



Caractérisation fonctionnelle des variants des gènes *SPTLC1* et *SPTLC2* responsables des Neuropathies Héréditaires Sensitives et Autonomes de type 1 (HSAN 1) - Apport du dosage de déoxysphinganine plasmatique par LC-MS/MS

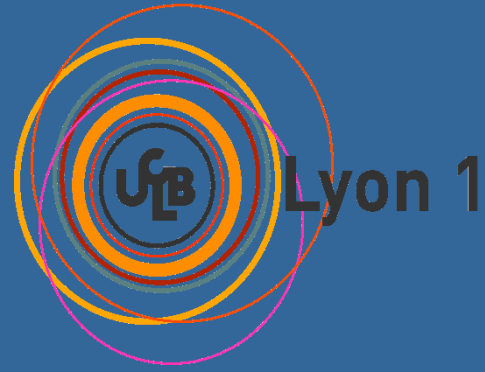
Julie Rochat¹, Séverine Ruet¹, Michèle Trauchessec¹, Raul Juntas Morales², Nathalie Bonello³, David Cheillan^{1,4}

¹ Unité Maladies Héréditaires du Métabolisme, Service de Biochimie et Biologie Moléculaire Grand 22 Est, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon, Bron, France.

² Centre de Référence des maladies neuromusculaires Atlantique Occitanie Caraïbe, Département de Neurologie, CHU Montpellier, Montpellier, France.

³ Département de génétique médicale, Hôpital Timone enfants, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, Marseille, France.

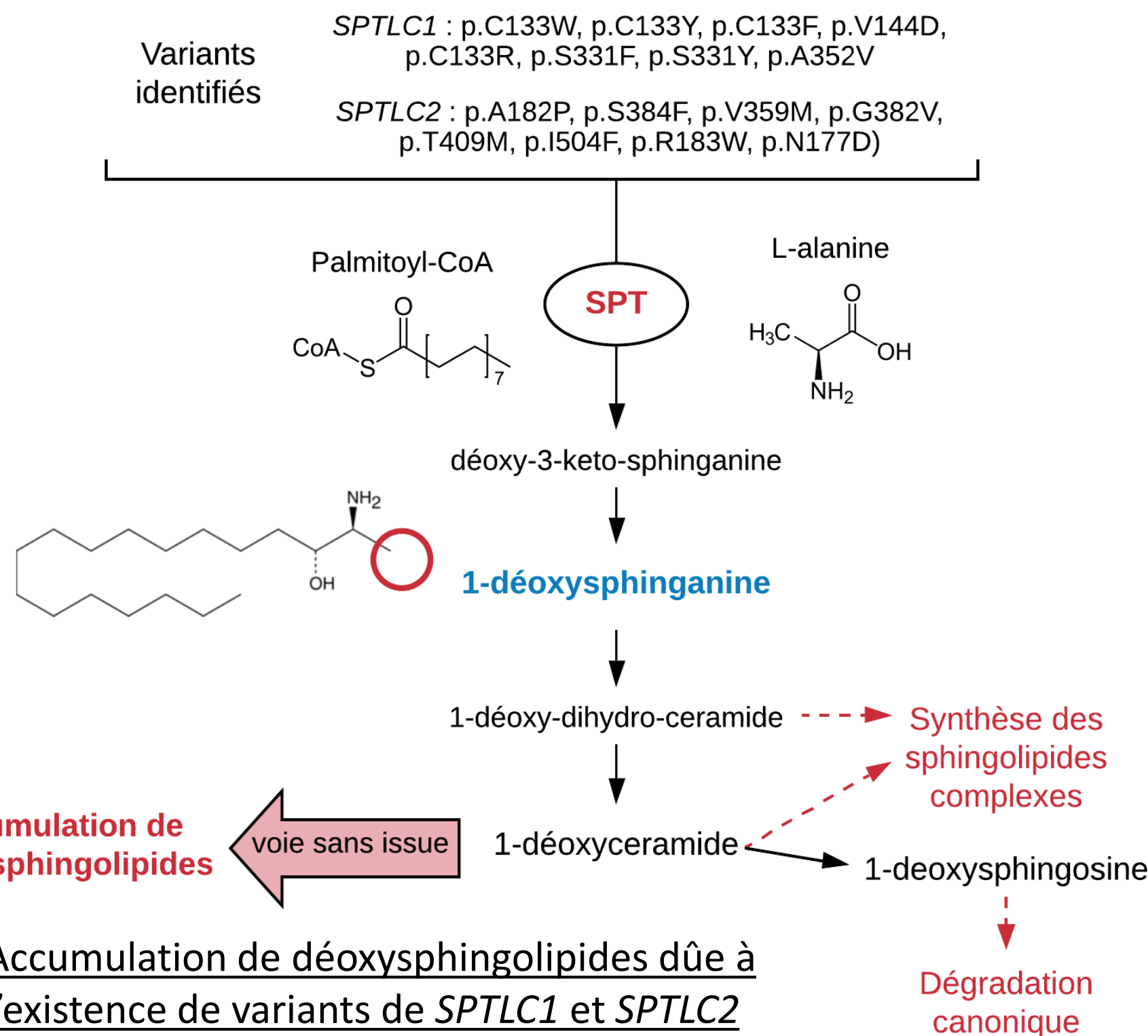
⁴ Univ-Lyon, Laboratoire CarMeN, Inserm U1060, INRAE UMR1397, INSA-Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Pierre Bénite, France.



