

Stage d'initiation à la recherche

Dosage de la sorbitol déshydrogénase érythrocytaire pour le diagnostic des neuropathies SORD

BEN SALEM Sirine
DFASP2-PHBMR

FÉVRIER-MARS 2026

Service de biochimie Hôpital Bichat

Sommaire



- 01 Généralités
- 02 Les neuropathies associées au gène SORD
- 03 Diagnostic des neuropathies SORD
- 04 Dosage du sorbitol
- 05 Dosage de la SORD
- 06 Conclusion

Généralités

Neuropathies héréditaires périphériques

CMT - Charcot-Marie-Tooth

Groupe de maladies génétiques caractérisées par :

- une atteinte des nerfs périphériques
- une atteinte motrice et sensitive
- touchant au moins une personne sur 2 500
- présentant une hétérogénéité sur les plans: clinique, électrophysiologique et génétique

dHMN - Distal hereditary motor neuropathy

- une atteinte des nerfs périphériques
- une atteinte uniquement motrice

RESEARCH

Neuropathies associées au gène SORD

Gène SORD

Mutation du gène SORD

Transmission : autosomique récessive

Un des gènes les plus fréquemment mutés dans les CMT2 et dHMN

Mutation la plus fréquente : c.757delG (délétion d'une seule base qui décale le cadre de lecture)

Pseudogène SORD2P

Haute homologie séquence

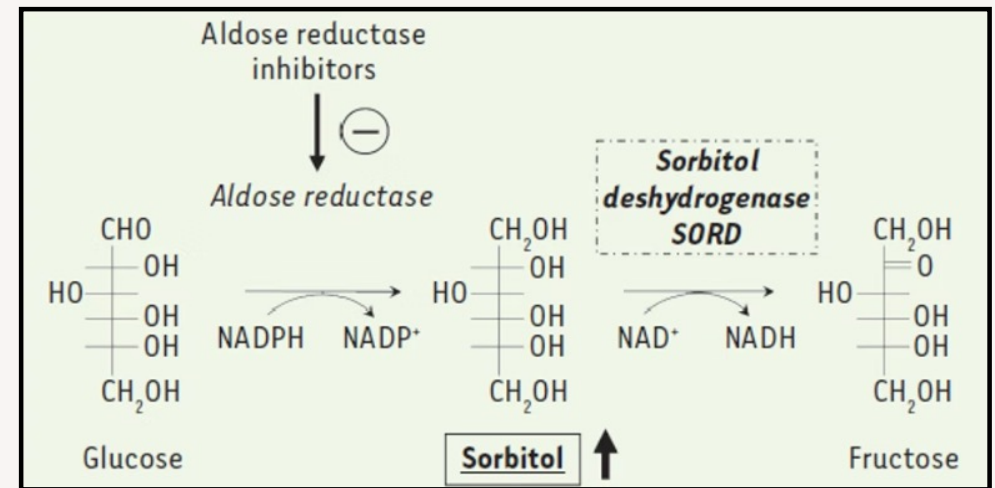
Non fonctionnel → faux positifs au séquençage

VUS - Variant de signification incertaine

Variant génétique ni pathogène confirmé, ni bénin écarté

Fréquent dans SORD

Voie des polyols



→ Dégénérescence axonale distale → neuropathie périphérique progressive

RESEARCH

Zhu Y, Lobato AG, Rebelo AP, Canic T, Ortiz-Vega N, Tao X, et al. Sorbitol reduction via govorestat ameliorates synaptic dysfunction and neurodegeneration in sorbitol dehydrogenase deficiency

Cortese A, Zhu Y, Rebelo A, Negri S, Courel S, Abreu L, et al. BIALLELIC MUTATIONS IN SORD CAUSE A COMMON AND POTENTIALLY TREATABLE HEREDITARY NEUROPATHY WITH IMPLICATIONS FOR DIABETES

Fernández-Eulate G, Bruneel A, Stojkovic T. Les neuropathies héréditaires associées au gène *SORD*.

Tableaux cliniques

Atteinte Motrice

- Faiblesse musculaire distale des membres inférieurs
- Amyotrophie progressive
- Trouble de la marche
- Aréflexie ostéo-tendineuse



Atteinte Sensitive

- Paresthésies distales (fourmillements, brûlures)
- Douleurs nerveuses
- Fatigue chronique



Déformations

- Pieds creux
- Orteils en marteau



Évolution

- Début : 2e–3e décennie
- Évolution lentement progressive

RESEARCH

Pons N, Fernández-Eulate G, Pegat A, Théaudin M, Guieu R, Ripellino P, et al. *SORD* -related peripheral neuropathy in a French and Swiss cohort: Clinical features, genetic analyses, and sorbitol dosages. Fernández-Eulate G, Bruneel A, Stojkovic T. Les neuropathies héréditaires associées au gène *SORD*.

Diagnostic des neuropathies SORD

1 Clinique

2

Analyse génétique

Exome
Recherche de variants bi-alléliques SORD

3

Dosage sorbitol

Spectrométrie de masse HPLC
Biomarqueur indirect - élévation significative

4

Dosage enzymatique SORD

Méthode directe
Activité enzymatique sur globules rouges

Dosage du sorbitol

MÉTHODE INDIRECTE



Principe

- La neuropathie SORD entraîne une augmentation de sorbitol circulant

Technique

- Spectrométrie de masse couplée à l'HPLC
- Échantillon : plasma

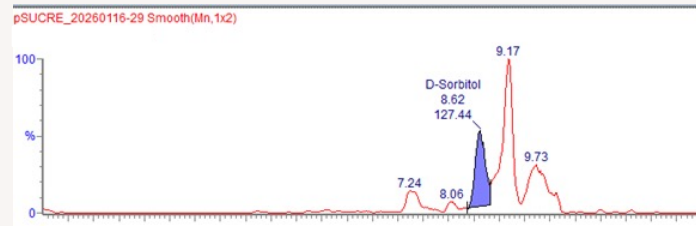
Intérêt clinique

- Permet un dépistage rapide et sensible mais équipements coûteux et personnels qualifiés
- Oriente le diagnostic génétique

