

Université de Poitiers

Faculté de Médecine et de Pharmacie

2021

Thèse n°

**THESE**

**POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

(Arrêté du 17 juillet 1987)

Présentée et soutenue publiquement

le 23 mars 2021 à Poitiers

par Madame BILLY Sandra

née le 16/10/1994

La Porphyrémie Erythropoïétique Congénitale : vers la recherche de nouvelles cibles  
thérapeutiques à l'aide du système CRISPR-Cas9

Composition du jury :

Président :

Madame Laure FAVOT-LAFORGE,                      MCU-HDR                      Biologie cellulaire et moléculaire

Membres :

Monsieur Vincent Thoreau,                      MCU                      Biologie cellulaire

Monsieur Jean-Marc Blouin,                      MCU-PH                      Biochimie et biologie moléculaire

Directeur de thèse :

Madame Guylène Page,                      PU                      Biologie cellulaire et Biothérapie

Université de Poitiers

Faculté de Médecine et de Pharmacie

2021

Thèse n°

**THESE**

**POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

(Arrêté du 17 juillet 1987)

Présentée et soutenue publiquement

le 23 mars 2021 à Poitiers

par Madame BILLY Sandra

née le 16/10/1994

La Porphyrémie Erythropoïétique Congénitale : vers la recherche de nouvelles cibles  
thérapeutiques à l'aide du système CRISPR-Cas9

Composition du jury :

Président :

Madame Laure FAVOT-LAFORGE,                      MCU-HDR                      Biologie cellulaire et moléculaire

Membres :

Monsieur Vincent Thoreau,                      MCU                      Biologie cellulaire

Monsieur Jean-Marc Blouin,                      MCU-PH                      Biochimie et biologie moléculaire

Directeur de thèse :

Madame Guylène Page,                      PU                      Biologie cellulaire et Biothérapie



**PHARMACIE**

**Professeurs**

- CARATO Pascal, PU, chimie thérapeutique
- COUET William, PU-PH, pharmacie clinique
- DUPUIS Antoine, PU-PH, pharmacie clinique
- FAUCONNEAU Bernard, PU, toxicologie
- GUILLARD Jérôme, PU, pharmacochimie
- IMBERT Christine, PU, parasitologie
- MARCHAND Sandrine, PU-PH, pharmacocinétique
- OLIVIER Jean Christophe, PU, galénique
- PAGE Guylène, PU, biologie cellulaire
- RABOUAN Sylvie, PU, chimie physique, chimie analytique
- RAGOT Stéphanie, PU-PH, santé publique
- SARROUILHE Denis, PU, physiologie
- SEGUIN François, PU, biophysique, biomathématiques

**Maîtres de Conférences**

- BARRA Anne, MCU-PH, immunologie-hématologie
- BARRIER Laurence, MCU, biochimie
- BODET Charles, MCU, bactériologie (HDR)
- BON Delphine, MCU, biophysique
- BRILLAULT Julien, MCU, pharmacocinétique, biopharmacie
- BUYCK Julien, MCU, microbiologie,
- CHARVET Caroline, MCU, physiologie
- CHAUZY Alexia, MCU, pharmacologie fondamentale et thérapeutique
- DEBORDE-DELAGE Marie, MCU, sciences physico-chimiques
- DELAGE Jacques, MCU, biomathématiques, biophysique
- FAVOT-LAFORGE Laure, MCU, biologie cellulaire et moléculaire (HDR)

- GIRARDOT Marion, MCU, biologie végétale et pharmacognosie
- GREGOIRE Nicolas, MCU, pharmacologie (HDR)
- HUSSAIN Didja, MCU, pharmacie galénique (HDR)
- INGRAND Sabrina, MCU, toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile, MCU, pharmacochimie
- PAIN Stéphanie, MCU, toxicologie (HDR)
- RIOUX BILAN Agnès, MCU, biochimie
- THEVENOT Sarah, MCU-PH, hygiène et santé publique
- TEWES Frédéric, MCU, chimie et pharmacochimie
- THOREAU Vincent, MCU, biologie cellulaire
- WAHL Anne, MCU, chimie analytique

**Maîtres de Conférences Associés - officine**

- DELOFFRE Clément, pharmacien
- ELIOT Guillaume, pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, pharmacien

**A.T.E.R. (attaché temporaire d'enseignement et de recherche)**

- MIANTEZILA BASILUA Joe, épidémiologie et santé publique

**Enseignants d'anglais**

- DEBAIL Didier

# Remerciements

Aux membres du jury,

Madame Laure FAVOT-LAFORGE, pour avoir accepté de présider ce jury de thèse.

Monsieur Vincent THOREAU, pour avoir accepté de juger mon travail en tant que membre du jury.

Monsieur Jean-Marc BLOUIN, pour ta confiance, ton aide et ta gentillesse tout au long de mes stages. Merci de m'avoir confié ce projet, j'ai beaucoup appris même si je sais qu'il m'en reste encore beaucoup à apprendre ! Merci pour ta patience et ta pédagogie, je te souhaite le meilleure pour la suite de tes projets.

Madame le Professeur Guylène PAGE, ma directrice de thèse, pour votre soutien et votre aide durant la rédaction de cette thèse. Plus généralement, merci pour votre pédagogie et votre implication auprès des étudiants tout au long de leur cursus de Pharmacie. Plus d'un se sont décidés à découvrir la Recherche grâce à vous, je suis bien placée pour le savoir.

À tous les membres de l'Unité U1035 et plus particulièrement à l'équipe Biothérapie et à la plateforme Vect'Ub, pour vos conseils et votre bonne humeur au quotidien. Un immense merci à Magalie de m'avoir accompagnée, j'ai apprécié travailler avec toi, je te souhaite plein de réussites professionnelle et personnelle. Merci à Solène, Grégoire, Juliette, Florence, Pauline et Sandra O. pour votre aide, pour les repas du midi et les happy hours mouvementés !

À Valérie Prouzet-Mauléon, pour ton aide concernant la banque CRISPR et pour ta gentillesse.

Au copines de Pharma, à nos soirées pharma (et les autres), à nos journées à la BU, à nos séances de sport, à nos soirées pyjama (coucou Pia), à notre coloc Louise, aux apéros, aux coups de stress et aux coups de chances. Les petites PH2 ont bien grandi !

À mes amis de Châtelleraut, d'Erasmus et de Grenoble, pour tous les moments passés et pour ceux à venir.

À mes parents, pour m'avoir donné toutes les clés pour m'épanouir professionnellement, et surtout personnellement. Je vous dois mon bien-être et mon équilibre. Merci pour votre soutien infini !

À Paulin, arrivé le même jour que moi sur cette planète, on a pris des chemins bien différents et pourtant... Je te souhaite tout le bonheur du monde et j'ai hâte de rencontrer votre petite puce, à Manon et à toi.

À ma famille, pour m'avoir accueilli à bras ouverts pendant mes années d'études et de vadrouille.

À Hènik. Pour être toi et pour tout le reste. Que l'aventure continue, à Tours, Bordeaux et ailleurs !

Merci

# Table des matières

Figures et Tableaux .....	7
Abréviations .....	9
Préambule .....	11
Introduction.....	12
1. La Porphyrie Erythropoïétique Congénitale.....	14
1.1. Les Porphyries.....	14
1.1.1. La voie de biosynthèse de l'hème .....	15
1.1.2. Porphyries hépatiques .....	18
1.1.3. Porphyries érythropoïétiques .....	23
1.2. Physiopathologie et présentation clinique de la PEC.....	26
1.3. Prise en charge actuelle.....	28
2. Etat de la recherche .....	32
2.1. Thérapie génique.....	32
2.2. Stabilisation de l'enzyme UROS.....	36
2.2.1 Inhibition du protéasome.....	37
2.2.2. Utilisation d'une molécule chaperonne .....	38
2.3. Stratégies de réduction du substrat .....	39
2.3.1. Chélation du fer et Phlébotomie.....	41
2.3.2. Inhibition directe d'ALAS2.....	44
3. Identification de nouvelles cibles thérapeutiques à l'aide du système CRISPR-Cas9.....	49
3.1. Gènes modulateurs .....	49
3.2. CRISPR-Cas9.....	50
3.2.1. Découverte de la technologie CRISPR-Cas9 .....	50
3.2.2. Mécanisme d'action du système CRISPR-Cas9 .....	52

3.2.3.	Applications cliniques et précliniques.....	54
3.2.4.	Criblage génomique par le système CRISPR-Cas9.....	55
3.2.4.1.	Principes .....	55
3.2.4.2.	Choix de la librairie GeCKO.....	58
3.2.4.3.	Transduction de cellules par la banque CRISPR .....	58
3.2.4.4.	Analyse du Next Generation Sequencing.....	59
3.3.	Criblage génomique fonctionnel dans le but d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la porphyrie érythropoïétique congénitale .....	60
3.3.1.	Matériel et Méthodes .....	63
3.3.1.1.	Lignées cellulaires.....	63
3.3.1.2.	Librairie GeCKO.....	64
3.3.1.3.	Production de particules lentivirales et transduction .....	64
3.3.1.4.	RT-PCR.....	66
3.3.1.5.	Détection de la Cas9 par Western Blot .....	67
3.3.1.6.	Cytométrie en flux pour l'analyse de la fluorescence des cellules GFP+ .....	67
3.3.2.	Résultats et discussion .....	68
3.3.2.1.	Création de lignées cellulaires exprimant la Cas9 .....	68
3.3.2.2.	Transduction de la librairie GeCKO et tri cellulaire (FACS).....	70
3.3.2.3.	Discussion et résultats attendus.....	71
	Conclusion .....	76
	Bibliographie et Webographie .....	78
	Résumé.....	91
	Serment de Galien.....	92

# Figures et Tableaux

Figure 1 - Voie de biosynthèse de l'hème et porphyrines. ....	17
Figure 2 – Patients atteints de PEC <sup>57</sup> .....	27
Figure 3 - Couche d'un nourrisson atteint de PEC <sup>67</sup> .....	28
Figure 4 - Correction du phénotype de la PEC d'un modèle murin par thérapie génique additive ex vivo. (Figure adaptée <sup>79</sup> ). ....	34
Figure 5 - Reprogrammation cellulaire et Thérapie génique additive de la PEC. (Figure adaptée <sup>84</sup> ). ....	35
Figure 6 - Régulation de l'expression d'ALAS2 par le fer (Figure adaptée <sup>113</sup> ). ....	41
Figure 7 - Création de lignées cellulaires surexprimant ALAS2.....	45
Figure 8 - Stratégie visant à identifier une molécule inhibitrice d'ALAS2 par un système de criblage fonctionnel.....	46
Figure 9 - Nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement de la PEC.....	47
Figure 10 - Mécanisme supposé du rôle d'ALAS2 en tant que gène modificateur dans la PEC (Figure adaptée <sup>116</sup> ).....	50
Figure 11 - Immunité adaptative bactérienne via le système CRISPR-Cas <sup>133</sup> .....	52
Figure 12 – Evolution du système CRISPR-Cas <sup>987</sup> .....	53
Figure 13 - Mécanismes de réparations des cassures doubles brins <sup>138</sup> .....	54
Figure 14 – Déroulement d'un criblage génomique par knock-out via le système CRISP-Cas9 (Figure adaptée <sup>143</sup> ).....	57
Figure 15 – Systèmes GeCKO à un vecteur (lentiCRISPR v2) ou deux vecteurs (lentiCas9-Blast, lentiGuide-Puro) d'expression (Figure adaptée <sup>145</sup> ).....	59
Figure 16 - Schéma de l'identification de gènes responsables de la réversion du phénotype PEC ou du phénotype porphyrique. ....	61
Figure 17 - Stratégie de criblage génomique afin d'identifier des gènes impliqués dans la modulation de la voie de biosynthèse de l'hème (Figure adaptée <sup>143</sup> ).....	62
Figure 17 – Caractérisation des lignées cellulaires TF1 UROS <sup>WT</sup> et UROS <sup>E10i</sup> .....	63
Figure 19 - Validation de l'expression de la nucléase Cas9 par RT-PCR et Western Blot.....	68
Figure 20 – Analyse cytométrique des cellules TF1 UROS <sup>WT</sup> , TF1 UROS <sup>WT</sup> Cas9, TF1 UROS <sup>E10i</sup> et TF1 UROS <sup>E10i</sup> Cas9 transduites avec un lentivirus-eGFP puis avec un lentivirus-ARNg-eGFP..	69

Figure 21 - Analyse cytométrique des cellules TF1 UROSE10i Cas9 transduites avec la banque Gecko à des MOI de 0.1 et 1 .....	71
Figure 22 - Stratégie de criblage des cellules TF1 UROS <sup>E10i</sup> Cas9 transduites avec la librairie GeCKO.....	72
Tableau 1 - Les différents traitements de la PEC .....	30
Tableau 2 - Amorces utilisées pour amplifier les ADNc Cas9 et Humman-P0 par PCR.....	66
Tableau 3 - Représentativité attendue des ARNg contrôles dans la population Porph- de cellules TF1 UROS <sup>E10i</sup> Cas9 transduites avec la librairie GeCKO. ....	74

# Abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique Complémentaire

ARN : Acide RiboNucléique

ALA : Acide 5-AminoLévulinique

ALAD : Acide 5-AminoLévulinique Deshydratase

ALAS : Acide 5-AminoLévulinique Synthase

Cas9 : *CRISPR associated protein 9*

CH : Coproporphyrine Héritaire

COPRO : Coproporphyrinogène

CPO : CoproPorphyrinogène III Oxydase

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique

crARN : CRISPR-ARN

CRISPR : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

EPNET : *European porphyria network*

FECH : Ferrochélatase

GeCKO: *Genome-Scale CRISPR Knock-Out*

GM-CSF: *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*

GvHD: Maladie du Greffon contre l'Hôte - *Graft versus Host Disease*

HMB : Hydroxyméthylbiliane

HMBS : Hydroxyméthylbiliane Synthase

iPSC : *induced Pluripotent Stem Cell* - Cellule Souche Pluripotente Induite

IRE : *Iron Responsive Element* - élément de réponse au fer

IRP : *Iron Responsive Protein* - protéine de liaison à l'IRE

INH : Isoniazide

KO : *Knock-Out*

miARN : micro-ARN

MOI : Multiplicité d'Infection

NGS : *Next Generation Sequencing* - Séquençage Nouvelle Génération

PAI : Porphyrie Aigüe Intermittente

PBG : Porphobilinogène

PCT : Porphyrie Cutanée Tardive  
PDA : Porphyrie Déficente en  $\delta$  Aminolevulinate Déshydratase  
PDLX : Protoporphyrine Dominante Liée à l'X  
PEC : Porphyrie Erythropoïétique Congénitale  
PHE : Porphyrie HépatErythropoïétique  
PAM : Protospacer Adjacent Motif  
PPE : ProtoPorphyrie Erythropoïétique  
PPIX : ProtoPorphyrine IX  
PPO : ProtoPorphyrinogène Oxydase  
PV : Porphyrie Variegata  
RPMI: *Roswell Park Memorial Institute Medium*  
shARN : *short-hairpin ARN* - ARN en épingle à cheveux  
URO : Uroporphyrinogène  
UROS : Uroporphyrinogène III Synthase  
UROD : Uroporphyrinogène Décarboxylase  
UVs : Ultra-Violets  
WT : *Wilde-Type* - Sauvage

# Préambule

J'ai réalisé mes stages de 5<sup>ème</sup> année de pharmacie et de Master 2 au sein de l'unité Inserm U1035 « Biothérapies des Maladies Génétiques, Inflammatoires et Cancers » à Bordeaux. J'ai été accueillie dans l'équipe « Biothérapie » dirigée par le Pr. François Moreau-Gaudry. Cette équipe travaille depuis longtemps sur les porphyries érythropoïétiques et plus spécifiquement sur la porphyrie érythropoïétique congénitale. De façon intéressante, l'équipe Biothérapie est constituée de plusieurs chercheurs hospitalo-universitaires chargés du diagnostic biochimique et moléculaire des porphyries au CHU de Bordeaux, assurant un lien entre les activités cliniques de l'hôpital et les activités de recherche du laboratoire. L'équipe a développé des approches de thérapie génique autour des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) et de la correction génique ciblée avec le système « Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats » (CRISPR) - CRISPR associated protein 9 (Cas9) couramment appelée CRISPR-Cas9. Depuis plusieurs années, de nouvelles approches thérapeutiques pharmacologiques ou de thérapies génique et cellulaire sont étudiées pour améliorer la prise en charge des patients atteints de PEC.

# Introduction

Les porphyries sont un groupe de maladies métaboliques causées par un fonctionnement anormal de l'une des enzymes participant à la biosynthèse de l'hème. Ce défaut enzymatique se caractérise par une accumulation accrue de porphyrines et/ou de leurs précurseurs. Chaque déficit de l'une des huit enzymes de la voie de biosynthèse de l'hème correspond à une maladie héréditaire. La porphyrie érythropoïétique congénitale (PEC), aussi appelée la maladie de Günther d'après le nom du médecin qui la décrit pour la première fois en 1911, est une des formes les plus rares et sévères des porphyries. Elle se caractérise par une accumulation massive de composés photoréactifs dans la lignée érythroïde de la moelle osseuse, entraînant les manifestations physiopathologiques de la PEC. Les traitements disponibles sont essentiellement symptomatiques. Le seul traitement curatif spécifique est la greffe de moelle osseuse, réservée aux cas les plus sévères et disposant d'un donneur compatible.

Ces dernières années, plusieurs gènes ont été associés à la PEC. Ces découvertes suggèrent l'existence d'autres gènes modificateurs actuellement non identifiés participant au phénotype de la PEC. L'identification de ces gènes et la connaissance des mécanismes cellulaires par lesquels ils seraient impliqués dans la PEC et la biosynthèse de l'hème sont essentiels afin d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans cette thèse, qui s'inspire de mon projet de stage de Master 2, nous tenterons d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la régulation de la voie de biosynthèse de l'hème et modulant le phénotype pathologique de la PEC. Pour ce faire, nous avons choisi d'utiliser le système CRISPR-Cas9 afin de réaliser un criblage génétique *in vivo*.

Dans un premier temps, nous étudierons les caractéristiques des porphyries et plus précisément de la PEC, sa physiopathologie et sa prise en charge actuelle. Il est en effet essentiel de pouvoir caractériser la PEC de manière générale pour mieux comprendre les mécanismes cellulaires ciblés par les thérapies. Ensuite, nous nous intéresserons à l'état actuelle de la recherche, en exposant les différentes stratégies élaborées dans le monde et au sein du laboratoire. Dans une dernière partie, nous exposerons le projet visant à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques de la PEC en utilisant le système CRISPR-Cas9. Nous

évoquerons le principe de cette technologie innovante et son usage dans la réalisation d'un criblage génétique *in vitro*. Enfin, les résultats préliminaires ainsi que les perspectives du projet de recherche global seront présentés.

# 1. La Porphyririe Erythropoïétique Congénitale

## 1.1. Les Porphyrries

Les porphyries sont un groupe de maladies métaboliques qui se caractérisent par une accumulation accrue de molécules organiques tétrapyroliques : les porphyrines, et/ou de leurs précurseurs. Chaque porphyrie résulte principalement d'un déficit enzymatique et d'une accumulation de précurseurs de l'hème en amont du déficit.

