gu J, Tifft CJ, Soldin SJ. Simultaneous quantification of GM1 and GM2 gangliosides by isotope dilution tandem mass spectrometry. *Clin Biochem.* 2008 Apr;41(6):413–7.
115. van Eijk M, Ferraz MJ, Boot RG, Aerts JMFG. Lyso-glycosphingolipids: presence and consequences. *Essays in Biochemistry.* 2020 Aug 18;64(3):565–78.
116. Kodama T, Togawa T, Tsukimura T, Kawashima I, Matsuoka K, Kitakaze K, et al. Lyso-GM2 ganglioside: a possible biomarker of Tay-Sachs disease and Sandhoff disease. *PLoS One.* 2011;6(12):e29074.
117. Pettazzoni M, Froissart R, Pagan C, Vanier MT, Ruet S, Latour P, et al. LC-MS/MS multiplex analysis of lysosphingolipids in plasma and amniotic fluid: A novel tool for the screening of sphingolipidoses and Niemann-Pick type C disease. *PLoS One.* 2017;12(7):e0181700.
118. Baudhuin P, Hers HG, Loeb H. AN ELECTRON MICROSCOPIC AND BIOCHEMICAL STUDY OF TYPE II GLYCOGENOSIS. *Lab Invest.* 1964 Sep;13:1139–52.
119. Deduve C. FROM CYTASES TO LYSOSOMES. *Fed Proc.* 1964 Oct;23:1045–9.
120. Johnson WG, Desnick RJ, Long DM, Sharp HL, Krivit W, Brady B, et al. Intravenous injection of purified hexosaminidase A into a patient with Tay-Sachs disease. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1973 Mar;9(2):120–4.
121. von Specht BU, Geiger B, Arnon R, Passwell J, Keren G, Goldman B, et al. Enzyme replacement in Tay-Sachs disease. *Neurology.* 1979 Jun;29(6):848–54.
122. Tsuji D, Akeboshi H, Matsuoka K, Yasuoka H, Miyasaki E, Kasahara Y, et al. Highly phosphomannosylated enzyme replacement therapy for GM2 gangliosidosis. *Ann Neurol.* 2011 Apr;69(4):691–701.
123. Matsuoka K, Tamura T, Tsuji D, Dohzono Y, Kitakaze K, Ohno K, et al. Therapeutic Potential of Intracerebroventricular Replacement of Modified Human β -Hexosaminidase B for GM2 Gangliosidosis. *Molecular Therapy.* 2011 Jun 1;19(6):1017–24.
124. Platt FM, Neises GR, Reinkensmeier G, Townsend MJ, Perry VH, Proia RL, et al. Prevention of Lysosomal Storage in Tay-Sachs Mice Treated with N-Butyldeoxynojirimycin. *Science.* 1997 Apr 18;276(5311):428–31.

125. Bembi B, Marchetti F, Guerci VI, Ciana G, Addobbati R, Grasso D, et al. Substrate reduction therapy in the infantile form of Tay-Sachs disease. *Neurology*. 2006 Jan 24;66(2):278–80.
126. Maegawa GHB, Banwell BL, Blaser S, Sorge G, Toplak M, Ackerley C, et al. Substrate reduction therapy in juvenile GM2 gangliosidosis. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2009 Oct 1;98(1):215–24.
127. Norflus F, Tiffit CJ, McDonald MP, Goldstein G, Crawley JN, Hoffmann A, et al. Bone marrow transplantation prolongs life span and ameliorates neurologic manifestations in Sandhoff disease mice. *J Clin Invest*. 1998 May 1;101(9):1881–8.
128. Jacobs JFM, Willemsen M a. a. P, Groot-Loonen JJ, Wevers RA, Hoogerbrugge PM. Allogeneic BMT followed by substrate reduction therapy in a child with subacute Tay-Sachs disease. *Bone Marrow Transplant*. 2005 Nov;36(10):925–6.
129. Stepien KM, Lum SH, Wraith JE, Hendriksz CJ, Church HJ, Priestman D, et al. Haematopoietic Stem Cell Transplantation Arrests the Progression of Neurodegenerative Disease in Late-Onset Tay-Sachs Disease. In: Morava E, Baumgartner M, Patterson M, Rahman S, Zschocke J, Peters V, editors. *JIMD Reports, Volume 41: Focus Issue: Adults and Metabolism* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2018 [cited 2021 Jul 19]. p. 17–23. (JIMD Reports). Available from: https://doi.org/10.1007/8904_2017_76
130. Lee J-P, Jeyakumar M, Gonzalez R, Takahashi H, Lee P-J, Baek RC, et al. Stem cells act through multiple mechanisms to benefit mice with neurodegenerative metabolic disease. *Nat Med*. 2007 Apr;13(4):439–47.
131. Jeyakumar M, Lee J-P, Sibson NR, Lowe JP, Stuckey DJ, Tester K, et al. Neural stem cell transplantation benefits a monogenic neurometabolic disorder during the symptomatic phase of disease. *Stem Cells*. 2009 Sep;27(9):2362–70.
132. Pereira DM, Valentão P, Andrade PB. Tuning protein folding in lysosomal storage diseases: the chemistry behind pharmacological chaperones. *Chem Sci*. 2018 Feb 14;9(7):1740–52.
133. Tropak MB, Reid SP, Guiral M, Withers SG, Mahuran D. Pharmacological enhancement of beta-hexosaminidase activity in fibroblasts from adult Tay-Sachs and Sandhoff Patients. *J Biol Chem*. 2004 Apr 2;279(14):13478–87.
134. Clarke JTR, Mahuran DJ, Sathe S, Kolodny EH, Rigat BA, Raiman JA, et al. An open-label Phase I/II clinical trial of pyrimethamine for the treatment of patients affected with chronic GM2 gangliosidosis (Tay-Sachs or Sandhoff variants). *Mol Genet Metab*. 2011 Jan;102(1):6–12.
135. Osher E, Fattal-Valevski A, Sagie L, Urshanski N, Sagiv N, Peleg L, et al. Effect of cyclic, low dose pyrimethamine treatment in patients with Late Onset Tay Sachs: an open label, extended pilot study. *Orphanet J Rare Dis*. 2015 Apr 17;10:45.
136. Guidotti JE, Mignon A, Haase G, Caillaud C, McDonnell N, Kahn A, et al. Adenoviral gene therapy of the Tay-Sachs disease in hexosaminidase A-deficient knock-out mice. *Hum Mol Genet*. 1999 May;8(5):831–8.