Introduction

Les neuropathies Héréditaires Sensitives et Autonomes de type 1 (HSAN1) sont la cause la plus fréquente de neuropathies sensibles héréditaires de transmission autosomique dominante. Elles sont caractérisées par une perte de sensibilité au niveau distal, entraînant des ulcérations chroniques, et pouvant être accompagnée de troubles moteurs d'intensité variable et de troubles autonomes. Ces neuropathies HSAN1 sont liées à l'existence de variants des gènes codant pour les sous-unités *SPTLC1* et *SPTLC2* de la Sérine Palmitoyltransférase (SPT), enzyme qui réalise la première étape de la synthèse *de novo* des sphingolipides. Ces variants entraînent un changement de substrat préférentiel de la SPT : l'enzyme va utiliser la L-alanine plutôt que la L-sérine pour réaliser la condensation avec un acyl CoA. Cela aboutit à une impasse métabolique avec accumulation des produits de cette étapes, appelés **déoxysphingolipides**, qui sont des composés neurotoxiques.

Actuellement le diagnostic d'HSAN1 passe par la confrontation de la clinique aux résultats de l'analyse moléculaire, avec mise en évidence de variants hétérozygotes de *SPTLC1* et *SPTLC2*. Grâce aux données de génomique, de nouveaux variants sont mis en évidence, sans que leur caractère délétère soit clairement établi in silico en raison de la difficulté de modélisation dans les bases de données d'un gain de fonction modifiant le site actif de l'enzyme. Leur **caractérisation fonctionnelle** devient donc fondamentale et la mise en place du dosage de déoxysphinganine (dSA) permettrait d'avoir un **biomarqueur** permettant de conclure sur la pathogénicité de ces variants.