Dosage du sorbitol



Patient sain



Concentration sorbitol : 0,3 μ M

Valeur normale < 5 μ M

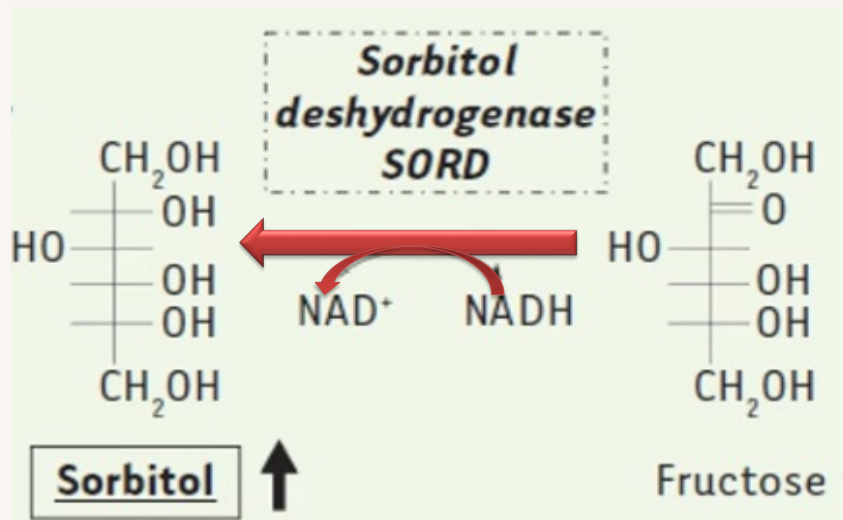
Patient malade



Concentration sorbitol : 58,5 μ M

Dosage de la SORD

MÉTHODE DIRECTE



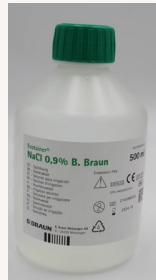
Le dosage de la sorbitol déshydrogénase (GR) repose sur la mesure de la consommation du NADH lors de la réduction du fructose en sorbitol.

Le NADH absorbe à 340 nm

La diminution de l'absorbance à 340 nm est proportionnelle à l'activité de la SORD

PROTOCOLE

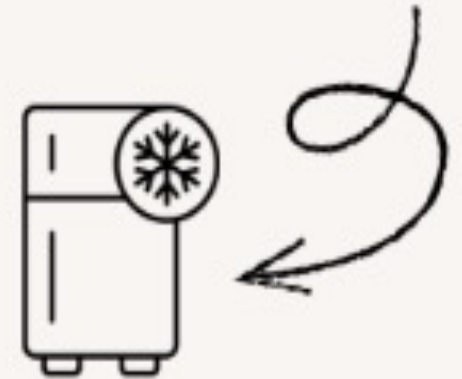
Agiter pour remettre en suspension les globules rouges



Prélever 300 μ L de sang et laver avec 600 μ L de sérum physiologique x3



Récupérer 50 μ L de culot globulaire et ajouter 100 μ L d'eau pour lyser les globules rouges



PROTOCOLE

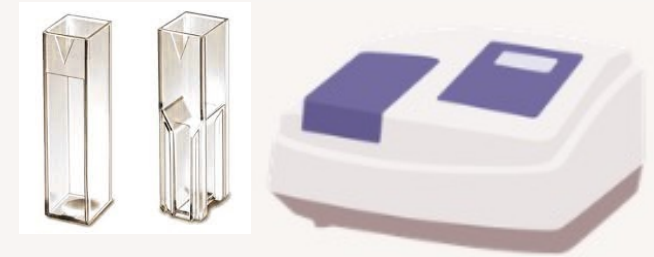
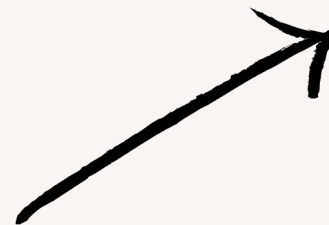