137. Golebiowski D, van der Bom IMJ, Kwon C-S, Miller AD, Petrosky K, Bradbury AM, et al. Direct Intracranial Injection of AAVrh8 Encoding Monkey β -N-Acetylhexosaminidase Causes Neurotoxicity in the Primate Brain. *Human Gene Therapy*. 2017 Jun 1;28(6):510–22.

Annexes

Annexe 1. Protocoles de culture cellulaire.....	104
Annexe 1.1. Décongélation des fibroblastes.....	104
Annexe 1.2. Repiquage des cultures cellulaires.....	105
Annexe 2. Protocoles d'expression génique.....	106
Annexe 2.1. Extraction d'ARN.....	106
Annexe 2.2. Reverse-transcription.....	107
Annexe 2.3. PCR quantitative.....	108
Annexe 2.4. Amorces.....	109
Annexe 3. Consentement du patient.....	110
Annexe 4. Article.....	111

Annexe 1. Protocoles de culture cellulaire

Annexe 1.1. Décongélation des fibroblastes

 <p>Laboratoire du CHU de Limoges</p>	CRYOCONSERVATION DES CULOTS CELLULAIRES ET DECONGELATION Mode opératoire	CYTG ACARY 0052 B
		Approuvé par : CATHERINE YARDIN RESPONSABLE TECHNIQUE SECTEUR ACARY
		Page 3/3

IV. DECONGELATION D'UN CULOT CELLULAIRE CRYOCONSERVE

La décongélation a lieu l'après-midi.

- Préparer un flacon de culture 25 cm² et l'identifier en inscrivant le nom, le prénom, le N° d'échantillon
- Ajouter 10 mL de milieu (le même que celui utilisé pour la congélation)
- Préparer de l'eau à 37°C
- Décongeler rapidement le cryotube en le plaçant dans l'eau à 37°C
- Verser le contenu du cryotube décongelé dans le flacon de culture 25 cm²
- Bien agiter puis partager la suspension dans 2 flacons de culture 25 cm²
- Placer les flacons dans l'incubateur à 37°C avec 5% de CO₂ pendant une nuit
- Le lendemain matin, changer le milieu de culture par du CHANG

☞ Note : pour les enfants décédés, s'il reste 2 cryotubes, prévoir une nouvelle cryoconservation de culots cellulaires

Annexe 1.2. Repiquage des cultures cellulaires

 Laboratoire du CHU de Limoges	REPIQUAGE DE CELLULES EN CULTURE Instruction	CYTG ACARY 0001 F
		Approuvé par : CATHERINE YARDIN RESPONSABLE TECHNIQUE SECTEUR ACARY
		Page 1/1

I. OBJECTIF

Cette instruction décrit comment effectuer un repiquage de cultures cellulaires adhérentes.

II. DESCRIPTION

Cette technique s'applique aux cultures en clones ou nappes.

Elle est réalisée dans les salles de culture : salle LA (4CYT02) pour les cultures de liquide amniotique et villosités prélevées in utéro et salle VILLO (4CYT05) pour les cultures de villosités post-expulsion et peau.

La manipulation des flacons de culture est effectuée sous hotte à flux laminaire.

- Décongeler la quantité nécessaire d'aliquots de trypsine EDTA (2 ml/flacon)
- Aspirer le milieu de culture du flacon d'origine
- Ajouter 1 ml de trypsine pour rincer
- Aspirer
- Ajouter 1 ml de trypsine pour décoller les cellules
- Compter le nombre de clones (plus facilement visibles après avoir mis la trypsine) et le noter sur la feuille de culture
- Placer le flacon à l'étuve à environ 37°C pendant environ 1 à 2 min en surveillant le décollement
- Identifier les flacons et labteks de repiquage avec :

Nom / N° Echantillon / milieu (A, B ou C) + date (pour labteks) :



Bien vérifier la concordance de l'identité (NOM + NUMERO D'ECHANTILLON) entre le flacon d'origine et le flacon de repiquage

- Ajouter le milieu de culture dans les supports de repiquage :
 - o 5 ml par flacon de 25 cm²
 - o 2,5 ml par flacon de 12,5 cm²
 - o 1,5 à 2 ml par labtek (2 à 2,5 ml le vendredi)
- Avec une pipette stérile, décoller complètement les clones ou la nappe en aspirant et refoulant sur toute la surface du flacon d'origine
- Répartir la suspension cellulaire dans les supports de repiquage préparés en adaptant le nombre de gouttes en fonction de la densité observée



Bien vérifier la concordance de l'identité (NOM + NUMERO D'ECHANTILLON) entre le flacon d'origine et le flacon de repiquage

- La suspension cellulaire non distribuée est remise dans le flacon d'origine
- Ajouter du milieu dans le flacon d'origine (RPMI complet)
- Homogénéiser tous les supports par agitation douce
- Les placer à l'étuve (37°C +/-1,5°C ; environ 5% CO₂), bouchon dévissé, sur un plateau étiqueté avec la date du repiquage.