Matériel et Méthodes

Validité Technique

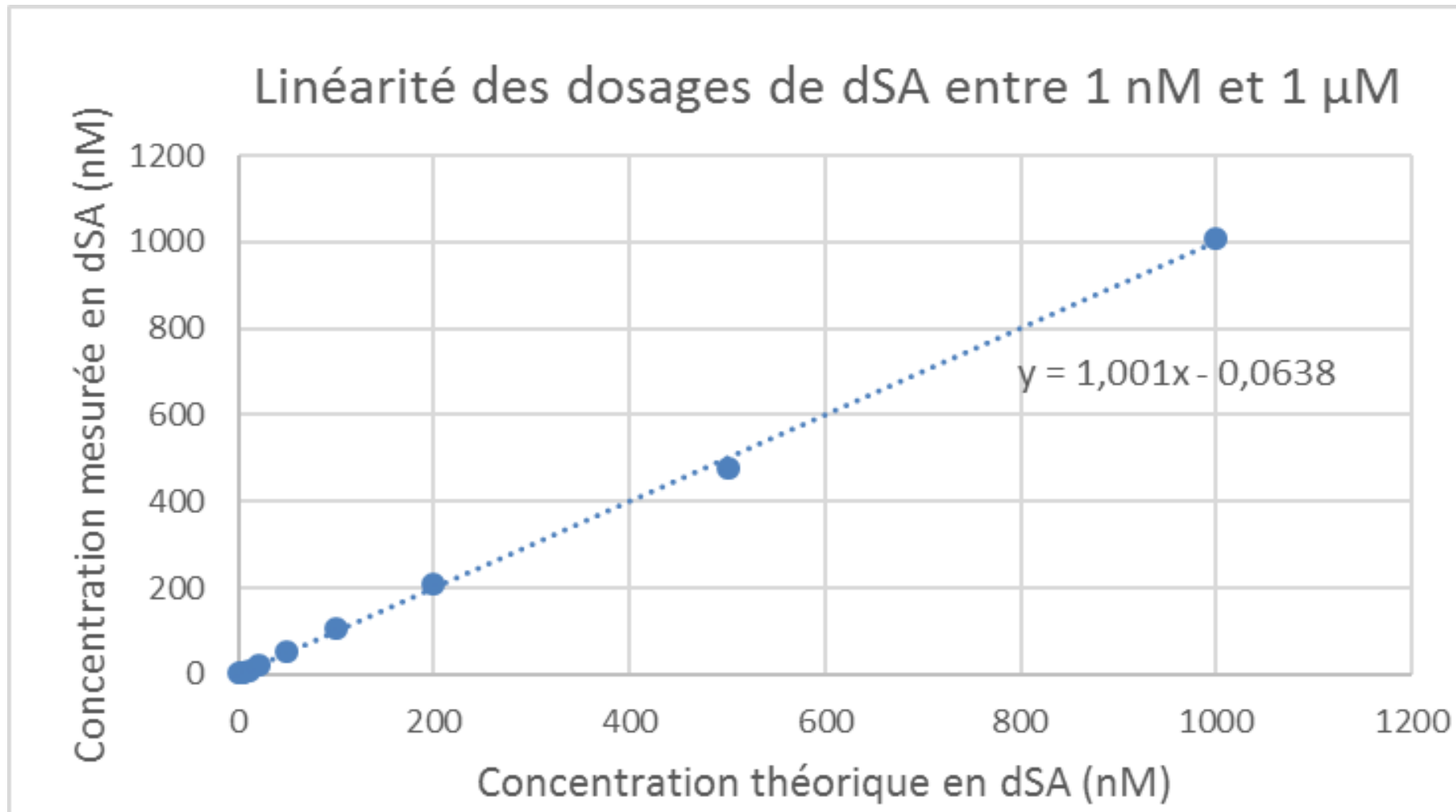
Les dosages de dSA ont été réalisés par LC-MS/MS (C8 – API4500 QTRAP AB Sciex) après extraction lipidique et hydrolyse acide et alcaline. La quantification a été réalisée grâce à un standard interne deutéré (D3 dSA) et par MRM (dSA 286.2/268.2).

Patients

Cinq patients pour lesquels des variants de *SPTLC1* ou *SPTLC2* ont été identifiés ont été étudiés. Les variants identifiés sont reconnus délétères ou de signification inconnue. Ils sont comparés à quarante-six patients contrôles.