Prélever 2,5 μ L d'hémolysat + 947,5 μ L
d'une solution de NADH (23 mM)/TRIS

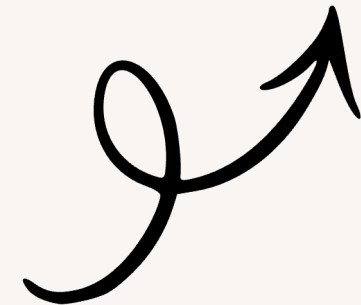


Incubation pendant 45min à 37°C

Ajouter 50 μ L d'un mélange fructose
(5,1 M)/TRIS



Lecture de A340 pendant 30 min

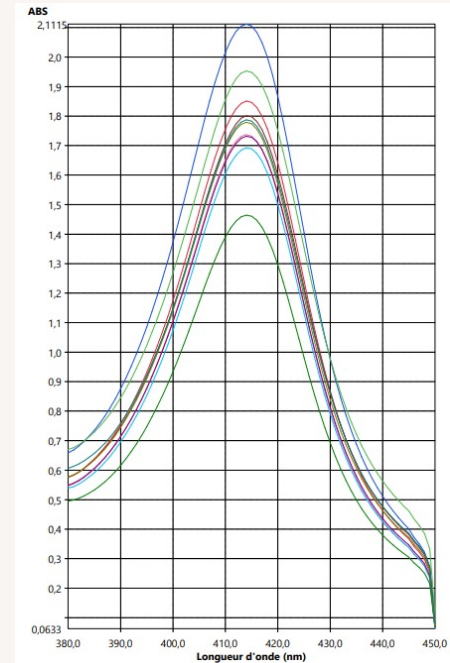
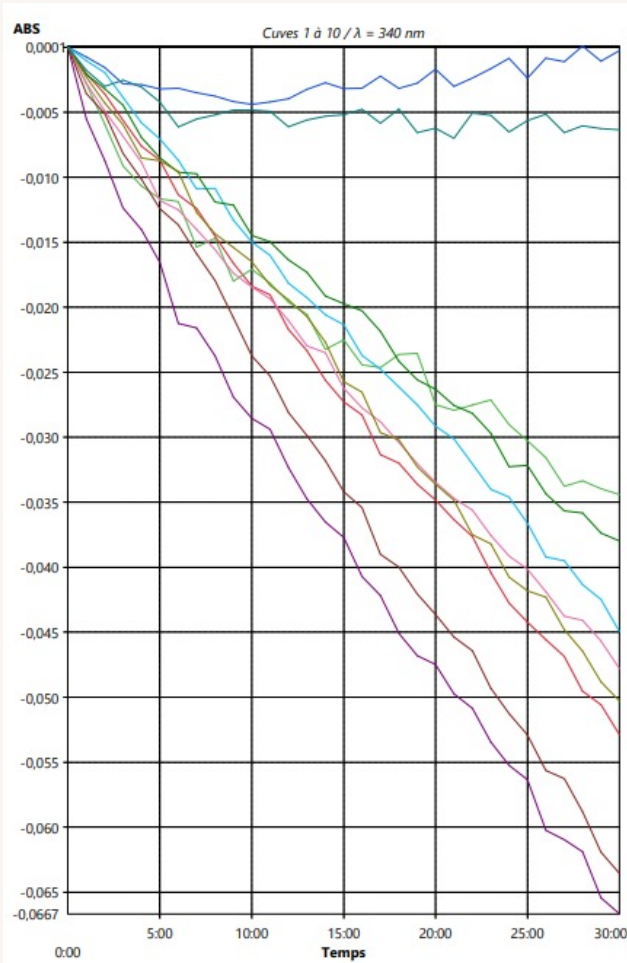


Interprétation des données

Principe : mesure de l'absorbance NADH à 340 nm
 → vitesse de disparition du NADH correspond à l'activité SORD erythrocytaire

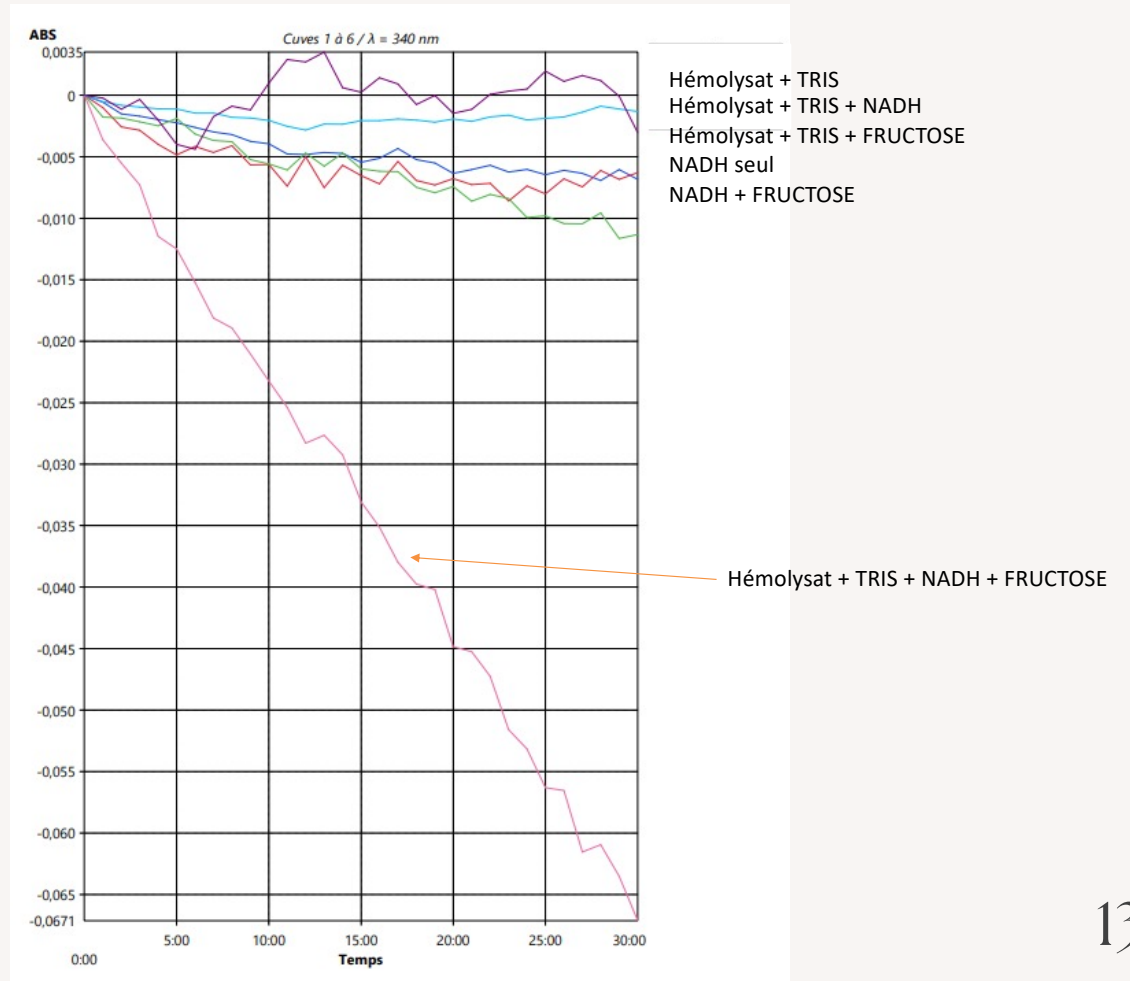
Standardisation : correction par l'hémoglobine

Résultat : en % d'un témoin négatif



Validation analytique

Evaluation de la capacité du test à mesurer uniquement l'activité de la SORD, sans être influencée par d'autres molécules présentes dans l'échantillon



Validation analytique

Performance du test

Sensibilité = 100%

→ Aucun faux négatif / Détecte tous les patients déficitaires

Spécificité = 100%

→ Aucun faux positif / Si test négatif = non malade

Tous les patients avec activité SORD non déficitaires n'ont pas de neuropathie SORD (sorbitol normal)

Tous les patients atteints de neuropathie SORD (sorbitol augmenté) ont une activité SORD déficitaire.