Annexe 2. Protocoles d'expression génique

Annexe 2.1. Extraction d'ARN

EXTRACTION ARN - TRIZOL ET MEMBRANE DE SILICE

Date :

Kit d'extraction RNA : miRNeasy Mini (QIAGEN®)

Echantillons :

ETAPES	CONDITIONS	COMMENTAIRES
0 Transport échantillons	Azote liquide RNAlater (QIAGEN)...	
1 Broyage tissulaire Lyse cellulaire Homogénéisation	700 µL de QIAzol Broyage/lyse - 1 min TA - 5 min	
2 Séparation des ARN	140 µL de Chloroforme Mélanger vivement - 15 sec TA - 3 min 12000 g - 15 min - 4°C	
3 Préparation de l'absorption	Récupérer phase aqueuse (300-350-400-450 µL) 1,5 vol éthanol 100% (450-525-600-675 µL) Mélanger à la pipette	
4 Absorption des ARN sur membrane de silice (colonne)	Placer la colonne avec la membrane de silice Déposer 700 µL échantillon > 8000 g - 15 sec - TA Déposer reste échantillon > 8000 g - 15 sec - TA	
5 Digestion par la DNase Rnase free	350 µL tampon RWT* > 8000 g - 15 sec - TA Éliminer le filtrat 80 µL de Dnase I ⁽¹⁾ 20-30°C - 15 min 350 µL tampon RWT* > 8000 g - 15 sec - TA Éliminer le filtrat	
6 Lavages des ARN	500 µL tampon RPE* > 8000 g - 15 sec - TA 500 µL tampon RPE* > 8000 g - 2 min - TA grande vitesse - 1 min - TA	
7 Elution des ARN	45 µL ED RNase free > 8000 g - 1 min - TA	

TA : 15-25°C

Centrifugation à > 8000 g ou > 10000 rpm

*Compléter avec volume approprié d'éthanol 100%

(1) **10 µL DNase I stock + 70 µL de tampon RDD**. Mélanger par retournement. Ne pas vortexer.

DNase I stock = 1500 Kunits + 550 µL eau RNase free. mélanger par retournement. Aliquoter et conserver à -20°C (9 mois). Les aliquots décongelés doivent être conservés à 4°C (6 semaines), ne pas les recongeler.

Annexe 2.2. Reverse-transcription

RT - Transcription inverse miRNA

Date :

Kit de transcription inverse : QuantiTect® Reverse Transcription - QIAGEN

Amorces RT : oligo dT + Random priming

Transcriptase : Quantiscript Reverse Transcriptase

ARN (glace) - date extraction :

Barette	1	2	3	4	5	6	7	8
Nom ARN								
C° ARN (ng/μL)								
Qte ARN (ng)	500	500	500	500	500	500	500	500
V ARN (μL)	###	###	###	###	###	###	###	###
V ARN ARRONDI (μL)	###	###	###	###	###	###	###	###
V ED Rnase free (μL)	###	###	###	###	###	###	###	###
Volume Total (μL)	###	###	###	###	###	###	###	###

Nombre tubes : 10% **0**

Réactifs RT			Volume	C° Finale
gDNA Wipeout Buffer	7	X	2 μL	1 X
H ₂ O mQ nucléase free			0 μL	
H ₂ O mQ nucléase free			12 μL	
ARN (Cf tableau)		ng/μL		0.5 μg
Volume total par tube			14 μL	

Elimination ADN génomique			
Etapes	T en °C	Durée	Cycle(s)
Transcription inverse	42°C	5 min	1
Fin de réaction	4°C	∞	1

puis glace

Réactifs RT			Volume	C° Finale	Vol MIX
Quantiscript RT Buffer	5	X	4 μL	1 X	0 μL
RT Primer Mix (dNTP + primer)			1 μL	? X	0 μL
Quantiscript Reverse Transcrip	?	U/μL	1 μL	? U	0 μL
ARN étape précédente			14 μL		- μL
Volume total par tube			20 μL		### μL

Transcription inverse			
Etapes	T en °C	Durée	Cycle(s)
Transcription inverse	42°C	30 min	1
Inactivation enzyme	95°C	3 min	1
Fin de réaction	4°C	∞	1

Aliquotage

Annexe 2.3. PCR quantitative

PCR en temps réel - RotorGene SYBR green (QIAGEN) - Mise au point

Date : _____ Opérateur : _____
 RotorGene SYBRgreen PCRq (QIAGEN) Lot N° _____

	1	2	3	4	5	6	7	8
ADN								
Amorces								

	9	10	11	12	13	14	15	16
ADN								
Amorces								

	17	18	19	20	21	22	23	24
ADN								
Amorces								

	25	26	27	28	29	30	31	32
ADN								
Amorces								

Nombre tubes :

MIX AVEC AMORCES		Volume	C° Finale	Vol MIX
Rotor-Genes SYBR Green PCR MasterMix	2 X	12.5 µL	1 X	0 µL
Amorces L + R	5 µM	3 µL	0.6 µM	0 µL
H ₂ O mQ nuclease free		6.5 µL		0 µL
ADNc (500 ng/µL) dilué au 1/10 (<100 ng)	ng/µL	3 µL	0 ng	- µL
Volume total par tube		25 µL		### µL

Nombre tubes :