Résultats

Validité Technique



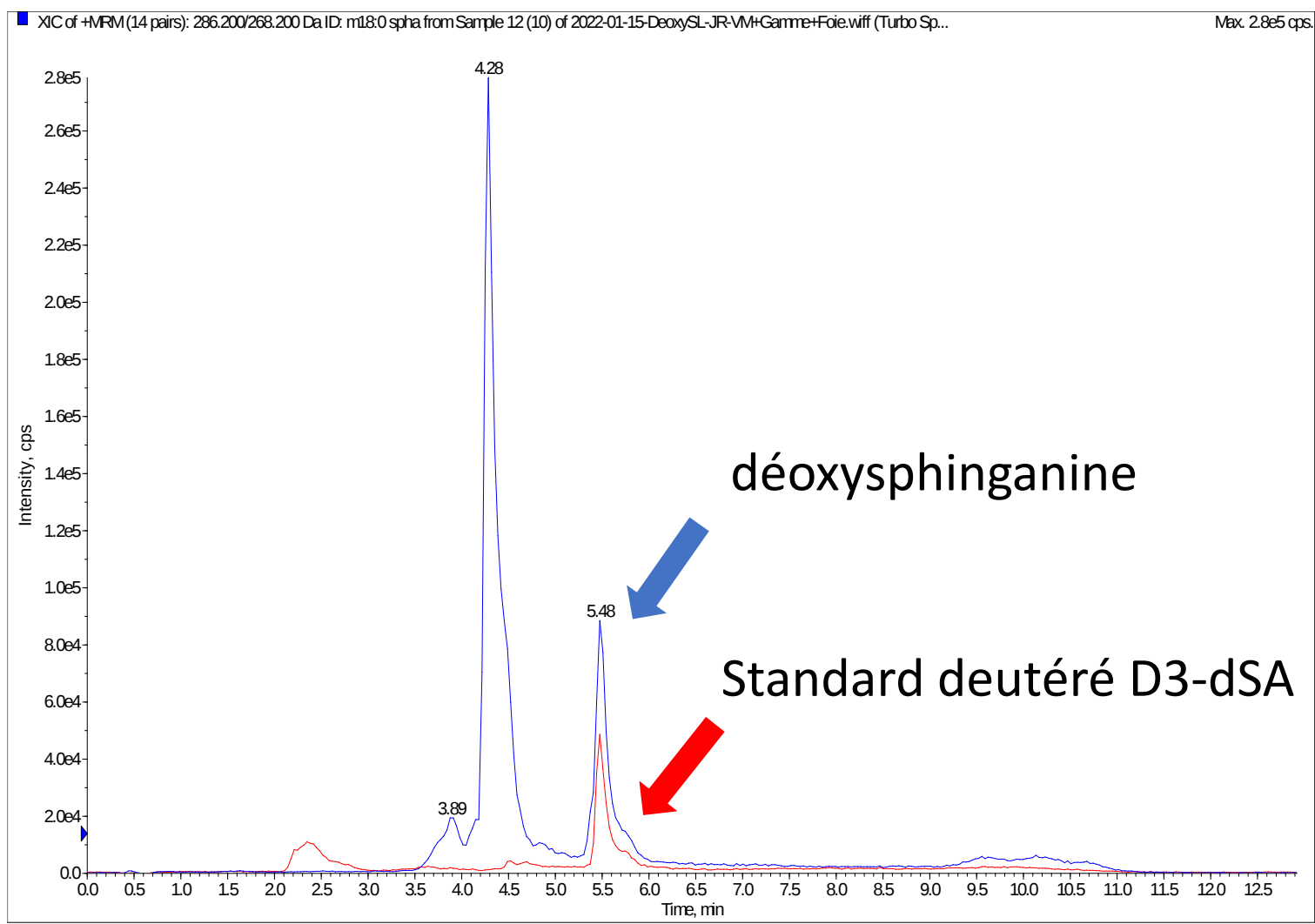
	Niveau 1	Niveau 2
Moyenne (nM)	87,1	569,4
Ecart-type (nM)	4,0	31,2
CV (%)	4,5	5,5
Min (nM)	81,8	510,0
Max (nM)	94,8	606,0