Validation analytique

REPRODUCTIBILITE

N = 17 mesures

Analyse des données d'un
même témoin normal

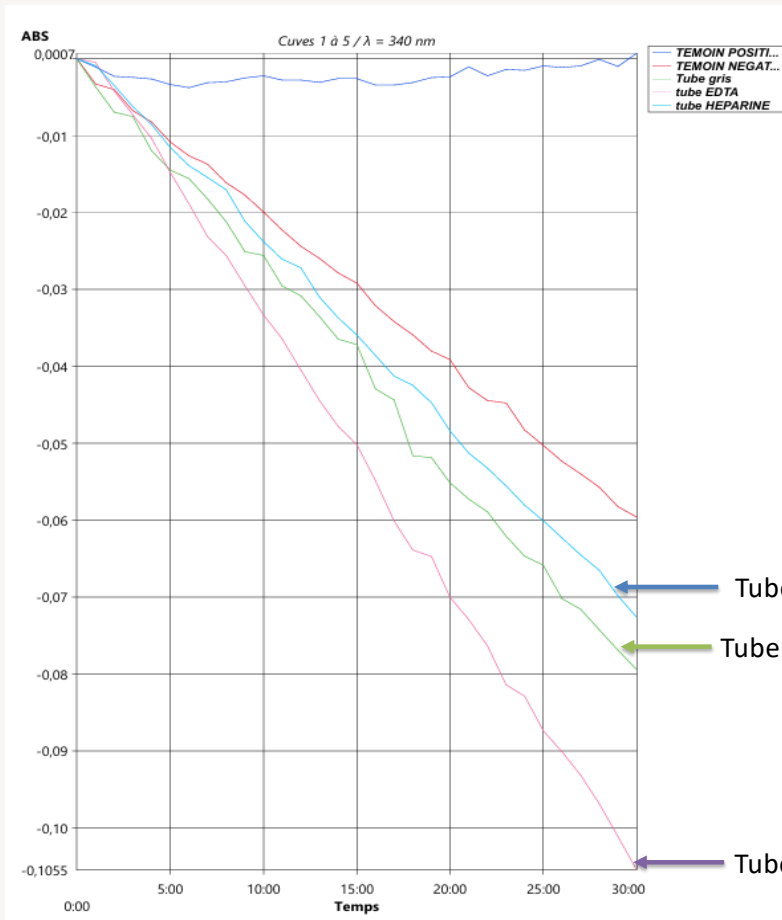
Moyenne (U/g hémoglobine)	1,24370721
Ecart-type	0,11971756
Coefficient de variation (%)	9,62586334