Les porphyries forment un groupe hétérogène de maladies rares. Elles sont de transmissions autosomiques ou sexuelles, de formes dominantes ou récessives, et de prévalences et de symptômes très divers. En Europe par exemple, la prévalence de la porphyrie cutanée tardive, la plus commune des porphyries, est de 1 pour 20 000 personnes tandis que seulement 8 cas de Porphyririe de Döss ont été répertoriés dans le monde<sup>1,2</sup>. Les patients atteints de porphyries souffrent de symptômes très variés tels qu'une photosensibilité cutanée, une hémolyse chronique ou encore des manifestations neurologiques. Les patients les plus sévèrement touchés ont généralement une faible espérance de vie. Toutefois, certains patients peuvent être asymptomatiques toute ou une grande partie de leur vie. La non-spécificité des symptômes et la rareté de ces pathologies rendent le diagnostic difficile et souvent tardif. Le diagnostic biochimique repose sur la mesure et l'identification des précurseurs de l'hème surexprimés dans le sang, les urines et/ou les selles. Enfin, la mesure de l'activité enzymatique et les tests génétiques confirment le type de porphyrie dont est atteint le patient. Ces tests génétiques sont également le seul moyen approprié de dépister les porteurs asymptomatiques lorsqu'une mutation a été identifiée dans la famille<sup>3</sup>.

Il existe plusieurs formes de porphyries : les formes dominantes qui se caractérisent le plus souvent par des crises hépatiques aiguës et les formes récessives qui sont généralement chroniques et affectent principalement les cellules érythropoïétiques de la moelle osseuse. Les porphyries sont classiquement regroupées en porphyries hépatiques et porphyries érythropoïétiques selon le tissu dans lequel prédomine le trouble métabolique<sup>4</sup>. En effet, la biosynthèse de l'hème a lieu majoritairement dans la moelle osseuse et le foie, les précurseurs de l'hème s'accumulent initialement dans l'un ou l'autre des tissus en fonction des différents types de porphyries. Les porphyries hépatiques regroupent 5 types de porphyries : la

porphyrie aigüe intermittente (PAI), la porphyrie déficiente en  $\delta$  aminolevulinate déshydratase (PDA), la porphyrie cutanée tardive (PCT), la coproporphyrine héréditaire (CH) et la porphyrie variegata (PV). Les porphyries érythropoïétiques sont représentées par la protoporphyrine érythropoïétique (PPE), la porphyrie hépatoérythropoïétique (PHE), la protoporphyrine dominante liée à l'X (PDLX) et la porphyrie érythropoïétique congénitale (PEC)<sup>5</sup> (Fig.1B).

### 1.1.1. La voie de biosynthèse de l'hème

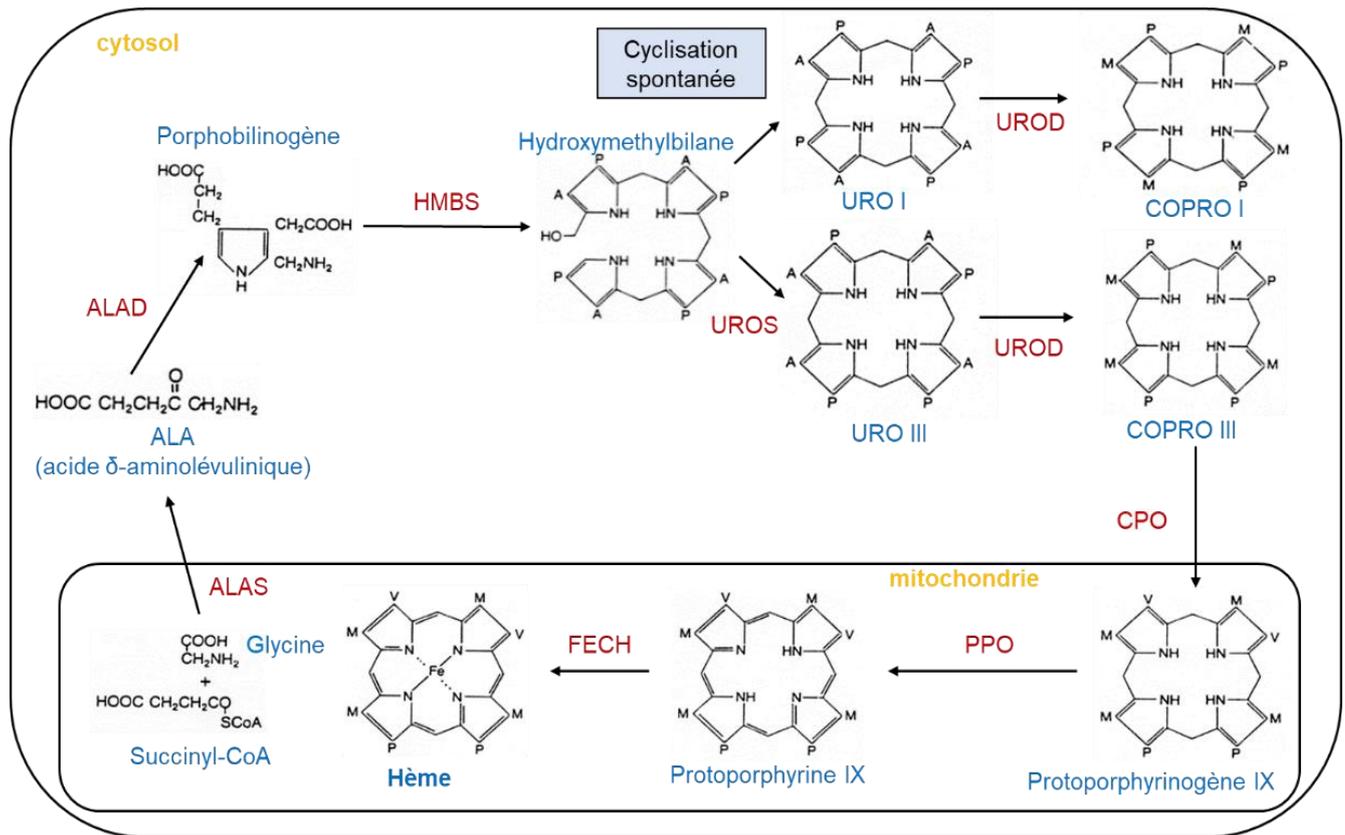
L'hème est une métalloporphyrine composé d'un atome de fer ( $Fe^{2+}$ ), et de protoporphyrine IX (PPIX). Elle est le groupement prosthétique des hémoprotéines. L'hème est un cofacteur essentiel dans divers processus biologiques tels que le transport (hémoglobine) et le stockage de l'oxygène (myoglobine) ainsi que le transfert d'électrons (cytochromes respiratoires)<sup>6</sup>. Elle est également le composant des peroxydases et des autres cytochromes. Chez l'Homme, la biosynthèse de l'hème se produit principalement dans le système érythroblastique (80%) et le foie (15%) ainsi que dans d'autres tissus (5%)<sup>5</sup>. Dans la moelle osseuse, elle est constitutive l'hémoglobine des érythrocytes tandis que dans le foie, l'hème synthétisé est principalement requis pour les cytochromes P450 qui oxydent de nombreux xénobiotiques<sup>7</sup>.

L'hème est le résultat d'une succession de huit réactions enzymatiques<sup>8</sup> (Fig.1A). La première étape de cette voie est la condensation de la glycine et du succinyl-CoA pour former l'acide 5-aminolévulinique (ALA) dans la matrice mitochondriale. Cette réaction catalysée par l'ALA synthase (ALAS) est l'étape limitante de la voie de biosynthèse de l'hème<sup>9</sup>. Il existe deux isoformes d'ALAS : ALAS1 et ALAS2, qui sont codées par des gènes distincts. Le gène *ALAS1* est exprimé de manière ubiquitaire et joue un rôle important dans les tissus non érythroïdes<sup>10</sup>. Le gène *ALAS2* est situé sur le chromosome X et il est exprimé principalement dans les cellules érythroïdes<sup>11</sup>. L'expression d'ALAS2 augmente fortement au cours de la dernière étape de la différenciation érythroïde et est essentielle pour la maturation des globules rouges<sup>12</sup>. Pendant l'érythropoïèse, l'expression d'ALAS2 est principalement régulée par la disponibilité en fer. On retrouve dans la partie 5' non traduite de l'ARNm ALAS2 un élément de réponse au fer (IRE). Si la disponibilité en fer est faible, les protéines de liaison à l'IRE (IRP) se lient à l'IRE, bloquent la traduction et diminuent l'activité ALAS2 et donc la biosynthèse de l'hème<sup>13</sup>. Ainsi, les

différences entre les porphyrines hépatiques et érythropoïétiques s'expliquent en partie par la différence de régulation de la voie de biosynthèse de l'hème entre le foie et la moëlle osseuse. Tandis qu'ALAS1 régulée par l'hème, ALAS2 est régulée par le fer<sup>14</sup>.

La seconde étape a lieu dans le cytosol. L'ALA synthétisé est condensé par l'enzyme ALA deshydratase (ALAD) en dimère, de façon asymétrique pour donner le porphobilinogène (PBG). Puis quatre molécules de PBG sont combinées par l'hydroxyméthylbiliane synthase (HMBS) en hydroxyméthylbiliane (HMB). L'HMB linéaire est cyclisé en uroporphyrinogène (URO) III en présence de l'URO III synthase (UROSIII) ou spontanément en URO I. La décarboxylation de l'URO III et I en présence d'URO décarboxylase (UROD) donne le coproporphyrinogène (COPRO) III et I. La COPRO III oxydase (CPO) catalyse ensuite la décarboxylation oxydative du COPRO III en protoporphyrinogène IX. Une troisième étape se déroule dans la mitochondrie en présence de l'enzyme mitochondriale protoporphyrinogène oxydase (PPO) qui va retirer six atomes d'hydrogène du protoporphyrinogène IX pour former la protoporphyrine IX (PPIX). Enfin, un atome de fer est inséré dans l'anneau de PPIX pour former l'hème. Cette dernière réaction de la voie de biosynthèse de l'hème est catalysée par la ferrochélatase (FECH)<sup>8</sup>.

A



B

Porphyries		Enzyme déficiente	Gène
Nom	Type		
Protoporphyrine liée à l'X	E	ALA-synthase	ALAS2
Porphyrie de Döss	H	ALA-deshydratase	ALAD
Porphyrie aiguë intermittente	H	HMB-synthase	HMBS
Porphyrie érythropoïétique congénitale	E	UROS-synthase	UROS
Porphyrie cutanée tardive	H	URO-décarboxylase	UROD
Porphyrie hepatoérythropoïétique	E	URO-decarboxylase	UROD
Coproporphyrine héréditaire	H	COPRO-oxidase	CPOX
Porphyrie variegata	H	PROTO-oxidase	PPOX
Protoporphyrine érythropoïétique	E	Ferrochelatase	FECH

Figure 1 - Voie de biosynthèse de l'hème et porphyries.

(A) Métabolites (bleu) et enzymes (rouge) de la voie de biosynthèse de l'hème. (B) Gènes et enzymes associés aux porphyries. ALA, acide δ-aminolévulinique ; ALAS, ALA-synthase ; ALAD, ALA-deshydratase ; HMBS : Hydroxyméthylbilane synthase ; URO, uroporphyrinogène ; UROS, URO-synthase ; UROD, URO-décarboxylase ; COPRO, coproporphyrinogène ; CPO, COPRO III oxydase ; PPO, protoporphyrinogène oxydase ; FECH, ferrochelatase ; E, porphyrie érythropoïétique ; H, porphyrie hépatique.

NB : Bien que classée parmi les porphyries hépatiques, la porphyrie hepatoérythropoïétique est cliniquement semblable aux porphyries érythropoïétiques et peut être assimilée à ces dernières.

### 1.1.2. Porphyries hépatiques

Cinq porphyries composent les porphyries hépatiques :

- la porphyrie déficiente en  $\delta$  aminolevulinate déshydratase (PDA),
- la porphyrie aigüe intermittente (PAI),
- la porphyrie cutanée tardive (PCT),
- la coproporphyrine héréditaire (CH)
- et la porphyrie variegata (PV)

Parmi ces porphyries hépatiques, la PAI et la PDA sont classées comme porphyries aiguës, la PCT comme cutanée, tandis que la PV et la CH présentent des manifestations cliniques à la fois aiguës et cutanées.

Des crises hépatiques aiguës surviennent pour 4 de ces porphyries hépatiques : la PAI, la PDA, la VP et la CH. Pour toutes ces formes de porphyrie hépatique, à l'exception donc de la PCT, une crise aigüe peut commencer par des changements de comportement et de l'agitation. Les patients souffrent d'anxiété et de douleurs abdominales, sans signes d'obstruction ou de péritonite à l'examen physique. Ces symptômes peuvent s'accompagner, de vomissements, de constipation, de diarrhée, de tachycardie, d'hypertension, d'hyponatrémie, d'urines rougeâtres, de faiblesse musculaire et de symptômes neurologiques tels que la paresthésie, la paralysie et les convulsions<sup>15</sup>. Ces crises aiguës sont souvent la conséquence de prises de médicaments. Dans le foie, ALAS1 est régulée par l'hème, certains médicaments inducteurs de cytochromes héminiques (comme l'hème oxydase de type I) induisent une diminution du pool d'hème. ALAS1 et par conséquent la voie de biosynthèse de l'hème sont alors fortement activées. Dans le cas d'un déficit en ALAD, HMBS, PPO ou CPO, les porphyrines et/ou leurs précurseurs s'accumulent massivement, et entrainer les crises hépatiques chez les patients.

Les crises aiguës sont gérées en retirant les agents incriminés pouvant précipiter ces crises (alcool, contraceptifs oraux, antibiotiques et certains antiépileptiques). Un traitement symptomatique doit être administré en cas de nausées, de vomissements, de douleurs, de convulsions et/ou de déséquilibres électrolytiques<sup>2</sup>. Si le diagnostic d'une porphyrie hépatique aigüe a été confirmé, de l'arginate d'hémine (Normosang®) doit être administrée en intraveineuse le plus rapidement possible<sup>16</sup>. Cela permet de diminuer directement l'activité de l'ALAS1 et donc l'accumulation d'ALA et de PBG<sup>17</sup>. En effet, l'ALAS1 est l'enzyme limitante

de la biosynthèse hépatique de l'hème, elle est étroitement régulée par la concentration d'hème intracellulaire<sup>7,18</sup>.

### La porphyrie déficiente en ALAD ou porphyrie de Döss

La porphyrie de Döss est un trouble autosomique récessif causé par un déficit en ALAD, aussi appelée PBG synthase, la deuxième enzyme de la voie de biosynthèse de l'hème (Fig. 1). La PDA est le type de porphyrie le plus rare, avec seulement neuf cas documentés dans le monde. Les 9 patients décrits sont des hommes, présentant une forme grave de la maladie s'étant déclarée dans les premières années de la vie<sup>2,19,20</sup>. Le gène ALAD est situé sur le chromosome 9<sup>21</sup>. L'ALAD catalyse la conversion de l'ALA en PBG. Quand le gène *ALAD* est muté sur les deux allèles, l'ALA s'accumule dans les globules rouges et les hépatocytes et peut être toxique pour divers tissus. Contrairement aux porphyrines, l'accumulation de leurs précurseurs : l'ALA et le PBG, est associée à des symptômes neurologiques caractéristiques des porphyries hépatiques aiguës. Certains patients présentent une neuropathie motrice sévère pouvant entraîner une insuffisance respiratoire et un syndrome d'encéphalopathie réversible, avec des maux de tête, des symptômes visuels et des convulsions<sup>15,22</sup>. Le mécanisme neurotoxique de l'ALA et du PBG n'est pas bien compris<sup>23</sup>. Cliniquement, la PDA et la PAI (caractérisée par un défaut en HMBS, aussi appelé PBG désaminase), sont très similaires. La PDA se caractérise par une production nettement accrue d'ALA, 10 à 20 fois supérieure à celle du PBG. La PAI, d'autre part, se caractérise par une production accrue d'ALA et de PBG en proportions comparables. Le fait que la PDA et la PAI soient symptomatiquement similaires suggère que l'ALA ou ses métabolites seraient plus neurotoxiques que le PGB<sup>3</sup>. De plus, l'activité de l'ALAD est inhibée par de nombreux produits chimiques ou composés, tels que le plomb et le succinylacétone<sup>24,25</sup>. Dès qu'ils présentent une augmentation, même légère, de l'exposition à ces produits, les patients hétérozygotes pour une mutation réduisant l'activité de l'ALAD de 50 % développent des symptômes similaires à ceux observés chez les patients homozygotes atteints de PDA<sup>26</sup>.

## La porphyrie aigüe intermittente

La PAI est une maladie métabolique autosomique dominante causée par un déficit hépatique partiel en HMBS, également appelé PBG désaminase, la troisième enzyme de la voie de synthèse de l'hème (Fig.1). Le gène *HMBS* est situé sur le chromosome 11<sup>27</sup>. La PAI touche environ 5 à 10 personnes sur 100 000 individus aux États-Unis et une personne sur 75 000 dans les pays européens<sup>28,29</sup>. La Suède et plus spécifiquement le nord de la Suède font figure d'exception puisqu'en raison d'un « effet fondateur », (propagation d'une mutation au sein d'une population donnée, éloignée ici géographiquement du reste de la population) la prévalence de la PAI y est plus fréquente : une personne pour 1 000 au Nord de la Suède et une pour 10 000 dans tout le pays<sup>30</sup>.

La principale caractéristique clinique de la PAI est une attaque neuroviscérale aiguë associée à une production élevée de précurseurs de porphyrines potentiellement neurotoxiques : l'ALA et le PBG. Ces attaques sont en tous points similaires à celles des patients atteints de PDA. Les défauts en ALAD ou en HMBS, responsables respectivement de la PDA et de la PAI, altèrent la biosynthèse de l'hème dans le foie suite à l'accumulation de précurseurs de porphyrines tandis qu'aucune anomalie n'est observée dans les érythroblastes<sup>31</sup>. Les symptômes sont très rares avant la puberté et sont plus fréquents chez les femmes que chez les hommes<sup>32</sup>. La plupart des patients ne présentent aucun symptôme avant d'être exposés à des déclencheurs externes. Lors d'une crise aiguë, l'ALAS1, est directement induite par les changements hormonaux, le stress, la réduction de l'apport calorique, les drogues, le tabac ou l'alcool, entraînant une augmentation et une accumulation des précurseurs de l'hème. L'ALAS1 peut également être induite indirectement par chirurgie ou infections qui induisent l'hème oxygénase, qui catabolise l'hème, entraînant une augmentation de la demande<sup>28</sup>. La prise en charge des crises aiguës est commune aux autres porphyries hépatiques aiguës : traitement symptomatique des douleurs, nausées et vomissement, et traitement à l'arginate d'hémine. La greffe de foie est le seul traitement curatif des patients atteints de PAI et présentant des crises aiguës récurrentes et sévères<sup>33,34</sup>.