MIX AVEC ADN		Volume	C° Finale	Vol MIX
Rotor-Genes SYBR Green PCR MasterMix	2 X	12.5 µL	1 X	0 µL
Amorces L + R	5 µM	3 µL	0.6 µM	- µL
H ₂ O mQ nuclease free		6.5 µL		0 µL
ADNc (500 ng/µL) dilué au 1/10 (<100 ng)	ng/µL	3 µL	0 ng	0 µL
Volume total par tube		25 µL		### µL

Amplification sur thermocycler :

Etapes	T en °C	Durée	Cycle(s)
Dénaturation initiale	95°C	10 min	1
Dénaturation	95°C	15 sec	40
Hybridation	62°C	15 sec	
Elongation	62°C	30 sec	
Courbe de fusion	72°C-95°C	5 sec	1

Remarques :

Annexe 2.4. Amorces

Nom	Séquence	Sens	Chromosome	Start	End
GM2A-E1E2-F1	CGCAAGCCCACCTGAAAAAG	Forward	5	150632839	150632858
GM2A-E1E2-R1	TCAGGCTTCTGATCACCGCA	Reverse	5	150639369	150639388
GM2A-E1E2-R1.2	GAGCCTGACCCCATCATCGT	Reverse	5	151259833	151259852
GM2A-E1E2-F2	TGCGGTGATCAGAAGCCTGA	Forward	5	150639369	150639388
GM2A-E1E2-R2	CTTTTTCAGGTGGGCTTGCG	Reverse	5	150632839	150632858
GM2A-E2E3-F	AGCCTGACCCCATCATCGTT	Forward	5	150639395	150639414
GM2A-E2E3-R	GCCAATGTAGTCTGTGCATGG	Reverse	5	150646340	150646360
GM2A-E2E3-F2	CTCAGTGTTCATGGGCAGCAC	Forward	5	150639430	150639449
GM2A-E2E3-R2	AGCCACCTCCTTCTCCAAACT	Reverse	5	150646300	150646321
GUSB-E10E11-F	TCTTGGTATCACGACTACGGGC	Forward	7	65964380	65964401
GUSB-E10E11-R	TGCGTTTTTGATCCAGACCCAG	Reverse	7	65967847	65967868
HPRT-E2E3-F	TGCTGAGGATTTGGAAAGGGTGT	Forward	X	134473415	134473437
HPRT-E2E3-R	TGATGTAATCCAGCAGGTCAGCA	Reverse	X	134475271	134475293
TBP-E5E6-F	CACGAACCACGGCACTGATTTT	Forward	6	170566952	170566973
TBP-E5E6-R	AAACTTCACATCACAGCTCCCA	Reverse	6	170569710	170569732
TBP-E4E5-F	GACCATTGCACTTCGTGCC	Forward	6	170564590	170564609
TBP-E4E5-R	CCGTGGTTCGTGGCTCTCTT	Reverse	6	170566944	170566963
TBP-E3E4-F	CGGGCACCCTCCACTGTAT	Forward	6	170562134	170562153
TBP-E3E4-R	GTGCCCGAAACGCCGAATAT	Reverse	6	170564604	170564623

Annexe 3. Consentement du patient



Consentement pour publication

Cytogénétique, génétique médicale et biologie de la reproduction

Tél : 05 55 05 86 55

secretariat.cytogenetique@chu-limoges.fr

Nom

Prénom :

Né(e) le : .

Patient mineur

Mère : Nom : Prénom : Née le :

Père : Nom : Prénom : Né le :

Parent de : Nom : Prénom : Né(e) le :

Je donne mon consentement pour la publication d'éléments médicaux anonymisés me concernant (ou concernant la personne que je représente) et éventuellement de données d'imagerie médicale ou photographies de moi-même (ou de la personne la personne que je représente). Je comprends que les informations contenues dans mon dossier médical pourront être utilisées pour l'enseignement médical et pour publication dans des ouvrages ou journaux médicaux spécialisés, dans le but d'améliorer les connaissances concernant la pathologie génétique concernée.

En consentant à cette participation à la recherche et à l'enseignement médical, je comprends que je ne recevrai pas de rétribution financière.

Si je ne donne pas mon consentement, cela n'aura aucune conséquence sur ma prise en charge médicale.

Pour toute question ou si je souhaite retirer mon consentement dans le futur, je peux contacter le service de génétique médicale de Limoges.

En signant ce formulaire, j'atteste que ses termes m'ont été expliqués de façon claire et intelligible.

Date : 01/02/2021

Signature :

GM2 gangliosidosis AB variant : first case of late onset and review of the literature

GANNE Benjamin, DAURIAT Benjamin, RICHARD Laurence, LAMARI Foudil, GHORAB Karima, MARQUET Valentine, YARDIN Catherine, BOURTHOUMIEU Sylvie

Abstract : AB variant is the rarest form of GM2 gangliosidosis, neurodegenerative diseases caused by the lysosomal accumulation of GM2 gangliosides. Less than thirty cases are referenced in the literature, and no late onset form has been described until now. Our proband is a 22-years-old male with spinocerebellar ataxia and lower limbs motor deficiency. His symptoms started at the age of 10 years. A genetic analysis revealed two mutations in the *GM2A* gene encoding an essential cofactor of hexosaminidase A, named GM2 Activator Protein (GM2-AP). Both mutations, *GM2A*:c.79A>T:p.Lys27* and *GM2A*:c.415C>T:p.Pro139Ser, are inherited respectively from his father and from his mother. The stop mutation is pathogenic, but the missense mutation is of unknown significance. To establish the pathogenicity of this variant, GM2 accumulation and *GM2A* gene expression were studied. Electron microscopy and immunofluorescence performed on patient's fibroblasts did not reveal any lysosomal accumulation of GM2, contrary to positive controls obtained from fibroblast cultures exposed to Imipramine. There was also no difference in *GM2A* gene expression using RT-qPCR. Only a liquid phase chromatography – tandem mass spectrometry assay showed an accumulation of GM2 in our patient's plasma, at 83.5 nmol/L (with median of negative control 30.2 nmol/L [19.7-46.8]), and a GM2/GM3 ratio at 0.066 (with median of negative control 0.019). Therefore, the association of both p.Lys27* and p.Pro169Ser mutations leads to a GM2-AP functional deficiency. Whereas the first mutation is more likely to be linked with infantile form of GM2 gangliosidosis, the p.Pro169Ser variant may be the first associated with an adult form of AB variant.