Conditions pré-analytiques

TYPE DE TUBE / CONSERVATION

N=1

Type de tube



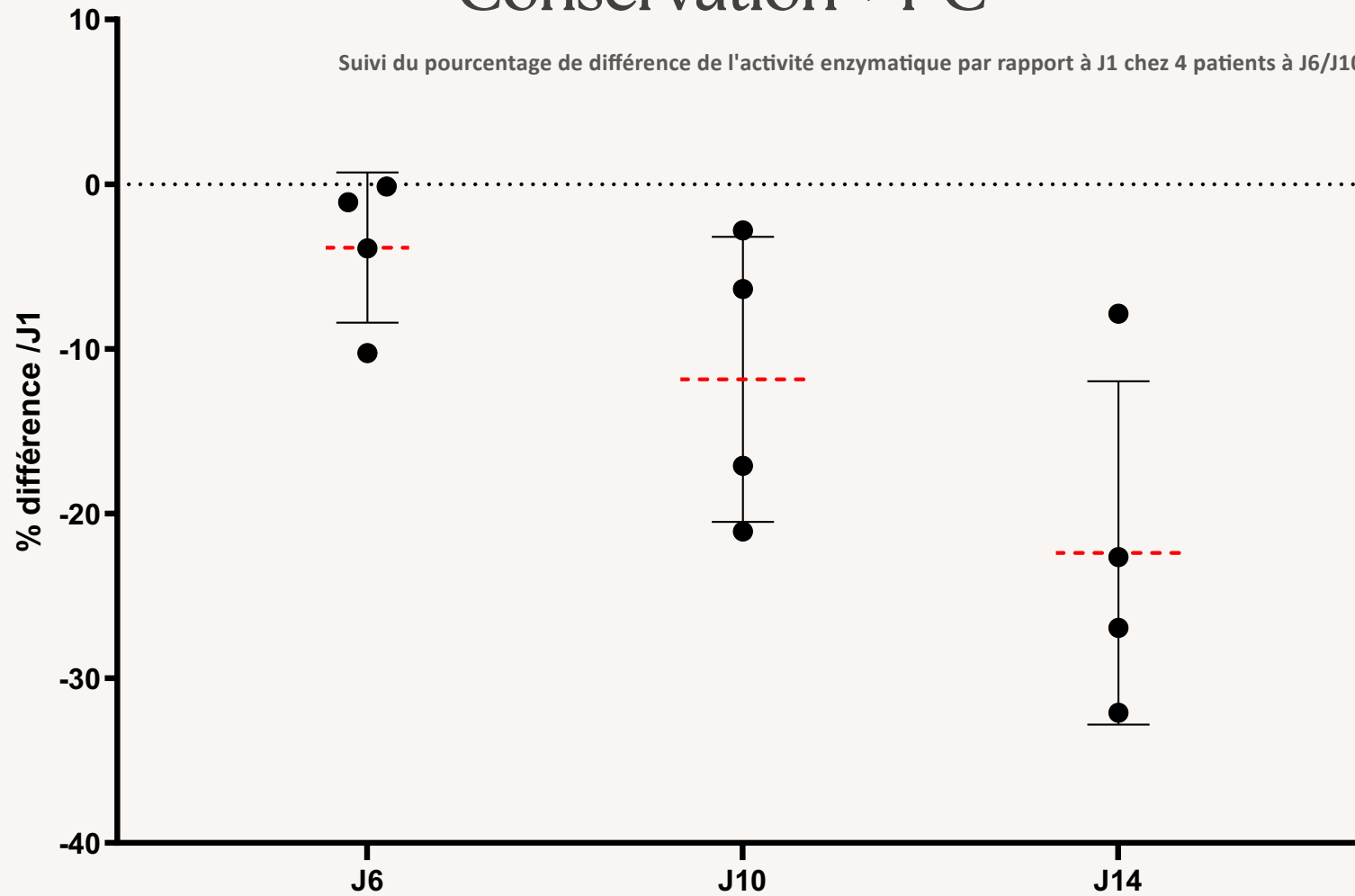
Résultats observés

Les vitesses de disparition du NADH diffèrent selon le type de tube
Le tube EDTA montre l'activité enzymatique la plus marquée

N=4

Conservation +4°C

Suivi du pourcentage de différence de l'activité enzymatique par rapport à J1 chez 4 patients à J6/J10/J14



Dosage enzymatique sur papier Guthrie

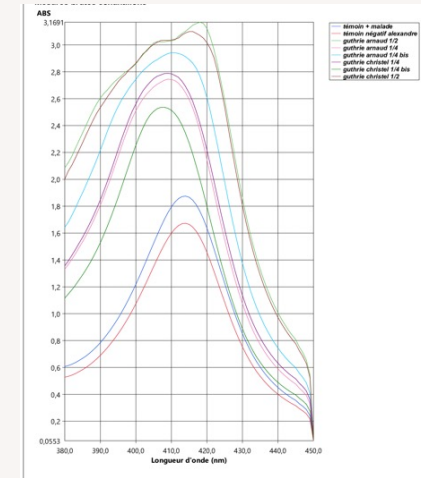
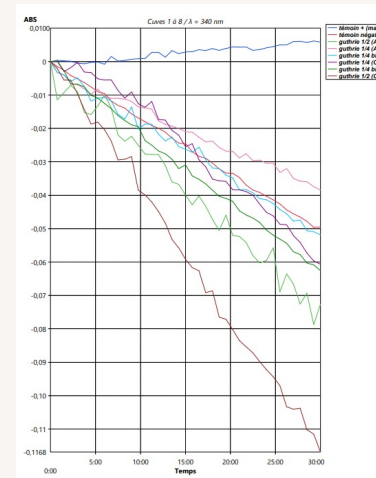
Protocole

1. Découper $\frac{1}{2}$ disque de papier Guthrie
2. Imprégnation dans 942,5 μ L de TRIS
3. Ajout de 5 μ L de NADH et incubation 45 min 37°C
4. Ajout 50 μ L de fructose et incubation 15 min 37°C
5. Lecture au spectrophotomètre

→ spécificité identique à l'hémolysat



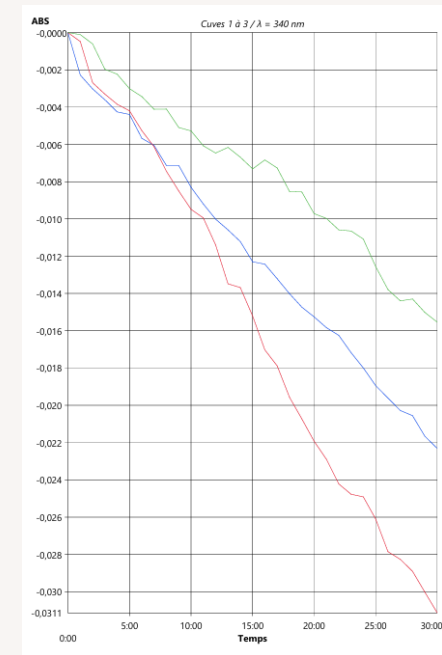
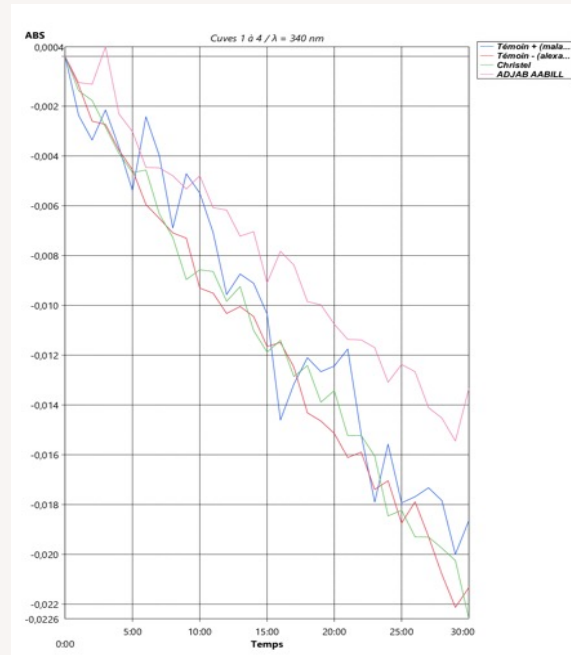
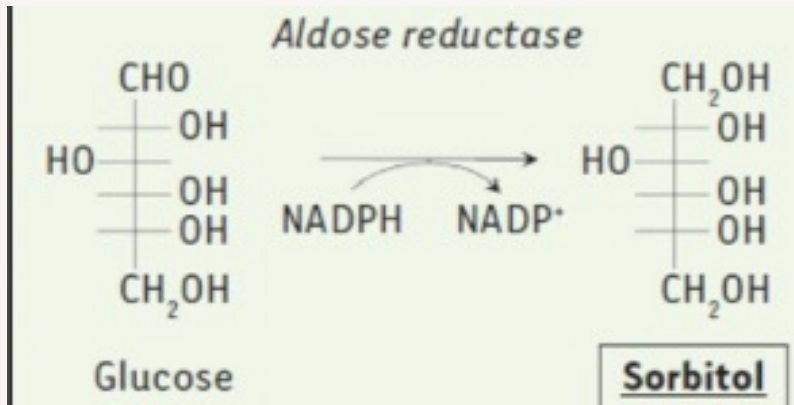
Résultat et conclusion