## La porphyrie cutanée tardive

La PCT est la porphyrie la plus courante. La prévalence des patients symptomatiques est de 1 sur 25 000 aux États-Unis, et de 1 sur 5 000 en Tchécoslovaquie où elle est beaucoup plus fréquente<sup>35</sup>. La PCT est causée par une diminution de l'activité de l'UROD, la cinquième enzyme de la voie de biosynthèse de l'hème. L'accumulation de l'URO III photoréactif dans l'épiderme provoque une fragilité accrue de la peau dans les zones exposées au soleil. La PCT se caractérise donc par une phototoxicité cutanée chronique qui provoque des cloques, une hyperpigmentation, de l'hypertrichoses et des lésions cutanées. Contrairement aux autres porphyries hépatiques, elle ne présente aucune crise aiguë ni manifestation neurologique<sup>1</sup>. La PCT peut être de forme sporadique (type 1) ou héréditaire (type 2). Il s'agit de la seule porphyrie qui peut se développer en l'absence de mutation de l'une des enzymes participant à la voie de biosynthèse de l'hème. Les patients atteints de PCT de type 1 ont une activité UROD hépatique plus faible, mais une activité enzymatique érythrocytaire normale. Ces patients ne présentent pas de mutations du gène *UROD*. Les patients atteints de PCT de type 2 présentent une mutation dominante sur l'un des 2 allèles du gène *UROD*, situé sur le chromosome 1, entraînant une activité de l'UROD réduite dans le foie et les érythrocytes<sup>5</sup>. Les facteurs de risque environnementaux sont responsables d'environ 2/3 des cas de PCT<sup>31</sup>. Pour la PCT sporadique, les facteurs externes comprennent la consommation d'alcool, l'hémochromatose héréditaire, l'hépatite C, le tabagisme, les œstrogènes, l'insuffisance rénale, l'exposition à certaines substances chimiques<sup>15</sup>. Seul un faible pourcentage des patients atteints de PCT héréditaire développent des symptômes et les facteurs externes cités plus haut sont également requis pour augmenter les niveaux d'URO III et développer ces symptômes.

Dans les deux formes de PCT, les patients présentent la plupart du temps une surcharge en fer<sup>36</sup>. Le fer n'inhibe pas directement l'activité de l'UROD, néanmoins, une diminution du fer peut contribuer à inhiber l'enzyme en créant un environnement oxydatif conduisant à la production d'un inhibiteur de l'UROD<sup>31</sup>. Une phlébotomie répétée est un traitement efficace pour réduire le fer hépatique, aussi, l'hydroxychloroquine à faible dose, qui élimine l'excès de porphyrines du foie, est également très efficace. Une greffe de foie n'est envisagée qu'en cas de défaillance hépatique due à un abus d'alcool ou à l'hépatite C<sup>34</sup>.

### La coproporphyrine héréditaire

La CH est causée par une mutation dominante du gène *CPO* situé sur le chromosome 3. Les cas de CH sont très rares et peu de données épidémiologiques fiables sont disponibles. À ce jour, moins de 50 cas de CH ont été signalés<sup>5</sup>. Les patients touchés par cette maladie souffrent de crises neuroviscérales aiguës accompagnées ou non d'une photosensibilité cutanée. Environ 20% des personnes ayant subi une crise aiguë font état d'une photosensibilité. Les attaques aiguës commencent généralement par une douleur abdominale faible qui augmente lentement sur une période de plusieurs jours, souvent accompagnée de nausées et de vomissements. Comme pour les autres porphyries hépatiques, une neuropathie motrice peut se développer sur une période de plusieurs jours ou semaines si elle n'est pas traitée<sup>37</sup>. En général, la CH est plus bénigne que la PAI et est associée à moins de crises. Les crises aiguës sont souvent en lien avec l'utilisation de certains médicaments tels que les barbituriques et sulfamides, à la diminution de l'apport calorique et/ou à une augmentation de la production de progestérone durant la phase lutéale. De ce fait, les crises aiguës sont beaucoup plus fréquentes chez les femmes, principalement entre 16 et 45 ans<sup>1</sup>.

### La porphyrie variegata

La PV est une porphyrie hépatique autosomique dominante. Elle est causée par un défaut d'activité enzymatique partiel de la PPO, la septième enzyme de la voie de biosynthèse de l'hème, dont le gène se situe sur le chromosome 1<sup>38</sup>. En Europe, la prévalence de la PV est d'environ 3,2 cas par million de personne<sup>39</sup>. De la même façon que la PAI en Suède, la prévalence de la PV en Afrique du Sud, chez les descendants des colons néerlandais, est très largement supérieure à celle des autres pays. En effet, la PV touche 1 personne sur 300 dans cette population et s'explique une fois de plus par un « effet fondateur »<sup>40,41</sup>.

Tout comme la CH, la PV est un type de porphyrie présentant à la fois des manifestations aiguës et cutanées. Ces crises sont identiques à celles de la PAI, avec douleurs abdominales, vomissements, constipation, hypertension, tachycardie et faiblesse neuromusculaire pouvant évoluer vers une faiblesse respiratoire. Les attaques aiguës sont peu fréquentes par rapport aux autres types de porphyries aiguës puisque qu'elles sont signalées chez moins de 20% des patients atteints de PV. Ces crises sont identiques à celles de la PAI, avec douleurs

abdominales, vomissements, constipation, hypertension, tachycardie et faiblesse neuromusculaire pouvant évoluer vers une faiblesse respiratoire. Elles sont souvent précipitées par une médication inappropriée pouvant entraîner la mort du patient. Cependant, beaucoup de patients restent asymptomatiques et 60% des patients présentent comme seule manifestation clinique des lésions cutanées similaire à la PCT (cloque, cicatrices, érosion et/ou hyperpigmentation)<sup>5,29,42</sup>.

### 1.1.3. Porphyries érythropoïétiques

En plus de la PEC, il existe trois autres types de porphyries érythropoïétiques :

- La protoporphyrie dominante liée à l’X (PDLX)
- La protoporphyrie érythropoïétique (PPE)
- La porphyrie hépatoérythropoïétique (PHE)

Les porphyries érythropoïétiques se manifestent généralement par une photosensibilité cutanée dans la petite enfance, et dans de rares cas, elle peut se développer plus tard dans la vie adulte. Dans ces pathologies, la surproduction et l'accumulation initiale des intermédiaires de l’hème se produisent principalement dans les cellules érythroïdes de la moelle osseuse. Les 4 porphyries érythropoïétiques présentent une photosensibilité cutanée plus ou moins sévère. Il est donc conseillé aux patients atteints d’éviter toute exposition directe ou indirecte au soleil et de porter des vêtements les protégeant tels que des manches longues, des pantalons longs, des chaussettes, des gants et des chapeaux à larges bords.

#### Protoporphyrie érythropoïétique

La PPE est la porphyrie érythropoïétique la plus courante et la plus fréquente chez les enfants. Sa prévalence est de 9.2 cas par millions de personnes en Europe<sup>39</sup>. Elle est liée à un déficit de l’activité de la FECH, dernière enzyme intervenant dans la synthèse de l’hème et qui catalyse l’insertion du Fe<sup>2+</sup> au centre de la molécule de PPIX pour former l’hème terminal. L’enzyme mitochondrial est codée par le gène *FECH*, situé sur le bras long du chromosome 18<sup>43</sup>. Des concentrations accrues de PPIX dans le sang et d'autres tissus entraînent une photosensibilité aiguë à vie et, chez environ 2 % des patients, une atteinte hépatique<sup>44</sup>. La photosensibilité des

patients est responsable d'érythèmes, d'œdèmes et/ou de sensations douloureuses de brûlure après une exposition rapide au soleil. L'exposition répétée aux rayons du soleil peut provoquer des lésions chroniques dans les zones exposées. Les lésions se présentent sous la forme de cicatrices et d'un épaissement de la peau, en particulier au niveau du visage et des mains, elles ne sont généralement pas invalidantes<sup>45</sup>. Le PPIX étant hydrophobe et liposoluble, elle subit une clairance hépatique dans la bile et les fèces. Un excès de PPIX dans les canalicules biliaires peut provoquer une cholestase hépatique. Jusqu'à 25 % des patients peuvent présenter des calculs biliaires de porphyrine, et jusqu'à 5 % peuvent développer une maladie hépatique grave entraînant une insuffisance hépatique. Dans ces conditions, une greffe de foie peut être la seule option thérapeutique<sup>46</sup>. La greffe de moelle osseuse est également préconisée pour les cas de PPE les plus sévères. Depuis 2014, l'afamélanotide (Scenesse®) est une alternative à la greffe de moelle osseuse pour les patients adultes. L'afamélanotide se présente sous forme d'implant sous-cutané biodégradable efficace 2 mois. Il s'agit d'un analogue synthétique de l'hormone de stimulation des mélanocytes  $\alpha$ , les cellules stimulées produisent plus de mélanine, un pigment photoprotecteur. Ce médicament améliore ainsi la tolérance des patients à la lumière, réduit et raccourcit les épisodes de douleur et améliore leur qualité de vie<sup>15</sup>.

### Protoporphyrine dominante liée à l'X

La PDLX a été décrite pour la première fois en 2008<sup>47</sup>. La prévalence de la PDLX au Royaume-Uni est d'environ 1 personne touché pour 7 millions<sup>32</sup>. Contrairement aux autres porphyries dont les mutations « perte de fonction » entraînent une diminution de l'activité enzymatique, la PDLX se caractérise par des mutations « gain de fonction » sur l'exon terminal du gène *ALAS2*, situé sur le chromosome X<sup>48</sup>. Nous noterons qu'à l'inverse, les mutations « perte de fonction » sur le gène *ALAS2* entraînent une anémie sidéroblastique liée à l'X<sup>49</sup>. Dans le cas de la PDLX, le gain de fonction augmente l'activité enzymatique d'*ALAS2*, l'enzyme régulatrice de la voie de biosynthèse de l'hème, et entraîne l'accumulation de protoporphyrines car la ferrochelatase qui permet l'insertion du  $Fe^{2+}$  dans la PPIX en devient l'étape limitante. En effet, le gain de fonction d'*ALAS2* produit plus de PPIX que nécessaire pour la synthèse de l'hémoglobine, et ces molécules s'accumulent en quantités suffisantes pour provoquer une photosensibilité et des lésions hépatiques, malgré l'activité normale de la FECH. La majeure

partie de ce PPIX est utilisée pour la synthèse de l'hème, mais l'excès est converti en protoporphyrine zinc<sup>4</sup>.

La PDLX est moins commune mais a le même phénotype que la PPE décrite ci-dessous. Le diagnostic de PDLX est avancé lorsque les concentrations en protoporphyrines érythrocytaires sont élevées sans aucun déficit en ferrocyclase et dont une forte proportion est liée au zinc. Le principal symptôme est une sensation douloureuse de brûlure après une exposition même minime au soleil, en l'absence de toute éruption cutanée spécifique<sup>4,50</sup>. Contrairement à la PPE, une supplémentation en fer est efficace chez les patients atteints de PDLX, cela permet à la FECH fonctionnelle de métaboliser l'excès de PPIX toxique en hème<sup>51</sup>.

### Porphyrie hépatoérythropoïétique

Bien que la PHE soit en premier lieu d'origine hépatique, elle est cliniquement semblable à la PEC<sup>52</sup>. La PHE est une maladie autosomique récessive caractérisée par une ou des mutations biallélique du gène *UROD*, situé sur le chromosome 1. Il s'agit de la forme homozygote (ou hétérozygote composite) de la PCT, où chaque allèle d'*UROD* est affecté et où l'activité enzymatique des protéines produites est minimale et beaucoup plus faible que dans la PCT. Environ 40 cas de PHE ont été signalés et certains patients PHE sont issus de famille PCT<sup>53</sup>. De même que dans la PCT, l'excès de porphyrines dû à un défaut d'*UROD* fonctionnelle provient principalement du foie. Cependant, dans la PHE, les porphyrines s'accumulent dans la moelle osseuse et sont particulièrement élevée dans les érythrocytes<sup>31</sup>. Ceci explique la ressemblance clinique des patients HEP et PEC. Comme dans le cas de la PEC, l'apparition de lésions cutanées, d'hypertrichose, de cicatrices et de rougeur des urines commencent généralement dès la petite enfance. Les lésions sclérodermiques de la peau sont parfois importantes et une photomutilation altérant la fonction des mains et la défiguration du visage peut être responsable d'une forte morbidité chez les patients<sup>29,54</sup>. Des mesures préventives de photoprotection sont indispensables chez ce type de patient.

## 1.2. Physiopathologie et présentation clinique de la PEC

La PEC, aussi appelée maladie de Günther est une des porphyries les plus rares et les plus sévères. Environ 250 ont été décrites jusqu'à présent<sup>55</sup>. Il s'agit d'une maladie génétique de transmission autosomique récessive qui se déclare pendant l'enfance. Jusqu'à présent, aucune prédominance ethnique ou sexuelle claire n'a été constatée, même si un nombre plus élevé de cas touchés appartiennent à certaines zones restreintes et/ou sont issus de mariages consanguins<sup>55</sup>. La première description de la PEC a été publiée en 1874 par Schultz comme une forme particulière de lèpre. Par la suite, en 1911, Günther a décrit la maladie en détail et l'a définie comme "hématoporphyrine congénitale"<sup>56</sup>. Elle se caractérise par un déficit marqué en UROS, la 4<sup>ème</sup> enzyme intervenant dans la voie de biosynthèse de l'hème (Fig. 1A). L'UROS est codée par le gène *UROS* qui se situe sur le bras long du chromosome 10. La plupart des mutations responsables de la PEC se situent sur le gène *UROS*, une cinquantaine de mutations ont été décrites à ce jour<sup>5</sup>. Exceptionnellement, une forme de PEC a été associée à une mutation sur le gène *GATA-1* situé sur le chromosome X et codant pour un facteur de transcription spécifique de la lignée érythroïde<sup>57</sup>.

À l'état physiologique, l'activité enzymatique d'UROS permet la cyclisation de l'HMB en URO III. Dans le cas de la PEC où l'UROS est en défaut, il y a une cyclisation spontanée et non plus enzymatique de l'HMB pour former de l'URO I. Les deux composés, URO III et URO I peuvent être pris en charge par l'enzyme suivante, l'UROD, pour former respectivement le COPRO de type III et de type I. Contrairement au COPRO III, le COPRO de type I ne peut pas être métabolisé. Les isomères non physiologiques de porphyrines de type I (URO I et COPRO I) sont donc dans une impasse métabolique, s'accumulent dans la cellule et provoquent une cytotoxicité<sup>58</sup>.

L'accumulation de composés porphyriniques de type I survient dans un premier temps dans la moelle osseuse et par conséquent dans le sang périphérique, ce qui peut entraîner une dysérythroïose, une splénomégalie et une anémie hémolytique. Le niveau de porphyrines est aussi très élevé dans les urines, qui sont de couleur rose à rouge-brun et fluorescent lors de l'exposition à la lumière ultra-violettes (UVs). Dans les autres tissus, cette accumulation est responsable d'une photosensibilité cutanée, d'érosions et d'ulcères au niveau de la peau, d'hirsutisme et d'hypertrichose, d'érythrodontie (dents rougeâtres), et d'une ostéodystrophie combinant ostéolyse et ostéoporose<sup>59</sup>. Les infections secondaires aux lésions cutanées

peuvent provoquer des cicatrices, des déformations et des mutilations des parties du corps exposées à la lumière, telles que les mains, les oreilles, le nez et les paupières (Fig. 2)<sup>55</sup>.



Figure 2 – Patients atteints de PEC<sup>57</sup>.

Patiente 1 (A) et Patient 2 (C) présentant des ulcères de différentes tailles, une hyperpigmentation et une dépigmentation, et de graves mutilations sur leurs visages, en particulier sur le nez et les oreilles.

Les mains de la patiente 1 (B) présentent une hyperpigmentation et une dépigmentation, ulcères et fibrose ainsi que des mutilations graves de tous les doigts.

Il est important de noter que l'activité de l'UROS n'est pas inexistante chez les patients atteints de PEC, son activité est diminuée de manière plus ou moins importante (15% à <0.1) mais une activité même résiduelle reste essentielle<sup>60</sup>. En effet, il a été montré qu'un *knock-out* (KO) du gène *UROS*, c'est-à-dire une inactivation complète du gène, chez la souris entraîne la mort du fœtus au début de l'embryogénèse, ce qui indique que l'absence totale d'activité UROS n'est pas compatible avec la vie<sup>61</sup>.

Bien que généralement sévère, le phénotype varie en fonction du type de mutations sur le gène *UROS* et du taux de porphyrines dans le plasma et les érythrocytes. La sévérité de la maladie chez des patients est très hétérogène, allant de la mort *in utero* ou d'une grave dépendance transfusionnelle, à des cas adultes ne présentant qu'une légère photosensibilité cutanée<sup>1,62,63</sup>.

L'âge d'apparition et la gravité clinique de la PEC sont donc très variables. Le diagnostic clinique se fait dès l'apparition des premières manifestations. Dans la plupart des cas, une photosensibilité sévère se développe peu après la naissance. La coloration rose ou rouge-brun des couches due à une augmentation marquée des porphyrines urinaires peut être le premier indice de la maladie chez un nourrisson (Fig. 3). Le diagnostic de PEC est ensuite étayé par les résultats biochimiques : une diminution marquée de l'activité de l'UROS dans les érythrocytes et/ou d'une augmentation marquée des niveaux d'isomères de type I au niveau du plasma, (URO I et COPRO I), des urines (URO I et COPRO I) et des selles (COPRO I). Le diagnostic est confirmé génétiquement, le plus souvent par l'identification de variants pathogènes *UROS* bialléliques ou, en de rares occasions, par l'identification d'un variant pathogène sur le gène *GATA-1*<sup>1,29</sup>.



Figure 3 - Couche d'un nourrisson atteint de PEC<sup>67</sup>

Couche d'un nourrisson atteint de PEC. L'urine du patient colore la couche d'une couleur rougeâtre en raison de l'accumulation de porphyrines de type I (à gauche). Les porphyrines accumulées sont fluorescentes lorsqu'elles sont éclairées par une lumière ultraviolette (à droite).

### 1.3. Prise en charge actuelle

À ce jour, la greffe de moelle osseuse est le seul traitement curatif spécifique de la PEC. Elle est destinée aux patients présentant un phénotype sévère, à la condition qu'un donneur compatible HLA soit disponible. Le système érythropoïétique étant le site métabolique prédominant de la maladie chez les patients, la greffe de moelle osseuse permet de réduire fortement les taux de porphyrines et les complications cutanées<sup>64-66</sup>.

Les autres options de traitement reposent principalement sur des mesures de soutien visant à réduire les symptômes. Il est conseillé aux patients d'utiliser des protections solaires pour les protéger de la lumière : vêtements couvrants, lunettes de protection, lotions de protection solaire réfléchissantes contenant de l'oxyde de zinc ou de l'oxyde de titane et films de protection sur les fenêtres<sup>67</sup>. La prise de médicaments photoprotecteurs comme les  $\beta$ -

carotènes, dont les propriétés antioxydantes limitent la photosensibilité, est également recommandée<sup>68</sup>. Ces traitements peuvent être bénéfiques, mais ne remplacent pas l'évitement strict de l'exposition au soleil et à la lumière. Chez les nouveau-nés atteints de PEC, un diagnostic le plus précoce possible est préférable afin d'éviter la photothérapie pour le traitement de la jaunisse néonatale.

Tout au long de leur vie, la plupart des personnes atteintes de PEC tentent d'adapter leur vie quotidienne afin de réduire au maximum l'exposition à la lumière, ce qui, dans certains cas, inclut le choix d'une profession qui permet de travailler la nuit. Cela conduit à une vie familiale et sociale très restreinte et la qualité de vie est souvent considérablement réduite<sup>69</sup>.