Données de répétabilité

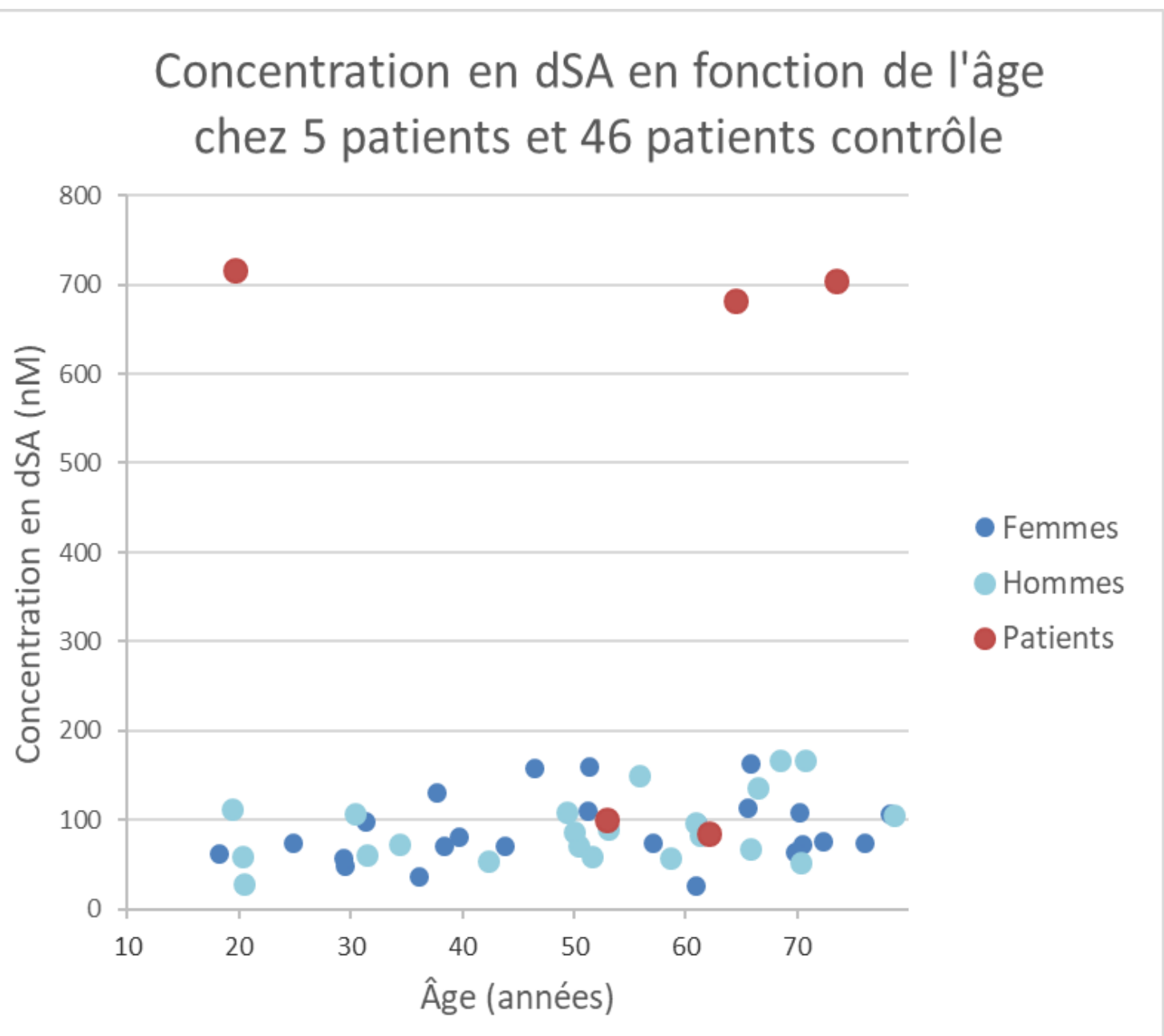
Contamination (%)
2,2

La technique est validée avec une linéarité des dosages de dSA établie entre 1 nM et 1 µM, des CV de répétabilité de 4,5 et 5,5%, et un taux de contamination de 2,2%.

On a également une très bonne séparation du pic de déoxysphinganine sur les profils de LC-MS/MS.