Keywords : GM2 Gangliosidosis, AB Variant, late onset form, *GM2A*, GM2-AP

Introduction

Gangliosides are amphiphilic molecules, discovered by Ernst Klenk in the 1930s (Sandhoff & Harzer, 2013), and more than 180 different types were discovered in vertebrates (Leal et al., 2020).

These glycosphingolipids are metabolized through the Trans-Golgi network from a disaccharide lactosylceramide core (LacCer), on which N-AcetylGalactosamine (GalNac) and galactose (Gal) can be added. They differ by the length of the saccharide chain as well as by the number and position of the N-AcetylNeuraminic substrate (NANA or Neu5Ac).

Their degradation into ceramide requires lysosomal hydrolases and lipid-binding protein, the “Sphingolipid Activator Proteins” (SAPs).

In humans, gangliosides are mainly found in the nervous system, and concentrated in the plasma membrane of neurons, in domains called lipid

rafts (Aureli et al., 2016). They are involved in different cellular functions, such as intercellular recognition, signal transduction or even cell adhesion (Yu et al., 2011; Schnaar, 2019).

GM2 represent only 4-5 % of brain gangliosides, and their degradation into GM3 requires hexosaminidase A (HexA), a heterodimer composed of an α subunit, encoded by *HEXA* (15q23, OMIM*606869#272800), and a β subunit, encoded by *HEXB* (5q13.3, OMIM*606873#268800).

Dimerization of α subunits ($\alpha\alpha$) or β subunits ($\beta\beta$) forms respectively hexosaminidase S (HexS) and hexosaminidase B (HexB). These homodimeric hexosaminidases can not substitute for hexosaminidase A in GM2 ganglioside degradation.

While HexA can cleave both neutral and anionic substrates, HexB can only degrade neutral substrates and catabolizes globosides into

globotriaosylceramides (Tropak et al., 2016). HexS however, does not participate in GM2 degradation *in vivo* (Ikonne et al., 1975; Mahuran, 1999).

The hydrolysis of GM2 also requires a non-enzymatic protein, the GM2 Activator Protein (GM2-AP), encoded by *GM2A* (5q33.1, OMIM*613109#272750). GM2-AP forms a complex with GM2 ganglioside allowing interaction between hexosaminidase A and its membrane embedded substrate, GM2 ganglioside.

Mutations in *HEXA*, encoding the α chain of HexA, leads to Tay-Sachs disease or B variant, while mutations in *HEXB*, encoding the β chain, leads to deficiency of both HexA and HexB causing Sandhoff disease or O variant. Mutations of *GM2A*, encoding GM2-AP, leads to AB variant. This third disease is rarely encountered, and indistinguishable from Tay-Sachs disease.

Pathogenic mutations of those genes are responsible for excessive intralysosomal accumulation of GM2 gangliosides, especially in neuronal cells, resulting in autosomal recessive diseases known as GM2 gangliosidosis.

Different clinical GM2 gangliosidosis subtypes have been described according to the age of onset. The infantile form is mainly characterized by hypotonia and seizures that appear in the first year, with premature death around 4-5 years (Bley et al., 2011). Juvenile forms have an onset between 2 and 10 years' old, with ataxia, psychomotor deterioration, spasticity and seizures, leading to death before adulthood (King et al., 2020). Late onset forms (or adult forms) present with a heterogeneous phenotype and a better prognosis than the previously described forms, with inferior motoneuron deficiency, spinocerebellar ataxia, muscular atrophy and psychiatric disorders (Masingue et al., 2020).

A particular feature of infantile form is the presence of a macular cherry-red spot, which was the first characteristic sign described in Tay-Sachs disease, previously called "familial amaurotic idiocy" (Tay W., 1881).

AB variant is the rarest form, with less than 30 cases described in the literature, with no reported adult forms (Sandhoff & Harzer, 2013).

We describe a 22-year-old patient presenting a phenotype close to the adult form of GM2 gangliosidosis, in whom were detected two mutations in the *GM2A* gene, one known to be pathogenic, whereas the other one belonged to

the group of mutations of unknown significance. We therefore studied GM2 accumulation in his plasma and fibroblasts as well as *GM2A* gene expression, in order to conclude on the pathogenicity or not of the variants.

Patient

Proband is a young man born in 1998 from non-consanguineous parents in good health, as well as his younger brother.

At the age of 10 years, he consulted for gait disorders, associated with length inequality of the lower limbs, calf hypotrophy and claw toes. After a left foot arthrodesis at 16 years' old, his gait disorders worsened, and a spinocerebellar ataxia as well as a motor deficit of the lower limbs settled.

At clinical examination, achilles and patellar osteotendinous reflexes were absent, walking on tiptoes or heels was impossible, and walking on level ground required assistance. In addition to the calf amyotrophy, there was interosseous amyotrophy, associated with slowness of writing without dyspraxia and without motor deficit of the upper limbs.