Les lésions cutanées doivent être soignées afin de prévenir l'infection des plaies ouvertes. Un traitement antiseptique et antibiotique topique et/ou orale peut être indiqué pour éviter une progression des cicatrices et mutilations éventuelles. Un traitement topique avec une solution d'acide hypochloreux peut être également utilisé afin de minimiser la colonisation bactérienne des zones touchées<sup>70</sup>. Une intervention chirurgicale peut être indiquée en cas d'ulcérations ou de mutilations graves du nez, yeux (cornée et paupières), des mains ou de la bouche par exemple<sup>67</sup>.

Concernant les complications osseuses, une supplémentation en vitamine D est indiquée pour éviter une déminéralisation osseuse et des bisphosphonates sont envisagés chez les personnes atteintes d'ostéoporose<sup>71</sup>.

Enfin, l'anémie hémolytique est traitée par transfusion sanguine (toutes les 2 à 4 semaines), cela réduit les niveaux de porphyrines et la photosensibilité cutanée<sup>72</sup>. Ce traitement est parfois responsable d'une hémochromatose secondaire grave<sup>71</sup>. La splénectomie est envisagée chez certains patients, elle peut améliorer la durée de vie des globules rouges et réduire considérablement les besoins de transfusion chez certains patients. Elle entraîne indirectement une réduction de la photosensibilité<sup>72</sup>.

Le tableau suivant regroupe de manière non exhaustive les différents traitements les plus utilisés chez les patients atteints de la PEC (Tableau 1). D'autres pistes de traitements ont été étudiées ou sont actuellement en cours d'études dans plusieurs équipes de recherche. Ceci fera l'objet de la deuxième partie de cette thèse.

Traitements	Effets recherchés	Remarques
<b>Greffe de moelle osseuse</b>	Rétablissement de la biosynthèse de l'hème dans les érythrocytes	Patient sévèrement atteint Donneur HLA compatible disponible
<b>Transfusion sanguine</b>	Diminution de l'anémie hémolytique, de l'érythropoïèse et de la production de porphyrines	Seulement si patient anémié Possible hémochromatose secondaire
<b>Splénectomie</b>	Diminution de l'érythropoïèse et de la production de porphyrines	Réduit la fréquence des transfusions sanguines
<b>Protections solaires (vêtements, crèmes, filtres UVs)</b>	Photoprotection à la lumière visible	Ne remplace pas l'évitement strict de l'exposition à la lumière
<b><math>\beta</math>-carotènes</b>	Réduction de la photosensibilité	Antioxydant
<b>Antiseptique et Antibiotique</b>	Progression des cicatrices et mutilations éventuelles	
<b>Vitamine D</b>	Prévention d'une déminéralisation osseuse	
<b>Biphosphonates</b>	Traitement de l'ostéoporose	
<b>Chirurgie</b>	Traitement des lésions qui ne guérissent pas ou de photomutilations sévères entraînant un handicap fonctionnel	Chirurgie dentaire, reconstruction nasale, chirurgie de la main, greffe de cornée

Tableau 1 - Les différents traitements de la PEC

## **Etat de la recherche**

## 2. Etat de la recherche

Actuellement, il n'y a pas d'essais cliniques visant à traiter la PEC chez l'Homme. De nouvelles options thérapeutiques moléculaires et pharmacologiques sont en cours d'études au sein des laboratoires de recherche afin d'améliorer la prise en charge des patients. En France, le Centre Français des Porphyrines ou Centre de Référence Maladies Rares pour les Porphyrines, a pour objectif la prise en charge globale des patients porphyriques depuis le diagnostic, le conseil génétique, les enquêtes familiales et l'hygiène de vie, jusqu'au traitement<sup>73</sup>. Au niveau Européen, l'*European porphyria network* : EPNET promeut la recherche fondamentale et clinique et centralise les connaissances sur les porphyries. Ce réseau facilite les meilleures pratiques dans le traitement des porphyries et leur diagnostic en interconnectant les activités des spécialistes répartis dans les différents centres de référence européens<sup>74</sup>.

### 2.1. Thérapie génique

Il est important de distinguer deux types de thérapies géniques : la thérapie génique additive et l'édition génique. La thérapie génique additive, étudiée depuis de nombreuses années pour le traitement de la PEC, vise à introduire une copie saine du gène muté à l'origine de la pathologie. L'édition génique a pour but de corriger directement le gène d'intérêt, son apparition récente a permis d'étendre les perspectives thérapeutiques de la PEC.

Dans la PEC, les porphyrines non physiologiques de type I proviennent de la moelle osseuse et plus particulièrement de la lignée érythroïde. La greffe de moelle osseuse représente un traitement curatif chez les patients les plus sévèrement touchés par la maladie, lorsque des donneurs compatibles HLA sont disponibles<sup>64-66</sup>. Cependant, compte tenu du risque de morbidité et de mortalité associé à la greffe, ce traitement n'est envisagé que pour les cas les plus sévères. La gravité clinique de la maladie et l'absence de traitement spécifique, hormis la greffe de moelle osseuse, sont des arguments de poids en faveur de la thérapie génique<sup>75</sup>. La transplantation de cellules souches hématopoïétiques autologues corrigées génétiquement offrirait des avantages significatifs par rapport à la greffe allogène, en diminuant les risques de maladie du greffon contre l'hôte et de rejet du greffon (*Graft versus Host Disease, GvHD*)<sup>76</sup>.

Des modèles murins de la PEC ont été développés et reproduisent la plupart des caractéristiques de la maladie humaine : photosensibilité cutanée, taux important de porphyrines plasmatiques, urinaires et fécales ou encore anémie hémolytique. Ces modèles permettent une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la PEC ainsi que le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques<sup>77</sup>. Il a été montré que le KO du gène *UROS*, c'est-à-dire l'inactivation du gène, est létal chez la souris<sup>61</sup>. Par la suite, plusieurs équipes ont développé des modèles murins portant certaines des mutations les plus répandues et les plus sévères de la PEC<sup>78-80</sup>. L'un de ces modèles développés dans notre laboratoire a été utilisé pour vérifier la faisabilité de la thérapie génique dans la PEC. Le modèle reproduit la mutation faux-sens P248Q du gène *UROS* responsable d'une grave déficience en UROS chez l'Homme. Les souris homozygotes *UROS*<sup>mut248/mut248</sup> reproduisent étroitement les symptômes observés chez les patients<sup>78</sup>. La thérapie génique additive *ex vivo* développée dans le laboratoire utilise des cellules souches hématopoïétiques murines génétiquement modifiées (Fig.4). Premièrement, des cellules souches hématopoïétiques de souris mutantes *UROS*<sup>mut248/mut248</sup> ont été prélevées puis transduites *ex vivo* par des vecteurs lentiviraux portant l'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) du gène *UROS* non-muté (*wild-type* ou WT) humain. Dans un deuxième temps, ces cellules souches hématopoïétiques génétiquement modifiées ont été réinjectées dans les souris mutantes *UROS*<sup>mut248/mut248</sup>. Il a été montré une correction enzymatique, métabolique et phénotypique complète chez les souris greffées, renforcée par une augmentation de la survie des globules rouges corrigés<sup>81</sup>. Ces données ont constitué une preuve de concept d'une thérapie génique réussie pour la PEC. Toutefois, des rapports sur l'oncogenèse d'insertion provirale dans la thérapie génique médiée par les rétrovirus soulignent la nécessité de méthodes plus sûres<sup>82,83</sup>.

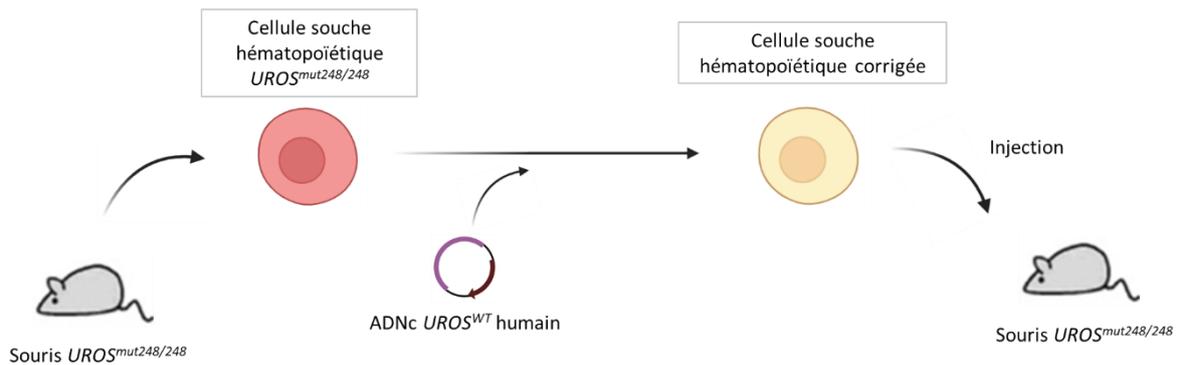


Figure 4 - Correction du phénotype de la PEC d'un modèle murin par thérapie génique additive ex vivo. (Figure adaptée<sup>79</sup>).

Des cellules souches hématopoïétiques sont prélevées de souris mutantes  $UROS^{mut248/mut248}$  modélisant la PEC. Les cellules sont transduites avec un vecteur lentiviral portant l'ADNc du gène  $UROS^{WT}$  puis réinjectées dans les souris mutantes. Les souris greffées présentent une correction enzymatique, métabolique et phénotypique complète.

Figure réalisée à l'aide de biorender.com

En parallèle, le Professeur Shinya Yamanaka et ses collaborateurs ont découvert des facteurs de transcription clés permettant la reprogrammation d'une cellule somatique en une cellule souche pluripotente, appelées cellule souche pluripotente induite (*induced Pluripotent Stem Cell* ou iPSC)<sup>84</sup>. Ces facteurs de transduction : Oct3/Oct4, SOX2, KLF4 et c-myc font partis du « cocktail Yamanaka », du nom du chercheur japonais qui a obtenu conjointement au britannique John Gurdon le Prix Nobel de Médecine en 2012 pour la découverte que les cellules matures peuvent être reprogrammées pour devenir pluripotentes. Ces cellules permettent une sélection clonale de cellules corrigées avec une intégration plus sûre des provirus<sup>85</sup>. De plus, comme les iPSCs peuvent être maintenues indéfiniment *in vitro*, elles représentent une source illimitée de cellules, ce qui permet de surmonter la difficulté d'obtenir des quantités suffisantes de cellules souches hématopoïétiques autologues lors de la transplantation.

Des iPSCs humaines ont été obtenues dans notre laboratoire en reprogrammant des kératinocytes d'un patient atteint de PEC à l'aide de vecteurs lentiviraux codant pour les quatre facteurs de transcription du « cocktail Yamanaka » (Fig. 5). Les iPSCs ont été corrigées par transduction lentivirale d'un vecteur thérapeutique contenant l'ADNc  $UROS^{WT}$ . Afin de développer des iPSCs sûres, sans facteur de reprogrammation exogène, les cassettes de reprogrammation ont été excisées à l'aide d'un adénovirus portant l'ADNc d'une recombinase. Après une différenciation en cellules souches hématopoïétiques, les cellules

érythroïdes dérivées de ces iPSCs corrigées ont montré une correction métabolique et enzymatique du défaut en UROS<sup>86</sup>. L'étude *in vivo* rend compte de la faisabilité de la thérapie génique de la porphyrie avec l'utilisation des iPSCs. Néanmoins, la différenciation hématopoïétique des cellules iPSCs ne permet pas d'obtenir des cellules CD34<sup>+</sup> nécessaire pour réaliser une greffe. Ceci rend difficile la traduction clinique de cette thérapie régénérative et à l'heure actuelle, aucun essai clinique n'a été réalisé chez l'Homme<sup>87</sup>.

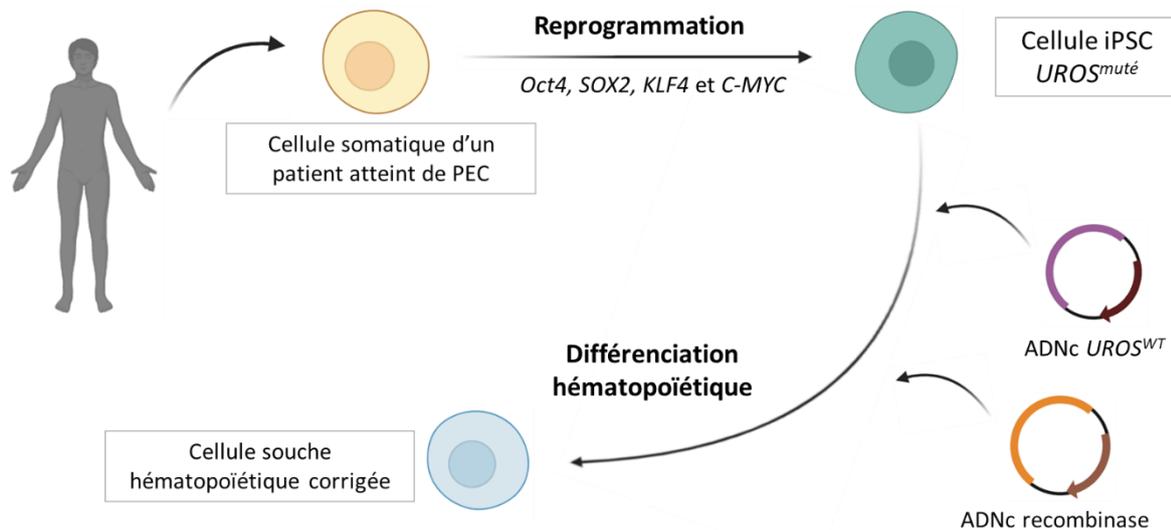


Figure 5 - Reprogrammation cellulaire et Thérapie génique additive de la PEC. (Figure adaptée<sup>84</sup>)

Des cellules somatiques sont prélevées d'un patient atteint de PEC et sont reprogrammées à l'aide de vecteurs lentiviraux codant pour les facteurs de transcription Oct4, SOX2, KLF4 et c-myc. Les iPSCs sont transduites avec un vecteur lentiviral portant l'ADNc du gène UROS<sup>WT</sup> puis avec adénovirus codant pour une recombinaise (CRE) afin d'obtenir des cellules dépourvues de facteur de reprogrammation exogène. Une différenciation hématopoïétique permet d'obtenir des cellules souches hématopoïétiques métaboliquement corrigées.

Figure réalisée à l'aide de biorender.com

L'édition génique est apparue plus récemment et étend les possibilités thérapeutiques de la PEC. Le système CRISPR/Cas9 en particulier est une alternative séduisante à la thérapie génique additive<sup>88</sup>. En effet, la modification d'un gène de manière endogène, en supprimant ou en corrigeant les mutations délétères plutôt qu'en ajoutant un nouveau transgène, permet de résoudre la mutagenèse d'insertion et la régulation non physiologique des gènes<sup>89,90</sup>. CRISPR/Cas9 est un système d'endonucléase guidée par un guide d'acide ribonucléique (ARNg) capable de cibler spécifiquement la séquence génomique complémentaire. Ce système peut être utilisé directement en édition génique à des fins thérapeutiques mais également comme outils pour la recherche préclinique. La troisième et dernière partie de

cette thèse présentera une des façons d'utiliser ce système comme outils de recherche et décrira plus en détail le système CRISPR/Cas9 : ses composants, son mécanisme d'action, ses applications et ses limites.

Récemment, notre laboratoire a corrigé les cellules iPSCs dérivés d'un patient atteint de PEC et porteur de deux mutations hétérozygotes du gène UROS par édition du génome à l'aide du système CRISPR/Cas9<sup>91</sup>. Pour rappel, la PEC étant de transmission autosomique récessive, le patient doit avoir ses deux allèles mutés pour être atteint de la maladie. Les mutations peuvent parfois être homozygotes mais sont souvent hétérozygotes composites. Afin de corriger parfaitement les mutations et obtenir une correction efficace de la PEC, des ARNg spécifiques à chaque allèle muté ont été conçus. À notre connaissance, il s'agit de la première correction de cellules iPSCs dérivées d'un patient atteint de PEC par le système CRISPR/Cas9.

## 2.2. Stabilisation de l'enzyme UROS

En parallèle, de nouvelles approches pharmacologiques ont été investiguées afin d'augmenter l'activité de l'enzyme UROS mutée codée par des mutations de faux-sens. La plupart des mutations du gènes *UROS* responsables de la PEC sont des mutations faux-sens (58,8%), c'est-à-dire des mutations ponctuelles entraînant le changement d'un acide aminé<sup>69</sup>. Au niveau de la protéine, un changement d'acide aminé peut induire une modification structurelle pouvant altérer directement son activité catalytique ou déstabiliser la molécule, entraînant une dégradation prématurée de celle-ci. Le degré d'altération de l'activité d'UROS et l'accumulation de composés photoréactifs de porphyrines de type I et ses dérivées seraient corrélés avec la gravité de la maladie<sup>92</sup>. Des analyses fonctionnelles ont indiqué que les paramètres cinétiques modifiés pour la plupart des mutations faux-sens étaient principalement liés à une baisse de l'expression et du rendement de purification de la protéine plutôt qu'à une altération spécifique de l'activité enzymatique intrinsèque<sup>93</sup>.

Les deux mutations faux-sens les plus sévères de la PEC sont la mutation C73R et la mutation P248Q. Pour la mutation C73R, une conversion cystéine-arginine survient au niveau de l'acide aminé 73 de l'exon 4 du gène *UROS* et est présente dans près d'un tiers de tous les cas de PEC signalés<sup>94</sup>. Moins fréquente, la mutation P248Q est située sur le 10ème et dernier exon du gène *UROS* et consiste en une conversion proline-glutamine. Il a été démontré qu'une

modification structurelle de la protéine entraîne une instabilité thermodynamique et une dégradation prématurée de celles-ci<sup>95,96</sup>. Deux stratégies ont été mises en place afin de corriger la dégradation prématurée et/ou la diminution de l'activité d'UROS.

### 2.2.1 Inhibition du protéasome

Lorsque des mutations génétiques sont responsables du mauvais repliement des protéines, comme c'est le cas des mutations *UROS*<sup>C73R</sup> et *UROS*<sup>P248Q</sup>, la stabilité thermodynamique réduite et l'accumulation des protéines conduisent à un stress du réticulum endoplasmique (RE). Le RE répond à ce stress par l'*unfolded protein response* ou « réponse protéine dépliée ». En effet, le réticulum va faire appel à des molécules chaperonnes afin de stabiliser les protéines anormales. Si cette étape de réparation n'est pas possible, les protéines sont dégradées par le système du protéasome<sup>97</sup>. Il a été montré que les enzymes mutées *UROS*<sup>C73R</sup> et *UROS*<sup>P248Q</sup> sont dégradées de manière prématurée par le protéasome, les rendant indétectables dans les cellules humaines<sup>96,98</sup>. La stabilité d'UROS a été simulée dans une étude plus étendue pour chaque mutation faux-sens décrite chez les patients atteints de PEC<sup>99</sup>. La plupart des mutations faux-sens du gène *UROS* entraînent une instabilité thermodynamique affectant la structure de la protéine et augmentant leur dégradation prématurée.