- Droite décroissante moins propre qu'avec l'hémolysat
 - **LIMITES : l'hémoglobine est ininterprétable**
- Rendu d'un résultat quantitatif (%) impossible**
 ~Méthode approximative (découpe d'un demi disque Guthrie)

Conclusion : Rendu d'un **résultat qualitatif possible**

Dosage enzymatique de l'aldose réductase



NADPH seul

Donc on ne peut pas doser l'aldose reductase ...

Conclusion

- Dosage enzymatique de la SORD (plutôt sur EDTA) : simple, rapide, sensible, spécifique, reproductible et peu coûteux !!!
- Enrichie la démarche diagnostique existante
- Outil de choix pour lever l'incertitude des variants SORD de signification incertaine (VUS)

Remerciements

REMERCIEMENTS À TOUS CEUX QUI ONT CONTRIBUÉ À CE TRAVAIL

Dr Arnaud BRUNEEL

Pour son encadrement bienveillant, le temps qu'il m'a consacré et tout ce qu'il m'a transmis au cours de ce stage

Dr Alexandre RAYNOR

Pour son aide, sa patience et son accompagnement dans ma compréhension

Nicholas MORO

Pour sa présence constante, ses conseils et pour avoir été un véritable compagnon de pailasse

L'équipe du laboratoire

Pour leur accueil, leur disponibilité et leur bienveillance tout au long de ce stage

TEMPS D'ÉCHANGES

Avez-vous
des questions ?



Bibliographie

- (1) Cortese A, Dohrn MF, Curro R, Negri S, Lassuthova P, Pisciotta C, et al. Genotype and phenotype spectrum of Charcot-Marie-Tooth disease due to mutations in SORD. *Brain*. 3 oct 2025;148(10):3737-47. doi:10.1093/brain/awaf021
- (2) Vallat JM, Funalot B. La maladie de Charcot-Marie-Tooth. *médecine/sciences*. oct 2010;26(10):842-7. doi:10.1051/medsci/20102610842
- (3) Parmar JM, Laing NG, Kennerson ML, Ravenscroft G. Genetics of inherited peripheral neuropathies and the next frontier: looking backwards to progress forwards. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 14 mai 2024;95(11):e333436. doi:10.1136/jnnp-2024-333436 PubMed PMID: 38744462; PubMed Central PMCID: PMC11503175.
- (4) Fernández-Eulate G, Bruneel A, Stojkovic T. Les neuropathies héréditaires associées au gène *SORD*. *médecine/sciences*. nov 2021;37:30-1. doi:10.1051/medsci/2021188
- (5) Pons N, Fernández-Eulate G, Pegat A, Théaudin M, Guieu R, Ripellino P, et al. *SORD* -related peripheral neuropathy in a French and Swiss cohort: Clinical features, genetic analyses, and sorbitol dosages. *Eur J Neurol*. juill 2023;30(7):2001-11. doi:10.1111/ene.15793
- (6) Cortese A, Zhu Y, Rebelo A, Negri S, Courel S, Abreu L, et al. BIALLELIC MUTATIONS IN SORD CAUSE A COMMON AND POTENTIALLY TREATABLE HEREDITARY NEUROPATHY WITH IMPLICATIONS FOR DIABETES. *Nat Genet*. mai 2020;52(5):473-81. doi:10.1038/s41588-020-0615-4 PubMed PMID: 32367058; PubMed Central PMCID: PMC8353599.
- (7) Zhu Y, Lobato AG, Rebelo AP, Canic T, Ortiz-Vega N, Tao X, et al. Sorbitol reduction via govorestat ameliorates synaptic dysfunction and neurodegeneration in sorbitol dehydrogenase deficiency. *JCI Insight*. 8(10):e164954. doi:10.1172/jci.insight.164954 PubMed PMID: 37014713; PubMed Central PMCID: PMC10322690.
- (8) Nicholas Moro, Arnaud Bruneel, Alexandre Raynon, et al. Sorbitol dehydrogenase activity measurement for the rapid screening of SORD-related neuropathy

ANNEXES

**Protocole de recherche : mesure de l'activité enzymatique
de la sorbitol déshydrogénase (SORD) par
spectrophotométrie UV-visible**

Sens : fructose vers sorbitol

Etape 1 : Lavage et hémolyse des échantillons

- Remettre en suspension les globules rouges par retournements du tube de sang.
- Après réhomogénéisation du tube vert, prendre 300 μL de **sang total** et ajouter 600 μL de sérum physiologique. Centrifuger 1 minute à la capsule. Enlever le surnageant et répéter l'opération encore 2 fois.
- Une fois le lavage terminé, récupérer 50 μl de culot globulaire et ajouter 100 μL d'eau distillée. Répéter l'opération (au total : **2 hémolysats par patient**).
- Congeler à -80°C pendant 30 minutes minimum. Placer 1 hémolysat sur le portoir « à faire » et 1 hémolysat dans la boîte « Archives ».