A neuropsychological test had been carried out at the age of 22, and showed a minimal global alteration of cognitive functions, and slight autistic disorders. The deficits were predominant in memory and executive functioning.

No psychomotor development delay was noted during his childhood. He walked at 13 months, but had poor motor skill. He had no dysphagia, extra-pyramidal symptom or sensory disorder.

A brain MRI performed in 2017 showed discrete atrophy of the cerebellar vermis, slight hyperintensity of posterior horn of the lateral ventricles, without cortical atrophy.

Hexosaminidase A and B enzymatic activity in blood was normal.

A NGS panel for hereditary ataxia showed two mutations in *GM2A* gene (NM_000405) :

- c.79A>T:p.Lys27* ; non-sense variant inherited from his father, not reported in the databases and predicted as likely pathogenic ;
- c.415C>T:p.Pro139Ser ; missense variant, inherited from his mother, reported in the databases (rs767374072) and considered as variant of undetermined significance (VOUS).

To establish the pathogenicity of this last variant which interpretations might be conflicting, we

studied (1) accumulation of GM2 in our patient's fibroblasts using electron microscopy (EM) and immunofluorescence (IF), and in our patient's plasma using liquid chromatography coupled to a tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) and (2) *GM2A* gene expression by RT-qPCR.

Material and methods

Fibroblast cultures

Fibroblast cultures were performed from our patient's cryopreserved fibroblasts and from three healthy negative controls, using Chang medium (CliniSciences, Nanterre, France, Ref T105-100ML) with antibiotics (Penicillin-Streptomycin Mixture; Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany, Ref P0781-20ML) in 25 cm² flasks, under 5 % CO₂ at 37 °C in an incubator.

Positive controls for GM2 gangliosidosis were obtained by exposing fibroblast cultures of healthy negative controls to Imipramine, a tricyclic antidepressant, causing HexA inhibition and GM2 accumulation (Navon & Baram, 1987; Palmeri et al., 1992).

Imipramine (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany, Ref I7379) was reconstituted in PBS at 37 °C to obtain a final concentration of 100 µM in the culture medium.

Gene expression by RT-qPCR

RNA extraction of fibroblast cultures was performed with the miRNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany, Ref 217004), and reverse transcription with the QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen, Hilden, Germany, Ref 205311), according to the supplier's recommendations. cDNA of negative controls (n=6 fibroblast cultures, 2 for each negative control) and proband (n=4 fibroblast cultures) were amplified by real-time PCR using the Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany, Ref 204074) and the Corbett Research RG-6000 thermal cycler (Corbett Research, Australia).

Primers were designed using the Primer Blast software (National Center for Biotechnology Information, Rockville Pike Bethesda, USA) : 3 primer pairs for *GM2A* (one for exons 1-2, and two for exons 2-3), and one primer pair for each reference gene, all supplied by Sigma-Aldrich.

PCRq were performed in duplicate for *GM2A* and in triplicate for reference genes (*HPRT* and *GUSB*). *GM2A* gene expression (Qn) was determined using the Δ Ct method and the

patient/control ratio by $\Delta\Delta$ Ct method (Bustin et al., 2009; Vandesompele et al., 2002).

Ultrastructure of fibroblasts by electron microscopy (EM)

Fibroblast cultures of our patient, negative controls and positive controls were fixed in 2.5 % glutaraldehyde, stained with 2 % osmium tetroxide (OsO₄) and embedded in epoxy resin. The microscope was a JEOL JEM-1400 Flash coupled to a Morada G3 camera (Electron Optic Instrument, West Orange, New Jersey).

Immunofluorescence (IF)

Fibroblast cultures of our patient, negative controls and positive controls were washed twice with PBS for 5 minutes, then fixed with 1 mL of 4 % paraformaldehyde for 15 minutes, rinsed twice with PBS for 5 minutes, and once for 10 minutes. Fibroblasts were permeabilized with 0.1 % Triton X-100 for 2 minutes and then saturated with 1 % BSA (Bovine Serum Albumin) for 45 minutes. They were then stained overnight using a GMB28 mouse monoclonal anti-GM2 (0.5 mg/mL, EMD Milipore Corporation, Temecula, USA, Ref MABN2550-100UL) as primary antibody, at 1:100 and 1:200. The secondary antibody was an Alexa Fluor 488 Goat anti-mouse IgM μ chain (2 mg/mL, Thermo Fisher Scientific, Oregon, USA, Ref A21042) used at 1:1000.

Counterstaining of nuclei was performed with DAPI, and we observed our slides with a Metafer epifluorescence microscope (MetaSystems), coupled with Isis software (MetaSystems), to calculate a percentage of fluorescent cells on each.

Liquid phase chromatography – tandem mass spectrometry assay (LC-MS/MS)

GM2 concentration in our patient's plasma was determined by LC-MS/MS, carried out by Dr Lamari's team at the Pitié-Salpêtrière Hospital in Paris. For GM2 gangliosidosis, their method presents a sensitivity and specificity of 100 % using as cut-off 58.9 nM for GM2 34:1, and 0.032 for the GM2 34:1 / GM3 34:1 ratio.

Results

Analysis by RT-qPCR did not reveal a decrease in *GM2A* gene expression in our patient in comparison to our negative controls, with a mean Qn at 0.459 [0.452-0.467] for our patient against

0.474 [0.461-0.483] for the negative controls. The patient/control ratio at 0.97 corresponds to a normal *GM2A* gene expression.

EM performed on positive controls revealed numerous concentric lamellar inclusions within lysosomes, characteristic of lysosomal storage diseases (Ferreira & Gahl, 2017). In contrast, ultrastructure of patient's fibroblasts did not show a significant increase in these structures compared to negative controls, not allowing them to be reliably distinguished.