La validation clinique des inhibiteurs du protéasome comme cible moléculaire a déjà été obtenue avec l'approbation du Bortézomib pour le traitement du myélome multiple et du lymphome à cellules du manteau. Les effets secondaires ont été pleinement explorés et contrôlés dans le cadre d'essais cliniques<sup>100</sup>. Beaucoup de cancers dépendent de la forte activité du protéasome pour dégrader les suppresseurs de tumeurs et les inhibiteurs de points de contrôle du cycle cellulaire nécessaires à une division cellulaire rapide. De manière général, de nombreux processus cellulaires reposent sur la fonction du protéasome, ce qui en fait une cible cruciale pour de futures interventions thérapeutiques dans de nombreuses maladies<sup>101</sup>. Au-delà des cancers, la régulation du protéasome est actuellement étudiée pour le traitement de maladies neurodégénératives tel qu'Alzheimer et Parkinson, de la mucoviscidose, de maladies auto-immunes, du diabète mais aussi de la PEC<sup>102,103</sup>.

En effet, dans la PEC, le processus de dégradation des enzymes *UROS*<sup>C73R</sup> et *UROS*<sup>P248Q</sup> peut être inversé en inhibant l'activité du protéasome. L'équipe de Fortian *et al* a observé une

correction *in vitro* de l'expression d'UROSC<sup>73R</sup> après traitement par l'inhibiteur du protéasome MG132<sup>98</sup>. Nous savons désormais que la dégradation d'UROSC ne dépend pas de la voie de dégradation lysosomale, puisque aucune restauration de l'expression de l'enzyme muté n'est observée lorsque la voie lysosomale est inhibée par la chloroquine ou du NH<sub>4</sub>Cl. Cela explique entre autre l'échec du traitement à la chloroquine chez les patients atteints de PEC<sup>104</sup>. Par la suite, notre équipe a étendu ces résultats prometteurs à la mutation *UROSP*<sup>248Q</sup>, *in vitro* dans des cellules érythroïdes humaines et *in vivo* en utilisant le modèle de souris PEC *UROSmut248/mut248* évoqué précédemment<sup>96</sup>. Il a été observé une correction métabolique partielle avec une réduction de l'accumulation de porphyrines ainsi qu'une réversion de la photosensibilité cutanée chez des souris PEC traitées avec du Bortézomib. En plus des mutations *UROSC*<sup>73R</sup> et *UROSP*<sup>248Q</sup>, le Bortézomib améliore également la préservation de protéines UROS mal repliées, codées par de nombreuses mutations faux-sens responsables de la PEC<sup>99</sup>.

Ces résultats plaident en faveur de l'extension de l'utilisation des inhibiteurs du protéasome. Toutefois, aucune amélioration de l'anémie hémolytique n'a été observée. De plus, l'inhibition non spécifique à long terme de la dégradation anormale des protéines pourrait entraîner des effets toxiques graves, en particulier dans le système nerveux central. Ceci constitue la limite de cette approche et ne garantit pas un choix thérapeutique sûr pour la PEC<sup>105,106</sup>.

### 2.2.2. Utilisation d'une molécule chaperonne

Afin de remédier aux effets potentiellement nocifs de l'inhibition du protéasome, les molécules chaperonnes constituent une nouvelle alternative. Ces petites molécules sont capables de se lier spécifiquement et de stabiliser la conformation des protéines mutées instables, empêchant ainsi une dégradation précoce et permettant un trafic et une localisation cellulaire appropriée. De plus, nous savons qu'il existe une corrélation entre la demi-vie *in vitro* des protéines mutées et leur niveau d'expression dans les lignées cellulaires eucaryotes. En incorporant des résidus capables d'interagir avec la région mutée de l'enzyme pour stabiliser la région charnière, l'activité catalytique peut être restaurée<sup>98</sup>. Les molécules chaperonnes ont déjà été évaluées avec succès dans de nombreuses maladies génétiques héréditaires<sup>107,108</sup>.

La structure de l'enzyme mutée UROS<sup>C73R</sup>, la mutation la plus courante et une des plus agressive de la PEC, a été étudiée et modélisée afin de comprendre par quel mécanisme la mutation induit une perte de fonctionnalité enzymatique<sup>94,109</sup>. L'équipe du Docteur Oscar Millet a localisé la mutation C73R sur une région hélicoïdale de la molécule, essentielle à la stabilité thermodynamique de la forme repliée<sup>93</sup>. Il a été montré que l'enzyme UROS<sup>C73R</sup> conserve partiellement son activité catalytique, la protéine est repliée mais subit un changement de conformation entraînant une diminution de sa stabilité et donc sa dégradation prématurée<sup>95,98</sup>. Par la suite, l'équipe a montré que le Ciclopirox, un antifongique de synthèse, stabilise l'UROS *in vitro* et *in vivo* de manière allostérique, c'est-à-dire sans entrer en compétition avec le substrat. Ce composé a été sélectionné après avoir évalué plusieurs milliers de candidats susceptibles de stabiliser et de restaurer les propriétés homéostatiques de l'UROS<sup>95,110</sup>. L'administration orale de Ciclopirox augmente l'activité de l'UROS et réduit les symptômes cliniques des souris PEC, en diminuant le taux d'URO I dans le sang, en réduisant la splénomégalie et les porphyrines hépatiques, entre autres.

Ces résultats suggèrent l'utilisation de molécules chaperonnes et en particulier du Ciclopirox comme thérapie de la PEC. Cependant, le Ciclopirox est initialement indiqué en usage local pour les onychomycoses. Par voie orale, les souris ont développé une importante intolérance gastro-intestinale. Ainsi, le principal problème de l'utilisation de cette molécule pour le traitement de la PEC est la faible biodisponibilité de ce dernier et donc une concentration élevée et continue de médicament dans le tractus gastro-intestinal. Il reste à vérifier si l'utilisation de pro-médicaments ou un changement du mode d'administration permet d'améliorer le profil pharmacocinétique du Ciclopirox. Ainsi, d'autres travaux seront nécessaires pour montrer si ce médicament, qui n'est plus couvert par un brevet, convient à un traitement chronique de la PEC.

### 2.3. Stratégies de réduction du substrat

La PEC est une maladie métabolique de surcharge, en effet c'est l'accumulation anormale des porphyrines de type I qui entraîne les manifestations cliniques de la maladie. Une stratégie thérapeutique de réduction du substrat visant à moduler le flux métabolique afin de diminuer l'accumulation toxique de substrats a été utilisée avec succès dans plusieurs maladies

métaboliques héréditaires et constitue une nouvelle option thérapeutique<sup>111</sup>. Appliquée à la PEC, la stratégie prometteuse consiste à réduire la production érythroïde de porphyrines en inhibant l'enzyme ALAS2.

Comme décrit précédemment, la biosynthèse de l'hème est principalement régulée au niveau de la première étape catalysée par l'ALAS, l'enzyme limitante de la voie métabolique. Chez l'Homme, il existe deux isoformes de cette enzyme : ALAS1 et ALAS2. ALAS1 est ubiquitaire et régulée principalement par l'hème par rétroactions négatives. Lorsque l'hème est en quantité abondante dans l'organisme, un contrôle négatif de l'hème sur ALAS1 est mis en place. C'est pourquoi l'hémine (hème) est une thérapie efficace pour les porphyries hépatiques, telles que la PAI<sup>33</sup>. De même, un médicament récemment approuvé, le Givosiran, un petit ARN interférent qui inhibe l'expression de l'ALAS1, améliore les symptômes de la PAI<sup>112</sup>. ALAS2 est exprimée principalement dans les cellules érythroïdes en développement et n'est pas régulée par l'hème. Une thérapie utilisant de l'hème ou le Givosiran spécifique de l'ALAS1 n'est donc pas efficace dans la PEC. Ainsi, afin d'élaborer une stratégie de réduction du substrat efficace appliquée à la PEC, il semble essentiel de limiter la première étape de la voie métabolique dans les cellules érythroïdes, en réduisant l'activité d'ALAS2. Durant l'érythropoïèse, l'expression d'ALAS2 est régulée principalement par la biodisponibilité en fer<sup>14</sup>. On retrouve dans la partie 5' non traduite de l'ARNm ALAS2 un élément de réponse au fer (IRE pour *Iron-Responsive Element*). Lorsque la disponibilité en fer est faible, les protéines de liaison à l'IRE (IRP pour *Iron-Regulatory Protein*), et IRP2 en particulier, se lient à l'IRE, bloquent la traduction et diminuent l'activité ALAS2 et donc la biosynthèse de l'hème<sup>13,113</sup> (Fig. 6).

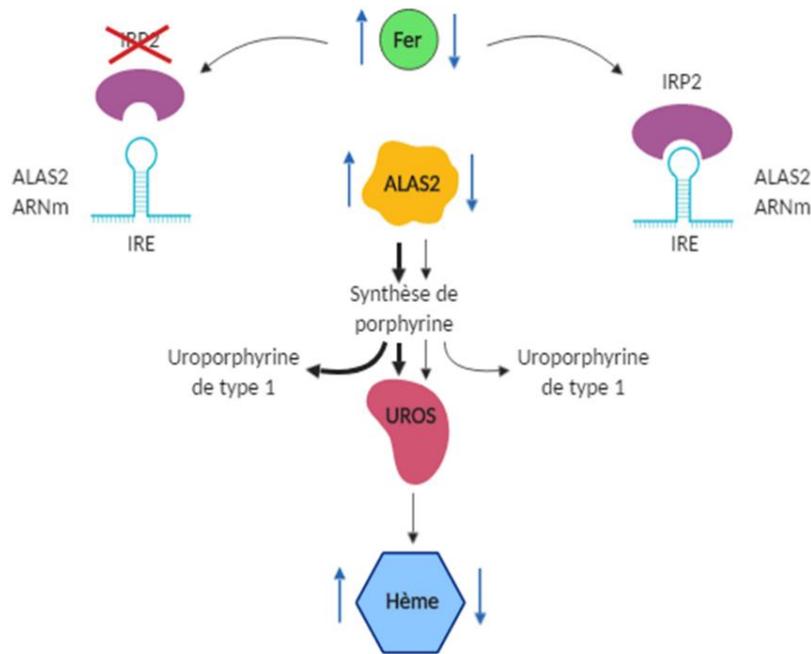


Figure 6 - Régulation de l'expression d'ALAS2 par le fer (Figure adaptée<sup>113</sup>)

L'expression d'ALAS2 est régulée par la disponibilité en fer, cela s'explique par la présence d'un élément de réponse au fer (IRE) dans la partie 5' non traduite de l'ARN messager de l'enzyme. Lorsqu'on a une faible disponibilité en fer, la protéine de réponse au fer (IRP2) vient se lier à l'IRE, bloque la traduction et diminue l'expression d'ALAS2. La diminution de l'ALAS2 diminue la synthèse de porphyrine et par conséquent la synthèse d'uroporphyrine de type 1 chez les patients atteints de PEC.

Figure réalisée à l'aide de biorender.com

Le rôle d'ALAS2 comme modulateur de la sévérité des différentes porphyries érythropoïétiques a été démontré ces dernières années dans plusieurs études<sup>14,114,115</sup>. L'augmentation de l'activité ALAS2 augmente la synthèse et l'accumulation de porphyrines responsables des porphyries, tandis qu'une inhibition excessive peut induire une érythropoïèse inefficace. En effet, les mutations « gain de fonction » d'ALAS2 sont responsables de la protoporphyrie liée à l'X et sont également associées à une sévérité accrue de la maladie chez les patients PEC<sup>47,116</sup>. À l'inverse un déficit en ALAS2 est responsable de l'anémie sidéroblastique liée à l'X, caractérisée par des mutations « perte de fonction » du gène ALAS2<sup>49</sup>.

### 2.3.1. Chélation du fer et Phlébotomie

La plupart des patients PEC non dépendants de la transfusion présentent des symptômes hématologiques modérés à légers, sans anémie hémolytique chronique ni surcharge en fer<sup>71</sup>.

L'anémie hémolytique étant une caractéristique des formes graves, il est probable que la surcharge en fer soit propre à cette catégorie de patients mais qu'elle soit sous-estimée et mal signalée.

Dans les maladies rares telles que la PEC, il est difficile de procéder à des essais cliniques rigoureux et l'efficacité thérapeutique des potentiels traitements est généralement démontrée par une série d'études de cas. En 2015, Egan *et al* ont constaté une amélioration majeure et spontanée des symptômes de la PEC chez une patiente souffrant d'une carence en fer due à une hémorragie gastro-intestinale<sup>117</sup>. Par la suite, le traitement (hors indication) de cette patiente avec un chélateur du fer, le Deferasirox, a conduit à une amélioration remarquable de la maladie : correction de l'hémolyse, diminution du taux de porphyrines et amélioration de la qualité de vie avec une photosensibilité réduite. Ils ont également démontré que la carence en fer diminue l'expression d'ALAS2 et la production de porphyrine dans une lignée érythroïde issues de cellules de la moelle osseuse du patient. Néanmoins, l'utilisation chronique du Déférasirox est associée à des effets secondaires importants tels que des hémorragies gastro-intestinales et des insuffisances rénales et hépatiques<sup>118</sup>.

D'autres chélateurs du fer sont utilisés pour éliminer les complexes de fer par l'urine ou les fèces, et parmi eux, le Défériprone a été le premier composé actif par voie orale utilisé avec succès chez l'homme<sup>119,120</sup>. En 2020, notre équipe a montré dans des modèles cellulaires humains de PEC que l'utilisation du Défériprone diminue l'expression d'ALAS2 et réduit l'accumulation de porphyrines<sup>121</sup>. Dans cette expérience, une réduction d'environ 50% de l'expression d'ALAS2 a réduit de manière importante l'accumulation de porphyrines dans les cellules érythroïdes déficientes en UROS. Nous avons observé une diminution significative de la surcharge en porphyrines toxiques chez les souris PEC, diminuant ainsi leur photosensibilité cutanée et améliorant considérablement leur anémie hémolytique après 6 mois de traitement par voie orale. Ce dernier résultat s'expliquerait par une érythropoïèse plus efficace et à une plus grande survie des érythrocytes due à la diminution de l'accumulation des porphyrines dans la moelle osseuse et les globules rouges. Cependant, comme nous avons observé une tendance à la microcytose chez les souris PEC après un traitement de longue durée avec des chélateurs du fer, il serait important de surveiller attentivement l'apparition de l'anémie due à une carence en fer en étude clinique.

En parallèle de cette étude sur la chélation du fer comme traitement de la PEC, nous avons récemment obtenu une amélioration clinique des symptômes d'une patiente traitée par phlébotomies répétées<sup>122</sup>. La phlébotomie est une pratique ancestrale consistant à provoquer une perte de sang (saignée) à des fins thérapeutiques. Dans le cas de la PEC, la phlébotomie est utilisée afin d'induire une déplétion en fer à long terme. Suite aux phlébotomies répétées (tous les mois en moyenne), nous avons observé chez cette patiente l'arrêt de l'hémolyse et une diminution importante des porphyrines plasmatiques et urinaires. Après réduction des réserves en fer par cette pratique, les niveaux de porphyrines urinaires ont atteint un niveau proche de celui observé chez les patients atteints de PEC après une greffe de moelle osseuse<sup>71</sup>. La patiente traitée pendant presque 2 ans a présenté une amélioration majeure de sa photosensibilité, améliorant ainsi sa qualité de vie. L'équipe a également démontré *in vitro* que la teneur en fer module la production de porphyrines dans les cellules érythroïdes dérivées des cellules du sang périphérique de patient atteints de PEC.

Les phlébotomies peuvent être utilisées chez les patients atteints d'anémie hémolytique mineure n'ayant pas besoin de transfusion chronique ou lorsque la greffe de moelle osseuse n'est pas disponible, cette dernière restant le traitement de première ligne chez les patients dépendant d'une transfusion<sup>122</sup>. L'utilisation d'un chélateur du fer offre un traitement efficace en cas de surcharge en fer mais certains paramètres, notamment sa toxicité lors d'un traitement chronique, restent à être évalués. À l'inverse, les phlébotomies ont été utilisées en toute sécurité comme traitement à long terme dans d'autres pathologies comme par exemple chez les adultes et enfants atteints de la maladie de l'hémoglobine SC, un type d'anémie falciforme, pour réduire la viscosité du sang<sup>123,124</sup>. Il est toutefois envisageable d'utiliser un chélateur du fer dans un premier temps pour réduire les réserves de fer. Des phlébotomies pourraient ensuite être indiquées pour maintenir un faible niveau de ferritine. Cette stratégie en deux étapes permet d'éviter l'induction initiale de l'érythropoïèse et la toxicité à long terme des chélateurs du fer. Pour les patients souffrant d'anémie sévère et chez qui les phlébotomies répétées sont contre-indiquées, nous proposons d'utiliser une chélation du fer à faible dose afin de maîtriser l'anémie hémolytique<sup>121</sup>.

Ces différents résultats avancent que la réduction de la biodisponibilité du fer, par chélation ou par phlébotomie, devrait être utilisée pour traiter la PEC<sup>125</sup>. Par cette stratégie de réduction du substrat, la voie de biosynthèse de l'hème est ralentie et l'accumulation de porphyrines de

type I est diminuée. Chez les souris et les patients atteints de PEC, cette stratégie s'est avérée efficace sans provoquer d'anémie ferriprive sévère.

### 2.3.2. Inhibition directe d'ALAS2

Il a été démontré que l'inhibition d'ALAS2 est une stratégie thérapeutique efficace pour réduire la production de porphyrine et améliorer les résultats cliniques de la PEC<sup>121</sup>. Bien que l'efficacité et la sécurité de la chélation chronique du fer à long terme chez les patients restent à déterminer, les résultats précédents ouvrent la voie au développement d'inhibiteurs de l'ALAS2 spécifiques comme futur traitement de la PEC.

L'isoniazide est un antituberculeux synthétique, il constitue un puissant inhibiteur de l'ALAS2 et peut induire une anémie sidéroblastique en cas d'effets indésirables chez certains patients<sup>126,127</sup>. Il a été montré que l'isoniazide inhibe de manière dose-dépendante l'ALAS2 *in vitro* dans des érythroblastes de moelle osseuse<sup>128</sup>. Cette étude a conclu que l'isoniazide inhibe de manière indirecte l'ALAS2. Une étude plus récente a étudié le mécanisme d'action de l'INH sur l'ALAS2 et a montré qu'il pouvait inhiber directement l'ALAS2<sup>129</sup>. Il a été observé une réduction de l'accumulation de PPIX dans les modèles cellulaires et murins de protoporphyrie traités par l'isoniazide. Cependant, l'essai clinique effectué sur des patients atteints de PPE ou de PDLX n'a pas confirmé l'effet thérapeutique de l'isoniazide administré aux doses standards utilisées dans le traitement de la tuberculose<sup>130</sup>. Les modèles murins ont été traités avec une dose plus élevée mais les recommandations limitent la dose d'isoniazide chez les patients en raison de sa toxicité. Des inhibiteurs spécifiques de l'ALAS2 plus sûrs sont nécessaires pour le traitement des porphyries érythropoïétiques dont fait partie la PEC.

Un des nouveaux projets de recherche de notre équipe a pour but d'identifier une molécule inhibitrice spécifique de l'ALAS2 par des approches complémentaires *in silico*, *in cellulo* et *in vivo*. Durant mon stage de 5<sup>ème</sup> année de pharmacie, j'ai participé à l'étape initiale de la partie cellulaire du projet, c'est à dire la création de modèles cellulaires pertinents qui nous permettront de cribler les inhibiteurs potentiels, déterminés *in silico* dans des banques de molécules par nos collaborateurs, l'équipe du Dr. Oscar Millet (CIC Biogune, Bilbao).