Etape 2 : Préparation des substrats et du tampon TRIS (si nécessaire)

- Tampon Tris : ajouter du TRIS poudre dans 500 ml d'eau distillée ; Ajouter du HCl jusqu'à obtention d'un $\text{pH} = 7,4$.
- Fructose 5,1 mol/l : ajouter 2757 mg de fructose (D-fructose Sigma) dans 3 ml de tampon TRIS (falcon 15 ml).
- NADH 23 mmol/l : ajouter 30.6 mg de NADH, H+ dans 2 ml de tampon TRIS (falcon 15 ml).
- Vortexer vigoureusement les falcons pour mélanger de façon homogène.

Préparer des ampoules de tampon + NADH à conserver à -80°C :

Produit	Volume
Tampon TRIS	942,5 μl
NADH 23 mmol/l	5 μl

Etape 3 : Préparation des échantillons avant analyse

- Vortexer vigoureusement l'ampoule réactionnelle décongelée.
- Vortexer vigoureusement le sang décongelé puis le centrifuger à la capsule une trentaine de secondes.
- Ajouter 2,5 μl d'hémolysat aux 947,5 μl d'ampoule réactionnelle dans un eppendorf de 1,5 ml. Bien mélanger.
- Pré-incuber cet eppendorf à 37°C sur le mélangeur eppendorf pendant 45 min.
- Ajouter 50 μl de fructose 5,1 mol/l. Bien mélanger.
- Continuer la pré-incubation pendant 15 min.
- Transférer le contenu de l'eppendorf (1 ml) dans une cuvette de spectrophotomètre.
- Analyser aux longueurs d'onde 340 et 700 nm, 1 point de lecture toutes les 1 min minimum, pendant 15 min.

Sorbitol concentration (µmol/l)	0 min (beginning of reaction)	30 min (midway)	60 min (end of reaction)
Full reaction mix			
Sample 1	20.6	37.1	71.8
Sample 2	15.3	28.7	52.0
Sample 3	20.2	31.6	56.3
Reaction mix lacking fructose			
Sample 1	< 5	< 5	< 5
Sample 2	< 5	< 5	< 5
Sample 3	< 5	< 5	< 5
Reaction mix lacking NADH			
Sample 1	5.6	5.8	5.6
Sample 2	5.8	5.6	5.6
Sample 3	5.7	5.5	5.7

Après le démarrage de la réaction enzymatique, des échantillons sont prélevés à différents temps et analysés par spectrométrie de masse. On observe une **augmentation de la concentration de sorbitol** au cours du temps, ce qui montre que l'enzyme catalyse spécifiquement la transformation du fructose en sorbitol.

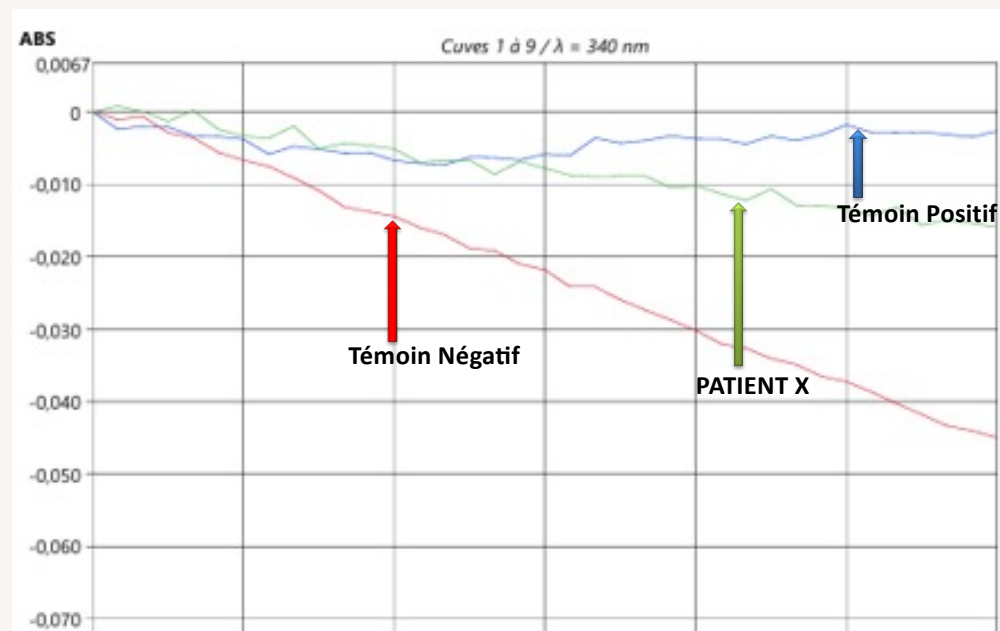
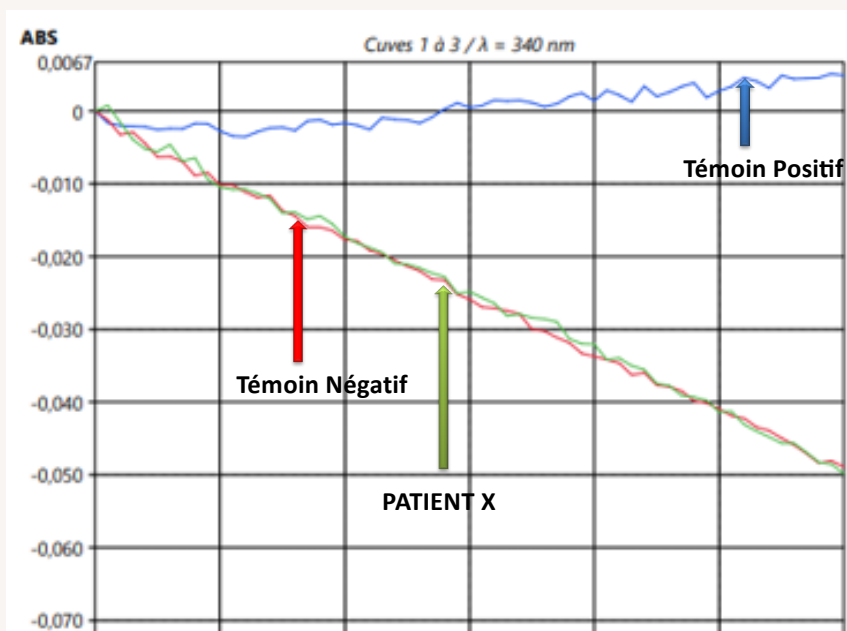