Profil de dosage de dSA chez un patient contrôle en LC-MS/MS

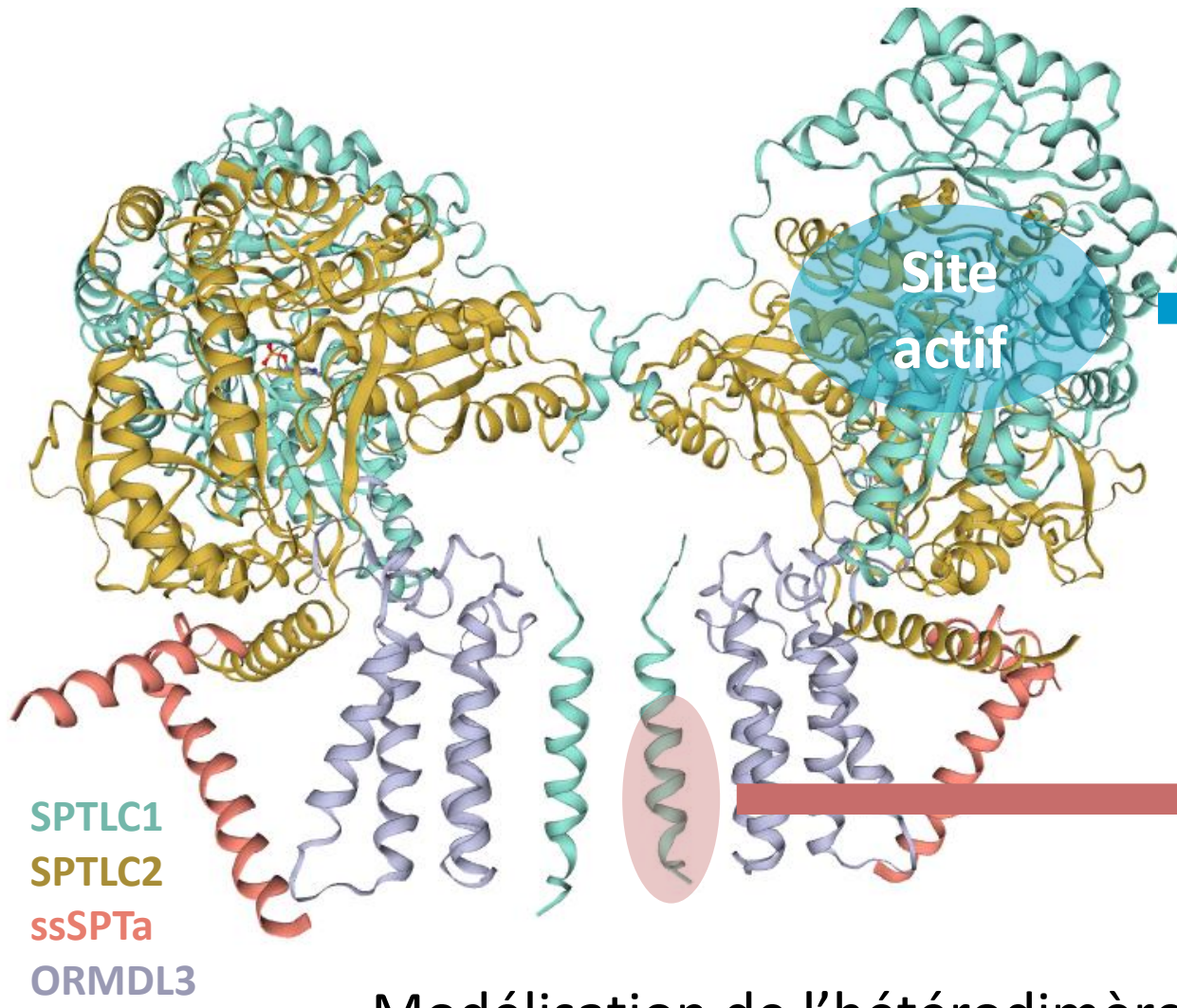


Valeurs normales dSA (nM)	
moyenne	90,2
écart type	36,5
m + 2s	163,2
m - 2s	17,2
< 163 nM	

Le dosage de dSA permet de discriminer clairement les variants pathogènes et probablement pathogènes de ceux bénins ou probablement bénin, au sein d'une population contrôle.

Les résultats obtenus s'expliquent par la localisation du variant par rapport au site actif de l'enzyme.

Patient	Variant identifié	Pathogénicité	dSA (nM)	Caractérisation variant
1	<i>SPTLC1</i> c.992C>T	Classe 5	717	Décrit
2	<i>SPTLC2</i>	/	704	/
3	<i>SPTLC1</i> c.10G>A	Classe 2	84,9	Polymorphisme
4	<i>SPTLC1</i> c.998A>G	Classe 4	682	Non décrit
5	<i>SPTLC1</i> c.71A>G	Classe 2	100	Polymorphisme



Localisation des variations sur *SPTLC1* : c.992C>T et c.998A>G

Localisation des variations sur *SPTLC1* : c.10G>A et c.71A>G

Modélisation de l'hétérodimère de la Sérine Palmitoyl Transférase et ses principales sous-unités régulatrices

Conclusion

Le dosage de déoxysphinganine permet d'une part de confirmer ou d'infirmer le caractère délétère de certains variants non caractérisés, et pourra également permettre d'assurer le suivi de l'efficacité des traitements de supplémentation par L-sérine, qui permettent de favoriser la voie de synthèse canonique des sphingolipides, et ainsi de limiter l'accumulation des déoxysphingolipides. C'est donc un excellent test fonctionnel, complémentaire de l'analyse génomique de première intention.