The average number of cells labelled by the anti-GM2 antibody (1:100 and 1:200) is 26.1 % (n=4 fibroblast cultures) for our patient, 26.8 % (n=2 fibroblast cultures) for the negative control and 42.6 % (n=2 fibroblast cultures) for the positive control. There is no difference between our patient and negative controls.

However, the LC-MS/MS analysis showed a slight increase in GM2 34:1, measured at 83.5 nmol/L (median control 30.2 nmol/L [19.7-46.8]), as well as in the GM2 34:1 / GM3 34:1 ratio (0.066 for a median control at 0.019). Compared to the pool of patients available to Dr Lamari's team, our patient has a GM2 plasma level close to adult forms, in the first quartile of patients with Tay-Sachs or Sandhoff disease.

Discussion

Electron microscopy and immunofluorescence did not reveal a lysosomal accumulation of GM2, compared to negative and positive controls. There was also no difference in *GM2A* gene expression using RT-qPCR. Only a liquid phase chromatography – tandem mass spectrometry assay showed an accumulation of GM2 in our patient's plasma, corresponding to an adult form of Tay-Sachs or Sandhoff disease.

Few cases of AB variant gangliosidosis have been described in the literature, and almost all of them are juvenile forms where the symptoms appear before the age of 1 year of life with a macular cherry-red spot, psychomotor retardation, hyperacusis, seizures, and axial hypotonia.

A review of the literature of patients with AB variant GM2 gangliosidosis with available genomic data, is presented in table 1.

The only patient who presented symptoms at 12 months of life without macular cherry-red spot, and with axial hypertonia and ataxia in addition to the above “classic” clinical signs, was compound heterozygous for a nonsense variant

(p.Glu87*) and a missense variant (p.Pro55Leu) (Martins et al., 2017). The latter was previously described as pathogenic in the literature, in an Indian family, for which three homozygous relatives developed chorea in childhood (7-8 years), but without cherry-red spot (Salih et al., 2015).

GM2A gene expression was reported in five of the presented patients. Four had normal *GM2A* expression (Schepers et al., 1996; Schröder et al., 1993; Xie et al., 1992), and only the patient from Chen had no mRNA on Northern blot (Chen et al., 1999). The last patient was homozygous for the nonsense mutation p.Glu54*, thus considerably shortening the final protein, compared to other homozygous patients for a missense mutation (p.Cys138Arg or p.Arg169Pro), an inframe deletion mutation (p.Lys88Del) or a frameshift mutation (p.His137Profs*34). The absence of mRNA may be explained by the presence of this premature stop codon, which would direct the RNA to the “Nonsense-Mediated mRNA Decay” system, resulting in its degradation (García-Moreno & Romão, 2020). Gene expression studied in other homozygous patients for a nonsense mutation would have allowed us to verify this hypothesis, but wasn't performed (Renaud & Brodsky, 2016). At brain MRI, the visible lesions were extremely similar. The patients for whom clinical signs started at or before 12 months, two showed periventricular and basal ganglia T2 hyper-signals (Brackmann et al., 2017; Chen et al., 1999), and three had basal ganglia hypersignal with delayed myelination (Brackmann et al., 2017; Renaud & Brodsky, 2016; Sheth et al., 2016). Only patients carrying the p.Pro55Leu mutation, in the heterozygous (Martins et al., 2017) or homozygous state, had brain atrophy without signal alteration (Salih et al., 2015).

Our patient's MRI showed no brain atrophy, but a localized atrophy of the cerebellar vermis comparable to that seen in adult forms of Tay-Sachs disease, and slight aspecific hyperintensity of posterior horn of the lateral ventricles (Masingue et al., 2020; Neudorfer et al., 2005).

A review of the literature on late onset forms of GM2 gangliosidosis had clarified their clinical profile and evolution (Masingue et al., 2020). Almost half of the patients had small signs during childhood, such as clumsiness or poor motor skills, which did not worsen otherwise. The most frequent and earliest neurological manifestation

was lower limb weakness in 81 % of patients, with preferential involvement of the psoas and quadriceps.

Half of the patients had to use a wheelchair after 20 years of disease progression, with a very heterogeneous pattern of gait degradation. Upper limb involvement was never found as the first sign of the disease, and concerned 53 % of the patients, especially the triceps and interosseous muscles.

More than half of the patients had a cerebellar syndrome, which was not proportional to the cerebellar atrophy, present in 73 % of the patients. Only 15 % had cerebral atrophy on brain MRI.

Psychiatric disorders (depression, manic disorder, psychosis) affected about 30 % of patients in Masingue's study, 94 % of whom had Tay-Sachs disease, and could either correspond to the initial disorder of the disease, or be isolated.

Neudorfer's study found the same proportion of clinical manifestations in their population of adult Tay-Sachs patients, except for psychiatric disorders, which were much more frequent (85.7 % versus 30 %) (Neudorfer et al., 2005).

Masingue's study identified four different initial presentations of GM2 gangliosidosis in adults (Masingue et al., 2020) :

- Lower motoneuron disorder responsible for proximal lower limb weakness, with progression to the upper limbs ;
- Cerebellar ataxia (more frequently isolated in Sandhoff patients) ;
- Psychiatric disorder (Tay-Sachs disease only) ;
- Complex clinical picture mixing the three above phenotypes.

The clinical course of our patient resembles that of an adult form of Tay-Sachs : initial involvement of the lower limbs with discrete signs in childhood of poor motor skills, progression to the upper limbs with involvement of the ulnar nerve and interosseous amyotrophy, cerebellar atrophy and slight cognitive impairment. The evolutionary risk of the disease is mainly marked by the need to use a wheelchair to move around, the risk of developing psychiatric symptoms and the occurrence of progressive cognitive decline.