Conservation à température ambiante

N=1

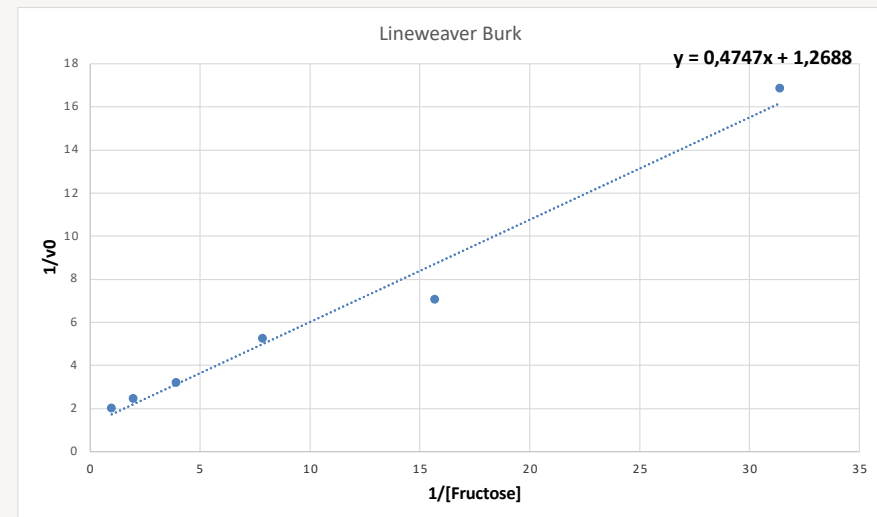
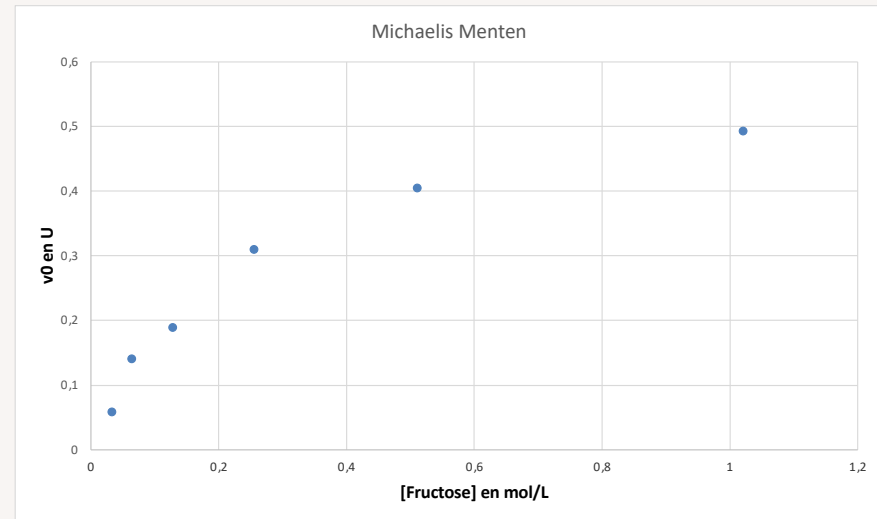
JO

J14



ETUDE CINETIQUE DE LA SORD

Vmax	0,78814628
Km (mol/L)	0,37413304



Différence prix dosage sorbitol VS dosage SORD

DOSAGE SORBITOL

En global: pour un échantillon
35 €
2,50 € l'échantillon supplémentaire

pour info	colonne XbridgeBEH amide sorbitol deutéré (standard interne)	1 000 €	Environ 700/800 injections
	sorbitol	417€/100mg	
	ACN LCMS 1L	389€/125mg	
	H2O LCMS 1L	17 €	
	MeOH LCMS 1L	4 €	
		7 €	

temps de run 15min à un débit de 1mL/min

DOSAGE SORD

Coût du fructose

- Prix : 88,30 € / kg → 0,0883 € / g
- On prépare : 2757 mg = 2,757 g dans 3 mL de TRIS

Soit $2,757 \times 0,0883 = 0,243$ €

On utilise 50 µL sur 3000 µL donc coût par échantillon :
 $0,243 / 60 = 0,00405$ €

Fructose environ 0,004 € par échantillon

Coût du TRIS

- Prix : 160,90 € pour 50 sachets = 3,218 € / sachet

TRIS = 3,22 € / échantillon

Coût du NADH

- Prix : 314 € / g → 0,314 € / mg
- On dissout 30,6 mg dans 2 mL de TRIS

Soit $30,6 \times 0,314 = 9,6084$ €

On prélève 5 µL sur 2000 µL donc coût par échantillon :
 $9,6084 / 400 = 0,024$ €

NADH environ 0,024 € / test

Coût total par échantillon

TOTAL : 3,25 € / échantillon

Temps technicien : 30min