Afin de créer ces modèles cellulaires, nous avons choisi de surexprimer l'ALAS2 dans différentes lignées cellulaires par une approche lentivirale, dans le but d'induire une accumulation de porphyrines uniquement en modulant la voie de biosynthèse de l'hème *via*

l'expression d'ALAS2. Les porphyrines sont des molécules naturellement fluorescentes et leur accumulation dans les cellules est directement observable en cytométrie de flux (Fig. 7). Cette particularité sera mise à profit pour cribler et sélectionner les inhibiteurs d'ALAS2 les plus intéressants : une molécule inhibitrice devant diminuer la fluorescence cellulaire à l'inverse d'une molécule inefficace. Les cellules ont donc été transduites avec des particules lentivirales codant pour le gène ALAS2. Au bout de 6 jours, les cellules sont analysées par cytométrie de flux et caractérisées d'un point de vue moléculaire (nombre de copie ALAS2) et biochimique (dosage des porphyrines). Les cellules ont ensuite été sous-clonées puis les clones ont été analysés de la même manière. L'accumulation de porphyrines en réponse à une surexpression d'ALAS2 a été quantifiée afin de sélectionner les clones d'intérêts.

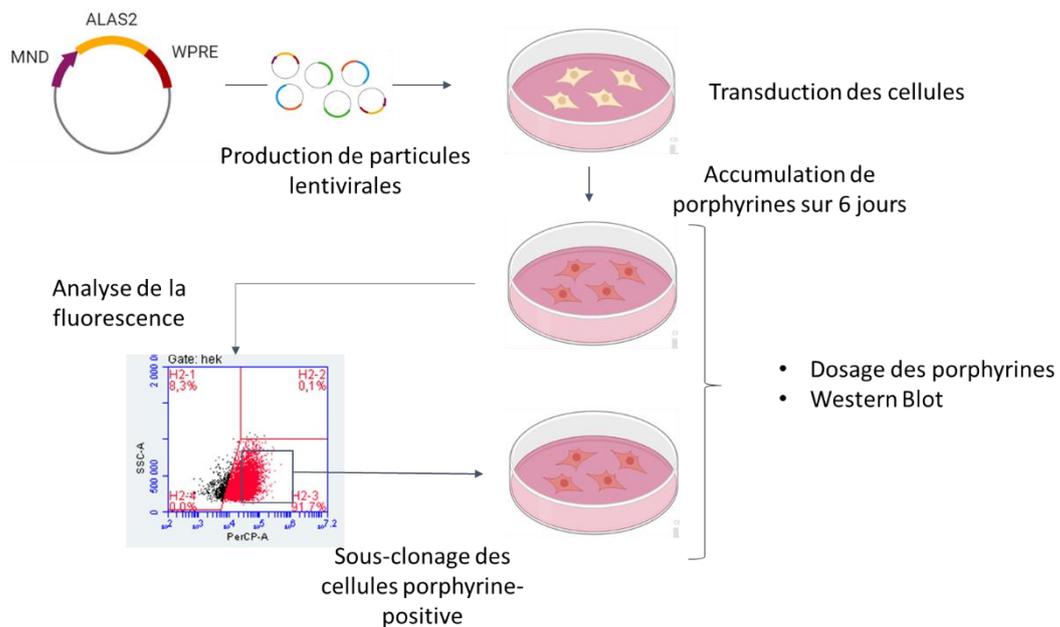


Figure 7 - Création de lignées cellulaires surexprimant ALAS2.

Production de particules lentivirales porteuses de l'ADNc ALAS2 et transduction dans différentes lignées cellulaires. La surexpression d'ALAS2 dans les cellules entraîne une accumulation de porphyrines (composé fluorescent rouge). Au bout de 6 jours, les cellules sont analysées par cytométrie de flux et caractérisées d'un point de vue moléculaire (nombre de copie ALAS2) et biochimique (dosage des porphyrines). Les cellules sont sous-clonées puis les clones sont analysés de la même manière.

Figure réalisée à l'aide de biorender.com

La validation d'un modèle cellulaire devant servir pour le criblage de molécules pharmacologiques doit répondre à certains critères. Un tel modèle doit présenter un caractère fonctionnel qui servira de base au criblage. Dans notre cas c'est l'accumulation des porphyrines en réponse à la surexpression d'ALAS2 qui est facilement détectable en cytométrie de flux qui servira au criblage des molécules à tester (Fig. 8). Les lignées cellulaires obtenues seront utilisées pour cribler les molécules candidates à l'inhibition de l'ALAS2. La molécule inhibitrice diminuera donc l'accumulation de porphyrines et donc la fluorescence des cellules. À l'inverse, si la molécule n'inhibe pas l'enzyme ALAS2, alors les cellules resteront fluorescentes. La suite du projet, c'est-à-dire le criblage fonctionnel des molécules candidates sélectionnées par nos collaborateurs espagnol sera effectué très prochainement par notre équipe.

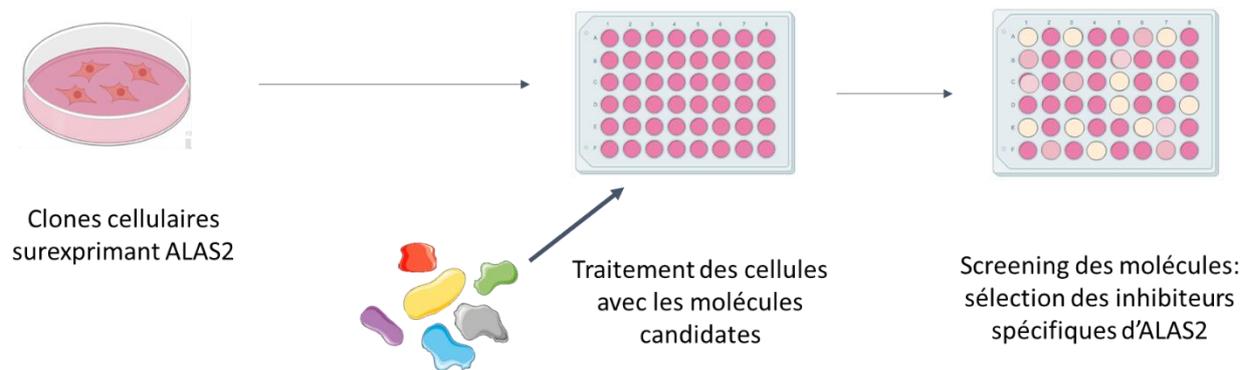


Figure 8 - Stratégie visant à identifier une molécule inhibitrice d'ALAS2 par un système de criblage fonctionnel.

Les cellules surexprimant ALAS2 accumulent des porphyrines et sont donc fluorescentes. Le criblage des molécules candidates sera réalisé par cytométrie de flux. L'inhibition de l'enzyme ALAS2 par une molécule diminuera l'accumulation de porphyrines et la fluorescence des cellules. À l'inverse, si la molécule n'inhibe pas l'enzyme ALAS2, alors les cellules resteront fluorescentes.

Figure réalisée à l'aide de biorender.com

Ainsi, de nouvelles options thérapeutiques moléculaires et pharmacologiques sont en cours d'études au sein du laboratoire pour améliorer la prise en charge des patients atteints de PEC (Fig. 9). Ces stratégies sont parfois sélectives et ne concerne qu'une partie des patients. Par exemple, la phlébotomie est réservée aux patients n'ayant pas besoin de transfusion chronique, et l'utilisation de molécule chaperonne et l'inhibition du protéasome ne concernent que certaines mutations faux-sens du gène *UROS*. La diversité des mutations responsables de la PEC et les divers symptômes rendent essentiel le développement de

plusieurs stratégies afin de traiter au mieux et spécifiquement les patients. Au fil des différentes innovations biotechnologiques ayant vu le jour ces dernières années, les équipes de recherches travaillant sur la PEC ont développé différentes approches thérapeutiques. L'édition génique du gène *UROS* à l'aide du système CRISPR-Cas 9 de cellules iPSCs est la dernière stratégie en date étudiée dans notre laboratoire, associant ainsi thérapie génique et cellulaire. De même, certains mécanismes moléculaires ont été découverts, et des stratégies plutôt pharmacologiques ont vu le jour. La stabilisation de la protéine UROS par l'inhibition du protéasome ou par l'utilisation de molécule chaperonne et la réduction du substrat par phlébotomie, chélation du fer ou inhibition de l'ALAS2 semblent être les deux stratégies prometteuses d'un traitement plus « classique » de la PEC.

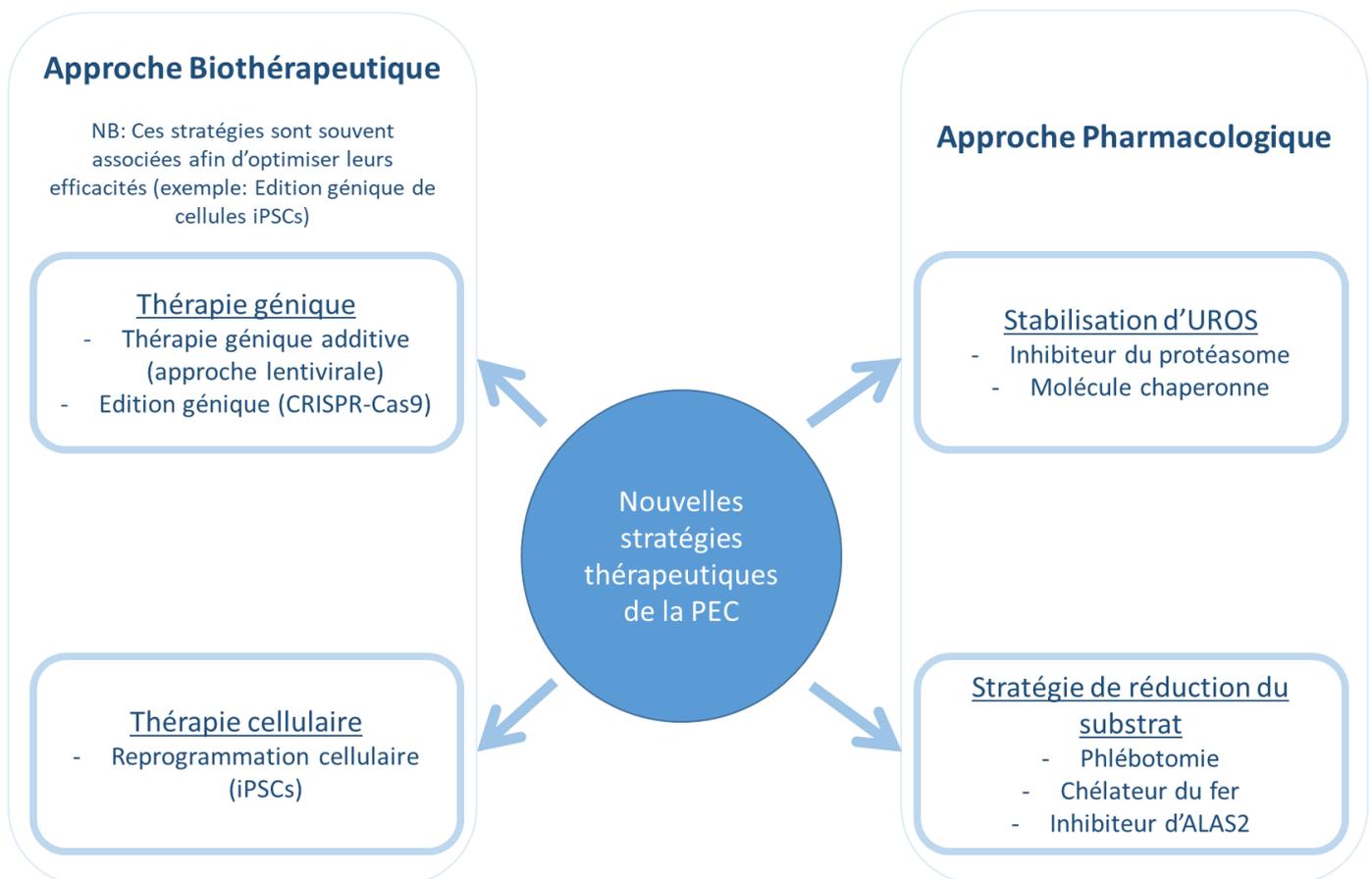


Figure 9 - Nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement de la PEC

# **Identification de nouvelles cibles thérapeutiques à l'aide du système CRISPR- Cas9**

### 3. Identification de nouvelles cibles thérapeutiques à l'aide du système CRISPR-Cas9

#### 3.1. Gènes modulateurs

La PEC se caractérise le plus souvent par la présence de mutations bialléliques sur le gène *UROS*, qui se traduisent par une activité particulièrement faible de l'enzyme. Cependant, en 2007, une mutation sur le gène *GATA-1*, situé sur le chromosome X, a été associée à une forme de PEC<sup>57</sup>. Le facteur de transcription *GATA-1* régule l'expression de nombreux gènes essentiels à la différenciation érythropoïétique, tels que *ALAS2*, *UROS*, et *GATA-1* lui-même. Chez un petit nombre de patients atteints de PEC, aucune mutation responsable de la PEC n'a pas été détectée dans les gènes *UROS* ou *GATA-1*, ce qui laisse supposer que d'autres gènes puissent jouer un rôle dans la maladie<sup>55</sup>.

Plus récemment, une mutation gain de fonction sur le gène *ALAS2* a été associée à une sévérité accrue de la maladie chez des patients PEC<sup>116</sup> (Fig. 10). De fait, une augmentation de l'activité de l'enzyme *ALAS2* mutée entraîne une production plus importante d'HMB, le substrat d'*UROS*. L'augmentation de l'apport en substrat, associée à une enzyme *UROS* défectueuse entraînerait une aggravation du phénotype de la PEC. La contribution de la mutation de gain de fonction sur le gène *ALAS2* au phénotype de la PEC souligne l'importance des gènes modificateurs associés à la PEC. Ces découvertes et les résultats actuels suggèrent l'existence d'autres gènes modificateurs actuellement non identifiés participant au phénotype de la PEC<sup>48</sup>.

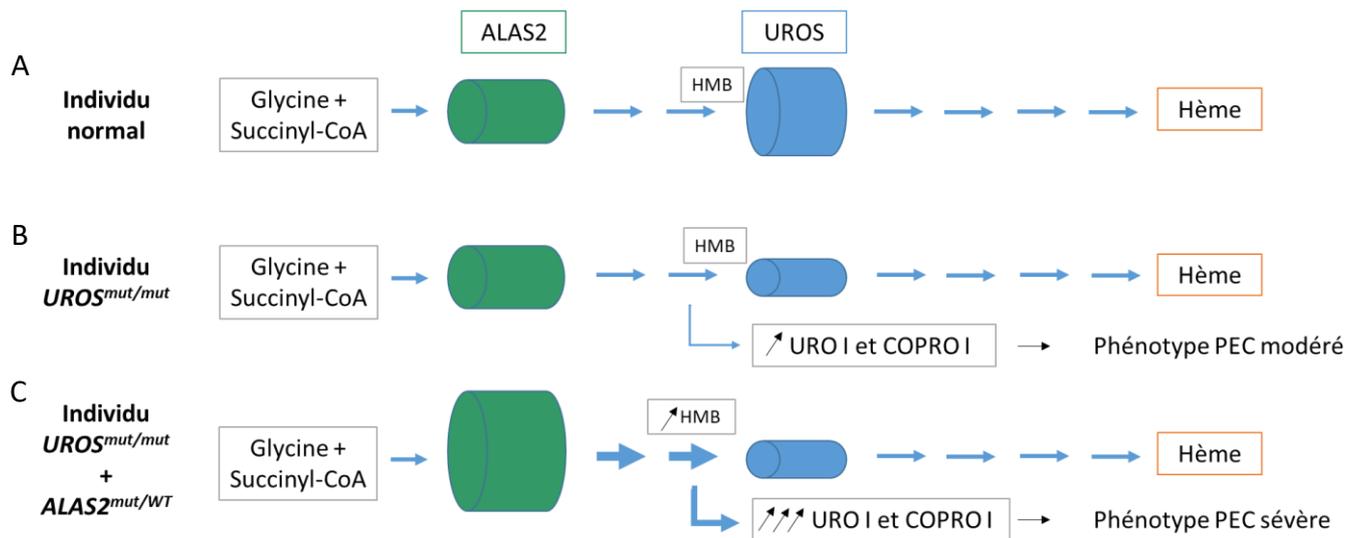


Figure 10 - Mécanisme supposé du rôle d'ALAS2 en tant que gène modificateur dans la PEC (Figure adaptée<sup>116</sup>)

Une activité accrue de l'enzyme ALAS2 mutée entraîne une production plus importante d'HMB, le substrat d'UROS. L'augmentation de l'apport en substrat, associé à une enzyme UROS déficiente entraînerait une aggravation du phénotype de la PEC. (A) individu normal ; (B) patient PEC ayant une enzyme ALAS2 WT ; (C) patient PEC avec mutation gain de fonction sur un des allèles du gène ALAS2.

Alors que des approches thérapeutiques prometteuses sont à l'étude, une meilleure compréhension de la physiopathologie sous-jacente de la PEC au niveau moléculaire et biochimique est nécessaire afin d'optimiser les modalités thérapeutiques actuelles et élaborer de nouveaux traitements. L'objectif du projet de stage de Master 2 était de réaliser un criblage génomique afin de mettre en évidence l'implication de nouveaux gènes modificateurs dans la PEC.

## 3.2. CRISPR-Cas9

### 3.2.1. Découverte de la technologie CRISPR-Cas9

Les toutes premières séquences CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) ont été découvertes il y a plus de trente ans dans le génome bactérien d'*Escherichia coli*<sup>131</sup>. Elles permettent à ces organismes de se protéger contre l'invasion d'acides nucléiques étrangers, comme ceux de virus ou phages<sup>132,133</sup> (Fig. 11). Les CRISPR correspondent à des segments de séquences d'ADN répétées palindromiques. Les bactéries possédant ces

séquences répondent à une invasion virale ou plasmidique par l'intégration de petits fragments d'ADN étrangers, les protospacers, entre deux séquences répétées CRISPR. Lors d'une seconde introduction de ces agents invasifs au sein de la bactérie, la transcription des fragments d'ADN exogènes insérés entre les séquences répétées endogènes conduit à la formation de CRISPR-ARN (crARN). Les crARNs sont composés d'un fragment « spacer » capable de s'hybrider avec les séquences virales ou plasmidiques à l'origine de la production des crARNs correspondants. La reconnaissance des séquences exogènes par les spacers entraîne leur clivage par une nucléase de la famille des protéines Cas (*CRISPR-associated protein*, fonctionnant en complexe avec les crARNs) et ainsi l'extinction de leur expression. De fait, les bactéries sont capables de stocker un fragment d'ADN exogène dans le locus CRISPR pour constituer un catalogue de fragments d'ADN des agressions génétiques passées, créant ainsi un système immunitaire acquis bactérien.

De multitudes systèmes CRISPR-Cas ont été découverts chez les bactéries et archées. Ils sont actuellement classés en deux classes, elles-mêmes subdivisées en plusieurs types et sous-types en fonction de sa ou ses endonucléase(s) Cas associée(s)<sup>134,135</sup>. De manière générale, les systèmes de classe 2 s'avèrent moins complexes à utiliser que ceux de la classe 1 et sont majoritairement utilisés en vue d'édition génique.