Although all three clinical forms (infantile, juvenile, adult) have been described for Tay-

Sachs and Sandhoff disease, this was not the case for the AB variant, of which we report here the first late onset case.

Neither EM, IF nor RT-qPCR allowed us to demonstrate a lysosomal accumulation of GM2 by functional deficiency of GM2-AP.

On the other hand, the technique developed by Dr Lamari's team at the Pitié-Salpêtrière Hospital in Paris allowed us to show a slight increase of GM2 in our patient's plasma, with a concentration close to adult forms of Tay-Sachs and Sandhoff disease, allowing us to classify our variant of unknown significance until now as pathogenic. Indeed, the first variant, *GM2A:c.79A>T:p.Lys27**, was not already known from the databases. The second one, *GM2A:c.415C>T:p.Pro139Ser*, was only reported once in the Latin American population, with no known homozygous patients in the gnomAD V2.1.1, ExAC or TOPMED databases.

In terms of pathogenicity, it is recognized in the literature that some variants, notably *HEXA:c.805G>A:p.Gly269Ser* (rs121907954) are much more represented in adult forms of Tay-Sachs disease (Navon & Proia, 1989; Paw et al., 1989). Moreover, it has been described in GM2 gangliosidosis that when a premature stop codon is present, the phenotype is often determined by the second allele (Mahuran, 1999).

Similarly, our *GM2A:c.415C>T:p.Pro139Ser* variant, resulting in an adult form of AB variant when coupled to a nonsense mutation, could do the same if present in the homozygous state.

Conclusion

Although late-onset AB variant wasn't reported in the literature until now, our case demonstrates that this pathology indeed follows the same rules as other GM2 gangliosidosis, with the existence of a clinical adult form, more likely to be linked to our *GM2A:c.415C>T:p.Pro139Ser* variant.

Finally, the clinical course of our patient would be similar to that of the adult forms of Tay-Sachs, with foremost a progression of the lower limb deficiency and the necessity to use a wheelchair to move around.

Serment d'Hippocrate

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Étude fonctionnelle chez un patient atteint d'une forme adulte de gangliosidose à GM2 variant AB :

Premier cas et revue de la littérature

Le variant AB est la forme de gangliosidose à GM2 la plus rare, avec moins d'une trentaine de cas décrits dans la littérature, et aucune forme adulte référencée. Notre patient, âgé de 22 ans, présente une ataxie spinocérébelleuse associée à un déficit moteur des membres inférieurs. Ses symptômes ont débuté à l'âge de 10 ans, et il est hétérozygote composite pour le gène *GM2A*, codant pour la protéine GM2-AP, cofacteur essentiel de l'hexosaminidase A. Il est porteur des mutations *GM2A:c.79A>T:p.Lys27** et *GM2A:c.415C>T:p.Pro139Ser*, héritées respectivement du père et de la mère. Cette dernière est un variant de signification indéterminée, et c'est dans l'optique de prouver sa pathogénicité que nous avons réalisé une étude fonctionnelle chez notre patient. La microscopie électronique ainsi que l'immunofluorescence ne nous ont pas permis de montrer une différence d'accumulation de GM2 sur les fibroblastes par rapport à des contrôles négatifs. De même, l'étude de l'expression génique par RT-PCR quantitative du gène *GM2A* n'a pas mis en évidence une diminution de cette dernière. En revanche, une chromatographie en phase liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem a permis de montrer une accumulation de gangliosides GM2 dans le plasma de notre patient, dosés à 83,5 nmol/L (pour une médiane contrôle à 30,2 nmol/L [19,7-46,8]), et avec un ratio GM2/GM3 à 0,066 (pour une médiane contrôle à 0,019). Nous pouvons ainsi affirmer la pathogénicité des deux variants, en particulier du p.Pro169Ser, entraînant un déficit en GM2-AP, ainsi que la présence d'une première forme adulte dans les gangliosidoses à GM2 variant AB.

Mots-clés : gangliosidoses à GM2, variant AB, forme adulte, *GM2A*, GM2-AP

Functional study in a patient with adult form of GM2 gangliosidosis AB variant :

First case and review of the literature

AB variant is the rarest form of GM2 gangliosidosis, with less than thirty cases referenced in the literature, and no adult form described. Our proband is 22 years' old, and presents with spinocerebellar ataxia and lower limbs motor deficiency. His symptoms started at 10 years' old, and he is compound heterozygous for *GM2A*, a gene coding for the essential cofactor of hexosaminidase A, the protein GM2-AP. Both mutations, *GM2A:c.79A>T:p.Lys27** and *GM2A:c.415C>T:p.Pro139Ser*, are inherited from his father and mother respectively. The later mutation is of unknown significance, and therefore we did a functional study to prove its pathogenicity. Electronic microscopy and immunofluorescence on fibroblasts couldn't show any difference between our patient and negative controls in terms of GM2 accumulation. There was also no difference in *GM2A* expression with quantitative RT-PCR. Only a liquid phase chromatography – tandem mass spectrometry assay could show an accumulation of GM2 in our patient's plasma, at 83.5 nmol/L (with median of negative control 30.2 nmol/L [19.7-46.8]), and a GM2/GM3 ratio at 0.066 (with median of negative control 0.019). We therefore can assume the pathogenicity of both variants, especially the p.Pro169Ser, leading to a GM2-AP deficiency, and the first described adult form of variant AB gangliosidosis.

Keywords : GM2 gangliosidosis, AB variant, adult form, *GM2A*, GM2-AP