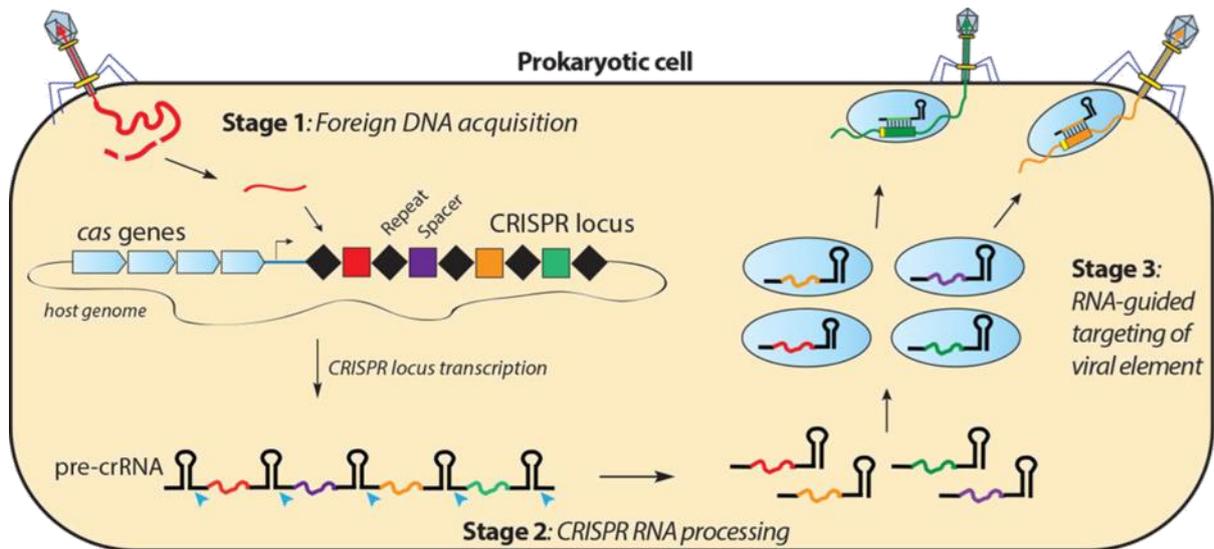


Figure 11 - Immunité adaptative bactérienne via le système CRISPR-Cas<sup>133</sup>

Le mécanisme de défense adaptatif bactérien utilisant le système CRISPR-Cas débute par le prélèvement par les nucléases Cas d'un fragment d'ADN invasif, appelé protospacer. Les protospacers vont être ensuite intégrés au locus CRISPR pour former un nouveau « spacer » au sein du génome bactérien entre deux séquences répétées (repeat). La deuxième étape consiste en la transcription du locus CRISPR en pré-crARN, lui-même mûri en crARN. Enfin, les crRNAs s'associent avec une ou plusieurs protéines Cas afin d'induire des lésions à l'ADN et/ou l'ARN invasif(s) au niveau de séquences complémentaires au spacer du crRNA (région colorée des crRNA).

La démonstration fonctionnelle de la technologie CRISPR-Cas9 en 2012, par Jennifer Doudna et Emmanuelle Charpentier a révolutionné le domaine de la recherche biomédicale<sup>88</sup>. Le système CRISPR-Cas a été propulsé dans le monde de l'édition génique, en étant utilisé pour modifier des cellules eucaryotes. L'étude a montré *in vitro* que l'association de la Cas9 avec une molécule d'ARN nommé crARN peut cliver spécifiquement l'ADN à un locus bien particulier. Ainsi, la cible à cliver dépend exclusivement de la séquence d'ARN qui est associée à l'endonucléase Cas9. Cette avancée révolutionnaire a valu aux deux chercheuses d'obtenir le prix Nobel de Chimie en octobre 2020<sup>136</sup>.

### 3.2.2. Mécanisme d'action du système CRISPR-Cas9

Ce système de nucléase ciblée adapté d'un mécanisme de défense bactérien contre les agents viraux et plasmidiques invasifs est aujourd'hui un outil servant à modifier le génome. Il s'agit d'un système simple, rapide et efficace permettant de couper l'ADN à un endroit précis dans n'importe quelle cellule. La technique est couramment qualifiée de « ciseaux moléculaires ».

Naturellement, le système CRISPR est composé d'une séquence guide, le crARN, spécifique d'une région d'ADN cible, complexée à une séquence trans-activatrice universelle (tracrARN). L'endonuclease Cas9 reconnaît et se lie à la séquence 5'-NGG-3' PAM (*Protospacer Adjacent Motif*). L'interaction CRISPR-Cas9 permet l'activation de l'endonuclease Cas9 et la coupure du double brin d'ADN en amont du motif PAM. Par la suite, le crARN a été combiné au tracrARN, formant une boucle en épingle à cheveux permettant de stabiliser le complexe appelé « ARN guide unique » (ARNg) (Fig. 12)

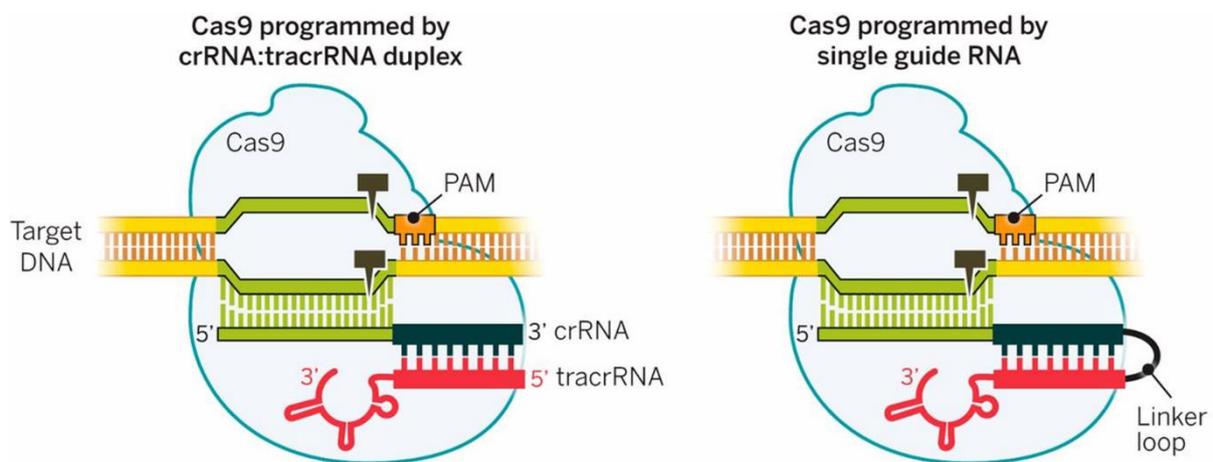


Figure 12 – Evolution du système CRISPR-Cas9<sup>87</sup>

Naturellement, la Cas9 est programmée par le duplex crARN:tracrARN. Par la suite, un ARN guide unique (ARNg) a été conçu en combinant le crARN au tracrARN, formant une boucle en épingle à cheveux permettant de stabiliser le complexe.

De manière physiologique, les cassures double brin surgissent constamment à cause de facteurs externes, des rayonnements ultraviolets ou des carcinogènes par exemple, ou internes comme lors du crossing-over au cours de la méiose. Les cellules ont généré des mécanismes de réparation de ces cassures<sup>137</sup>. Il y a principalement deux voies de réparation des cassures doubles brins dans l'ADN : une forme mineure, la recombinaison homologue (*homology directed repair* ou HDR) et une forme majeure de réparation, la jonction des extrémités non-homologues (*non homologous end-joining* ou NHEJ)<sup>138</sup> (Fig. 13). Dans le cas où une séquence d'ADN homologue aux régions de part et d'autre de la coupure est présente, elle est utilisée en tant que matrice pour la réparation homologue selon le mode HDR. Cette séquence d'ADN matrice peut être présente sous forme de plasmide double brin ou d'oligonucléotide simple brin. Contrairement à la recombinaison homologue, la NHEJ ne

requiert pas de matrice d'ADN complémentaire afin de corriger la cassure, elle raboute directement les deux extrémités cassées de l'ADN. Cette dernière réparation n'est pas systématiquement fidèle et peut générer des insertions ou délétions (*indels*) de quelques nucléotides pouvant entraîner un décalage du cadre de lecture de la séquence cible et donc l'extinction du gène (KO du gène).

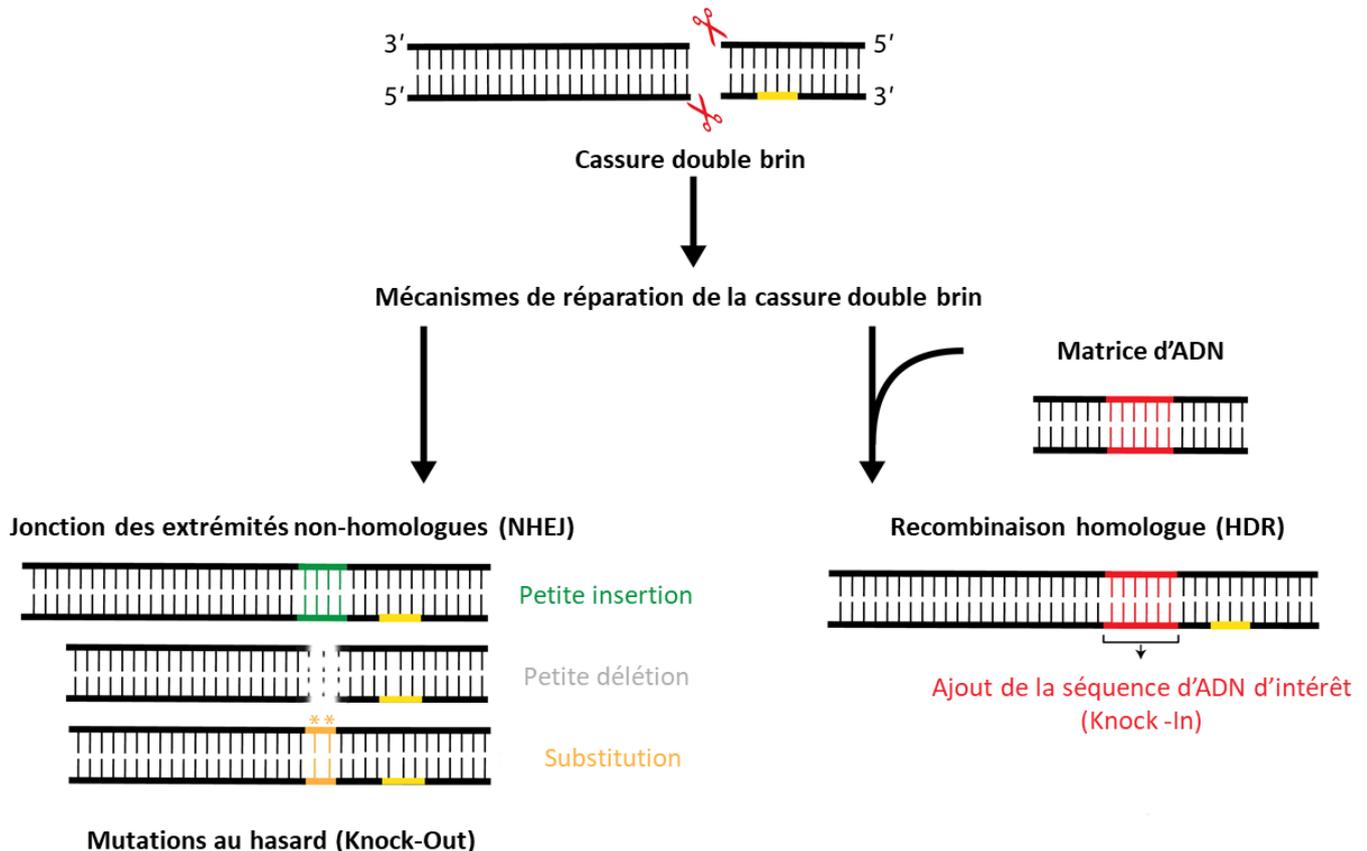


Figure 13 - Mécanismes de réparations des cassures doubles brins<sup>138</sup>

Les cassures double brin d'ADN sont réparées par deux mécanismes distincts. En l'absence de modèle de réparation, la voie NHEJ prédominante est activée et provoque des insertions et des délétions aléatoires, voire des substitutions au niveau du site de coupure, ce qui entraîne fréquemment la perturbation de la fonction des gènes (Knock-Out). En présence d'une matrice d'ADN souhaité, la voie de réparation HDR peut être initiée pour créer les mutations souhaitées grâce à la recombinaison homologue (Knock-In).

### 3.2.3. Applications cliniques et précliniques

Rapidement, de nombreuses équipes de recherche ont exploité les capacités de cette technologie pour produire des outils de manipulation génétique<sup>88,139</sup>. Pour cause, cette technologie permet de manipuler avec précision pratiquement toute séquence génomique

spécifique d'un ARNg. Aujourd'hui, CRISPR-Cas 9 est applicable aussi bien en recherche clinique que préclinique<sup>140</sup>. Au niveau thérapeutique, ce système constitue une stratégie potentielle pour l'édition génique de différentes pathologies. Plusieurs essais cliniques sont en cours pour le traitement de certaines maladies monogéniques telles que la dystrophie musculaire de Duchenne et l'hémophilie de type B ou très prochainement pour le traitement du syndrome de Hutchinson-Gilford (ou progéria)<sup>141</sup>. Le système CRISPR-Cas9 peut également être utilisé en immunothérapie afin d'améliorer les cellules CAR-T ou en virologie, afin de lutter contre le VIH.

En recherche fondamentale, CRISPR-Cas9 est devenu un outil essentiel pour beaucoup de chercheurs. Le système permet l'étude de la fonction d'un gène de façon ciblée, en reliant un génotype à un phénotype donné. Il permet également la modélisation de translocation et la création rapide et efficace de modèles animaux et cellulaires. En outre, cette technologie d'endonucléase programmable permet aux chercheurs d'examiner la fonction de plusieurs gènes à la fois en ciblant simultanément plusieurs loci génomiques dans une seule expérience. Ce type de criblage génomique accélère considérablement notre compréhension des processus pathologiques qui impliquent des ensembles de gènes ou de mutations, comme par exemple le développement de tumeurs. En utilisant des banques d'ARNg, les criblages génomiques peuvent être utilisés pour identifier des gènes cibles de médicaments, des gènes impliqués dans une maladie donnée ou encore des gènes de résistance à un traitement spécifique.

### 3.2.4. Criblage génomique par le système CRISPR-Cas9

#### 3.2.4.1. Principes

Les cribles, ou criblages génomiques avancés sont des outils puissants pour la découverte et la caractérisation fonctionnelle de caractères génétiques spécifiques associés à un phénotype d'intérêt. Classiquement utilisées auparavant, les approches génétiques inversées, basées sur des hypothèses, adoptent une approche "génotype-phénotype". Elles utilisent des connaissances préalablement acquises pour tester le rôle causal de certaines anomalies génétiques. À l'inverse, les criblages génétiques avancés sont des approches "phénotype à

génotype" qui consistent à modifier ou à moduler l'expression de nombreux gènes, à sélectionner les cellules ou organismes présentant un phénotype d'intérêt, puis à caractériser les mutations qui entraînent ces changements phénotypiques<sup>142</sup>.

Avant l'apparition du système CRISPR-Cas9, les criblages génomiques étaient réalisés avec des banques d'ARN interférant, notamment les *short hairpin* (sh)ARN. Les shARN diminuent l'expression d'un gène principalement en entraînant la dégradation des ARNm transcrits à partir de ce gène. L'utilisation des shARN ne permet pas d'obtenir un KO complet d'un gène contrairement à la technologies CRISPR-Cas9<sup>143</sup>.

Depuis plusieurs années, la technologie CRISPR-Cas9 a été adaptée dans le but de réaliser des criblages génomiques précis, en combinant la nucléase Cas9 avec des banques d'ARNg. L'efficacité et la simplicité de mise au point du système CRISPR-Cas9 offre la possibilité de réaliser un criblage relativement rapide et peu coûteux. À l'aide d'une librairie d'ARNg, l'endonucléase Cas9 peut inactiver un grand nombre de gènes différents<sup>144</sup> (Fig. 14). En effet, la Cas9 génère une cassure double brin, réparée la majorité du temps en l'absence de matrice par NHEJ. Des indels peuvent apparaître à la suite de cette réparation, entraînant un décalage du cadre de lecture et par conséquent le KO du gène ciblé par le guide. Le criblage génomique utilisant le système CRISPR-Cas9 consiste à transduire une population de cellules avec un ou des vecteur(s) codant pour la Cas9 et les ARNg de la banque choisie, de sorte à avoir un seul guide présent par cellule. Ainsi, chaque changement phénotypique observé sera directement lié au KO du gène ciblé par l'ARNg présent dans la cellule. De cette manière, une population cellulaire hétérogène avec un seul gène muté par cellule peut ainsi être produite afin d'investiguer des phénotypes particuliers. Selon le type de criblage réalisé, une pression de sélection (traitement, condition de culture particulière) peut être appliquée aux cellules. Ce type de criblage est par exemple beaucoup utilisé en cancérologie, afin d'identifier les gènes de résistance à certains traitements<sup>143</sup>.

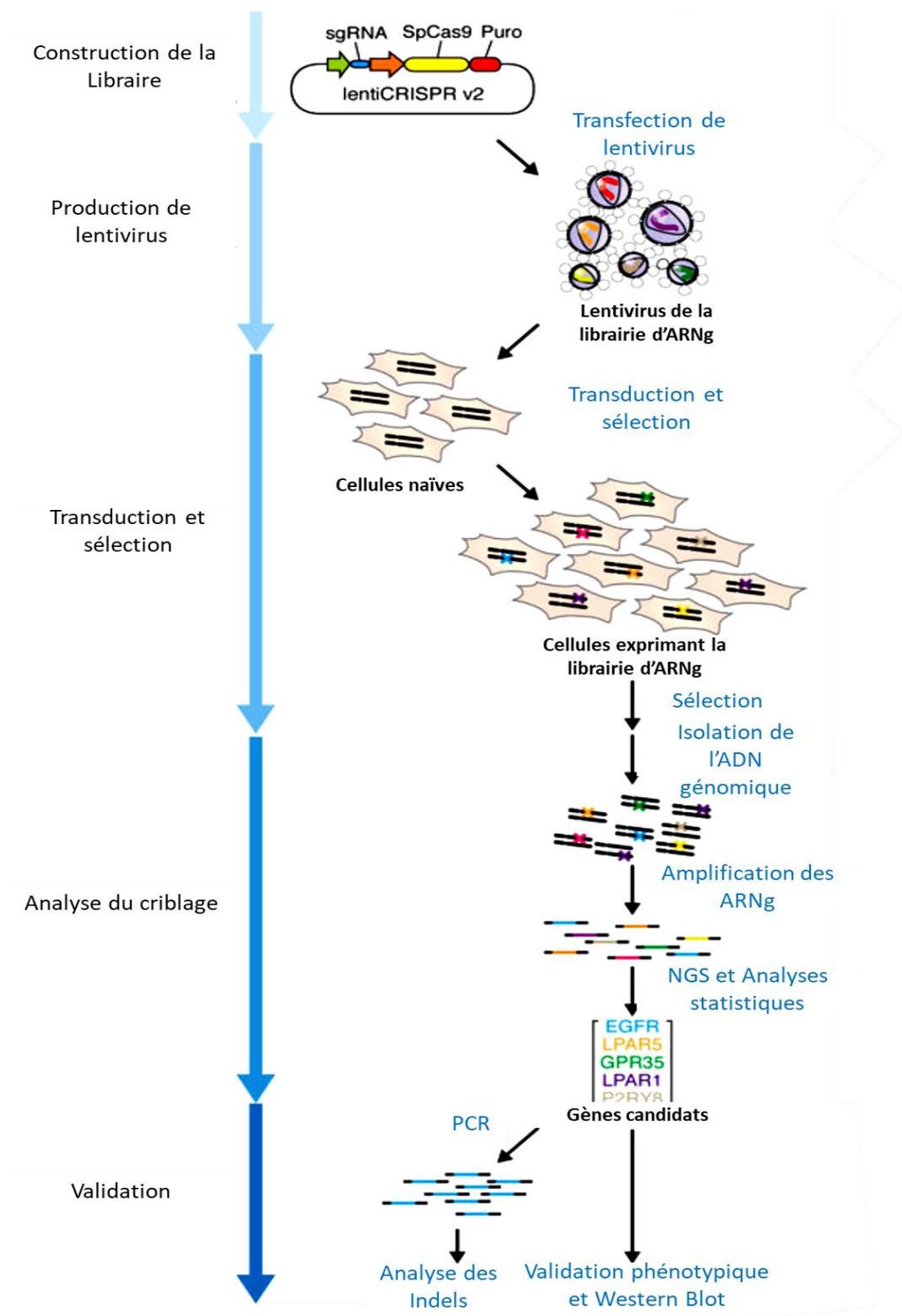


Figure 14 – Déroulement d'un criblage génomique par knock-out via le système CRISPR-Cas9 (Figure adaptée<sup>143</sup>)

La librairie est générée de sorte à ce que l'ensemble des ARNg ciblent tout le génome ou une catégorie de gènes. Les plasmides codant pour la Cas9 et les ARNg sont ensuite clonés dans des vecteurs lentiviraux. Les cellules sont transduites puis sélectionnées sur critère fonctionnel, par exemple à la suite d'une pression de sélection tel qu'un traitement ou une condition de culture particulière. Les régions d'ARNg (barres colorées) issues de l'ADN génomique des cellules sont amplifiées, puis analysées par un séquençage nouvelle génération (NGS) avant d'être analysées statistiquement afin d'identifier les gènes candidats.

#### 3.2.4.2. Choix de la librairie GeCKO

Les principales banques d'ARNg sont basées sur le knock-out des gènes. Néanmoins, il existe également d'autres types de banques pouvant agir de différentes manières sur les gènes ciblés. Par exemple, il est possible de réaliser un criblage à l'aide de banque basées sur l'activation de la transcription des gènes<sup>144</sup>.

Dans le cadre de mon projet de Master 2, nous avons choisi d'utiliser l'une des toutes premières banques CRISPR publiées : la banque GeCKO (*Genome-Scale CRISPR Knock-Out*)<sup>143</sup>. Cette banque a été élaborée en 2014 par le laboratoire de Feng Zhang au Massachusetts Institute of Technology (MIT). Avec la librairie GeCKO, 20 914 gènes et micro (mi)ARN sont ciblés par 121 413 ARNg. Chaque gène codant une protéine dans le génome est ciblé par 6 ARNg différents tandis que chaque miARN est ciblé par 4 guides. Les gènes et miARN sont ciblés par plusieurs ARNg différents, d'efficacité variable afin d'augmenter la robustesse des résultats du criblage. En effet, si tous les ARNg qui ciblent un même gène génèrent le même phénotype, le résultat est plus puissant que si seulement un ou deux guides le font. Cela permet de s'assurer que le phénotype observé n'est pas dû à un effet *off-target* (ou effet hors-cible, se produit lorsque la Cas9 ne coupe pas le gène pour lequel l'ARNg associé est spécifique) et que le phénotype observé ne provient pas du knock-out de plusieurs gènes.

Plusieurs librairies ont été générées depuis la création des banques CRISPR en 2014<sup>143,145</sup>. Toutes ces banques possèdent des caractéristiques différentes pouvant aussi bien cibler le génome entier pour l'analyse globale des gènes qu'un processus cellulaire spécifique (kinases, cycle cellulaire, nucléaires...). L'utilisation de la banque GeCKO pour effectuer le criblage génomique fonctionnel permettant d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la PEC, est un choix sûr et efficace. En criblant tout le génome humain, cette banque nous permettra d'avoir une vue d'ensemble des gènes impliqués dans la modulation de la voie de biosynthèse de l'hème.

#### 3.2.4.3. Transduction de cellules par la banque CRISPR

Les vecteurs lentiviraux sont couramment utilisés pour délivrer des ARNg des banques CRISPR. Ils ont pour avantages de pouvoir être facilement titrés afin de contrôler le nombre de copies de transgènes, ainsi que d'être des composés stables une fois intégrés dans le génome

permettant une bonne réplication cellulaire ultérieure. Dans la librairie GeCKO, il est possible de délivrer les gènes codant pour la Cas9, un ARNg et un marqueur de sélection par un système à un ou deux vecteur(s) (Fig . 15)<sup>146</sup>. Alors que le système à doubles vecteurs permet d'augmenter le titre viral et de générer des lignées cellulaires exprimant la Cas9 qui peuvent ensuite être utilisées pour le criblage à l'aide du lentiGuide-Puromycine, le vecteur unique peut être mieux adapté aux applications de criblage cellulaire *in vivo* ou primaire. Nous utiliserons le système à deux vecteurs possédant des marqueurs de sélection d'antibiotiques distincts afin de générer dans un premier temps des lignées cellulaires exprimant la Cas9 puis de réaliser le criblage dans un second temps.

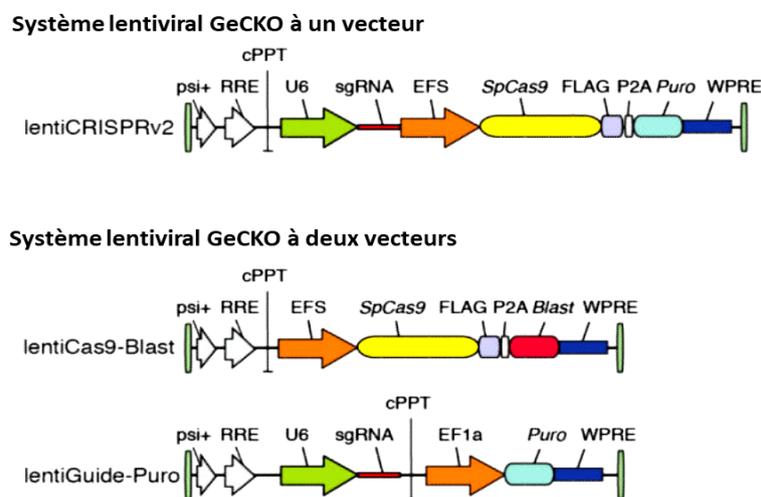


Figure 15 – Systèmes GeCKO à un vecteur (*lentiCRISPR v2*) ou deux vecteurs (*lentiCas9-Blast*, *lentiGuide-Puro*) d'expression (Figure adaptée<sup>145</sup>)

*psi+* : Signal d'encapsidation ; *RRE* : Élément de réponse ; *cPPT* : central polypurine track, séquence d'importation nucléaire ; *EFS*, *U6* et *EF1* : promoteurs ubiquitaires; *sgRNA*, *ARNg* ; *SpCas9* : *Cas9* de *Streptococcus pyogenes* ; *FLAG* : marqueur octapeptidique ; *P2A* : peptide 2A auto-clivant ; *Puro* : marqueur de sélection de la puromycine ; *Blast* : marqueur de sélection de la blasticidine ; *WPRE*, élément régulateur post-transcriptionnel;

#### 3.2.4.4. Analyse du Next Generation Sequencing

Le séquençage nouvelle génération ou NGS (*Next Generation Sequencing*) est utilisé pour comparer le nombre de copies de chaque ARNg de la condition expérimentale sélectionnée par rapport à une population contrôle afin d'identifier les gènes candidats<sup>147,148</sup>. Les ARNg séquencés au NGS sont obtenus par l'extraction de l'ADN génomiques des cellules d'intérêt. Après l'extraction de l'ADN, deux étapes de PCR doivent être réalisées : une première PCR

pour amplifier les ARNg puis une deuxième PCR afin de rajouter les adaptateurs nécessaires pour effectuer le séquençage. Durant le NGS, la zone séquencée correspond à la séquence lentivirale encadrant l'ARNg. Ce séquençage permet de définir le nombre de « lectures » de chaque ARNg, c'est-à-dire le nombre de fois où il a été lu au sein de chaque condition. Pour un ARNg donné, le nombre de « lectures » est ensuite comparé entre les différentes conditions, permettant de révéler alors son enrichissement ou son appauvrissement. Cette différence est utilisée comme valeur pour établir une liste de gènes. Les valeurs les plus négatives indiquent les ARNg appauvris tandis que les valeurs les plus élevées indiquent les ARNg enrichis dans la population cible. De fait, les gènes d'intérêts sont sélectionnés après comparaison des ARNg retrouvés différenciellement enrichis ou appauvris dans la condition d'intérêt par rapport à une population contrôle :

- Pour les gènes dont les ARNg sont retrouvés enrichis dans la population d'intérêt, cela signifie que leur extinction confère au modèle un avantage prolifératif ou encore une résistance dans le cas de l'utilisation d'agents thérapeutiques.
- Pour les gènes dont les ARNg sont retrouvés appauvris dans la population d'intérêt. Cela signifie qu'ils sont essentiels à la survie du modèle cellulaire et que leur extinction va permettre d'augmenter la sensibilité des cellules à la pression de sélection utilisée.

### 3.3. Criblage génomique fonctionnel dans le but d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la porphyrie érythropoïétique congénitale

L'objectif de mon stage de Master 2 était de réaliser un criblage génomique fonctionnel dans le but d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la porphyrie érythropoïétique congénitale et plus largement dans la voie de biosynthèse de l'hème. Dans la PEC, la principale caractéristique phénotypique des cellules est l'accumulation de porphyrines. Ces molécules sont des composés photoréactifs entraînant une fluorescence spécifique à une longueur d'onde d'émission de 620 nm. Cette caractéristique permet une relation génotype-phénotype simple à mettre en place puisque l'accumulation de porphyrines est un phénotype détectable par cytométrie en flux et sa survenue est directement dépendante à l'accumulation de porphyrines dans la voie de biosynthèse de l'hème.

Dans le cadre du projet, des modèles cellulaires sauvage (*wild-type* ou WT) et porphyrique vont être utilisés. Les cellules WT sont non-fluorescentes tandis que les cellules non-fonctionnelles pour UROS fluorescent en rouge. La modification de la fluorescence (positive ou négative) des cellules permettra de mettre en évidence des gènes susceptibles de modifier l'accumulation des porphyrines (Fig. 16). Ces gènes candidats devront être analysés et validés individuellement afin d'évaluer leur potentiel intérêt thérapeutique pour la PEC comme pour d'autres types de porphyries. De manière générale, ce criblage permettra d'avoir une vision exhaustive des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'hème.

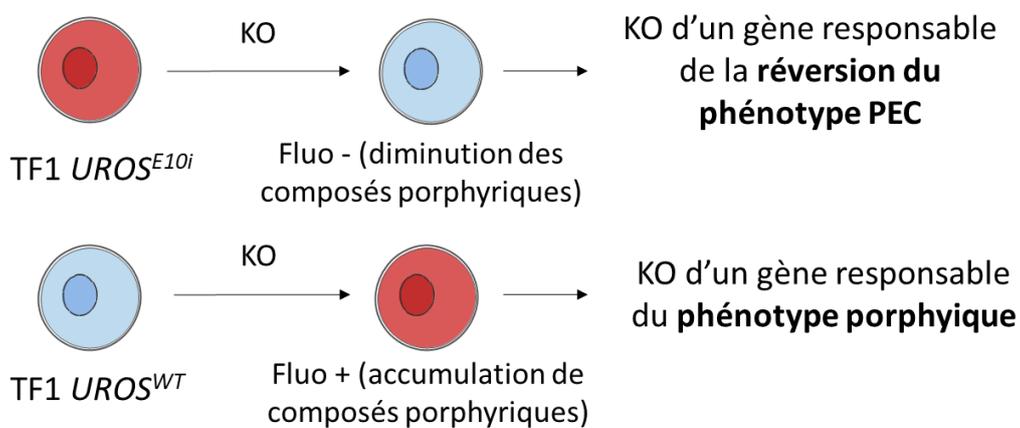


Figure 16 - Schéma de l'identification de gènes responsables de la réversion du phénotype PEC ou du phénotype porphyrique.

Le criblage génomique fonctionnel permet de lier directement un changement du phénotype cellulaire au KO du gène ciblé par l'ARNg. Ainsi, un gène responsable de la diminution de l'accumulation de porphyrines et donc de la réversion du phénotype de la PEC sera inactivé dans les cellules TF1 UROS<sup>E10i</sup> dont la fluorescence a diminué. De même, le KO d'un gène impliqué dans l'accumulation de porphyrines et donc responsable du phénotype porphyrique entrainera une augmentation de la fluorescence des cellules TF1 UROS<sup>WT</sup>.

Dans un premier temps, les cellules sont transduites par un lenti-Cas9 afin de créer une lignée exprimant constitutivement l'endonucléase (Fig. 17). Dans un deuxième temps, des particules lentivirales codant pour la librairie d'ARNg GeCKO sont produites en conservant la représentativité de la banque. Les cellules exprimant la Cas9 sont transduites à une MOI faible par les lenti-ARNg, de manière à avoir un seul guide présent par cellule. Ainsi, un changement du phénotype cellulaire sera directement lié au KO du gène ciblé par ce guide.

Deux criblages sont nécessaires pour avoir une vision exhaustive des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'hème et identifier des cibles thérapeutiques potentielles de la PEC.

Le premier criblage s'effectuera sur les cellules porphyriques fluorescentes afin de sélectionner les cellules dont la fluorescence a diminué après la transduction de la banque. Le deuxième s'effectuera sur les cellules WT afin de sélectionner les cellules devenues fluorescentes. Les cellules seront triées en fonction de leur fluorescence avant d'être analysées par NGS. Les gènes impliqués dans la diminution de l'accumulation des porphyrines dans le modèle cellulaire PEC et les gènes entraînant l'accumulation de porphyrines dans cellules WT seront ensuite validés individuellement. La situation sanitaire actuelle ne m'a pas permis de mener à terme ce projet et seules les conditions expérimentales ont pu être définies.

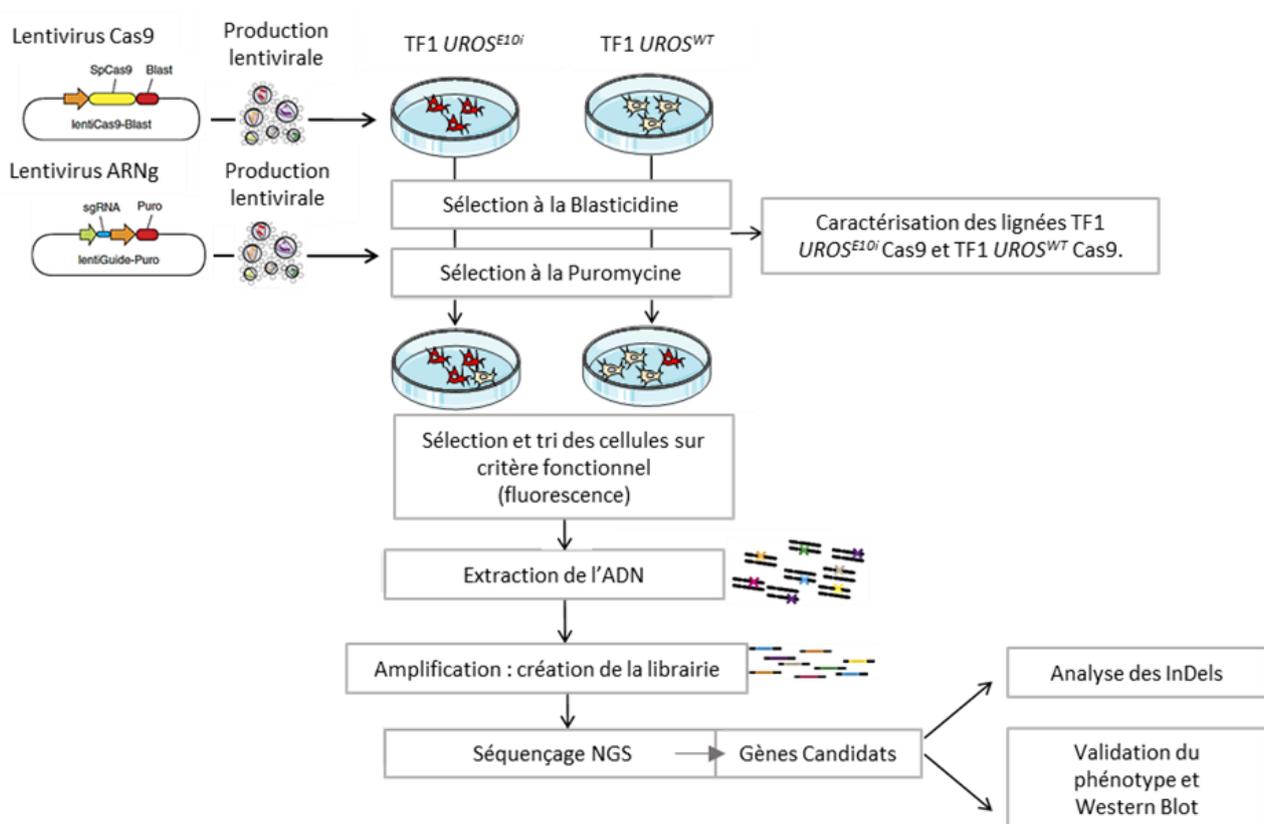


Figure 17 - Stratégie de criblage génomique afin d'identifier des gènes impliqués dans la modulation de la voie de biosynthèse de l'hème (Figure adaptée<sup>143</sup>)

Production de particules lentivirales codant pour la Cas9 et pour les ARNg de la librairie GeCKO. Transduction des cellules TF1 UROS<sup>WT</sup> et TF1 UROS<sup>E10i</sup> avec les lentivirus Cas9 puis avec les lentivirus codant pour la librairie GeCKO. Une pression de sélection est réalisée après chaque transduction avec un antibiotique adapté (Blasticidine puis Puromycine). Les lignées TF1 UROS<sup>WT</sup> Cas9 et TF1 UROS<sup>E10i</sup> Cas9 sont caractérisées et validées fonctionnellement. Les cellules sont triées et sélectionnées en fonction de leur fluorescence. L'ADN de ces cellules sera isolé et amplifié avant de réaliser un séquençage NGS afin d'identifier les gènes candidats. Les gènes candidats seront ensuite validés individuellement.

### 3.3.1. Matériel et Méthodes

#### 3.3.1.1. Lignées cellulaires

La lignée cellulaire TF1 (Sigma-Aldrich), dérive de cellules érythroïdes humaines non adhérentes. Des cellules sauvages TF1 UROS<sup>WT</sup> et des cellules porphyriques TF1 UROS<sup>E10i</sup> seront utilisées pour ce projet. La lignée TF1 UROS<sup>E10i</sup> est un modèle cellulaire de la PEC qui a été développé au sein du laboratoire à partir du système CRISPR-Cas9<sup>121</sup>. Les cellules présentent une insertion d'un ou plusieurs nucléotides sur l'exon 10 du gène UROS, se traduisant par une perte de l'activité enzymatique entraînant une accumulation massive de porphyrines de type I les rendant spontanément fluorescentes (Fig. 18).

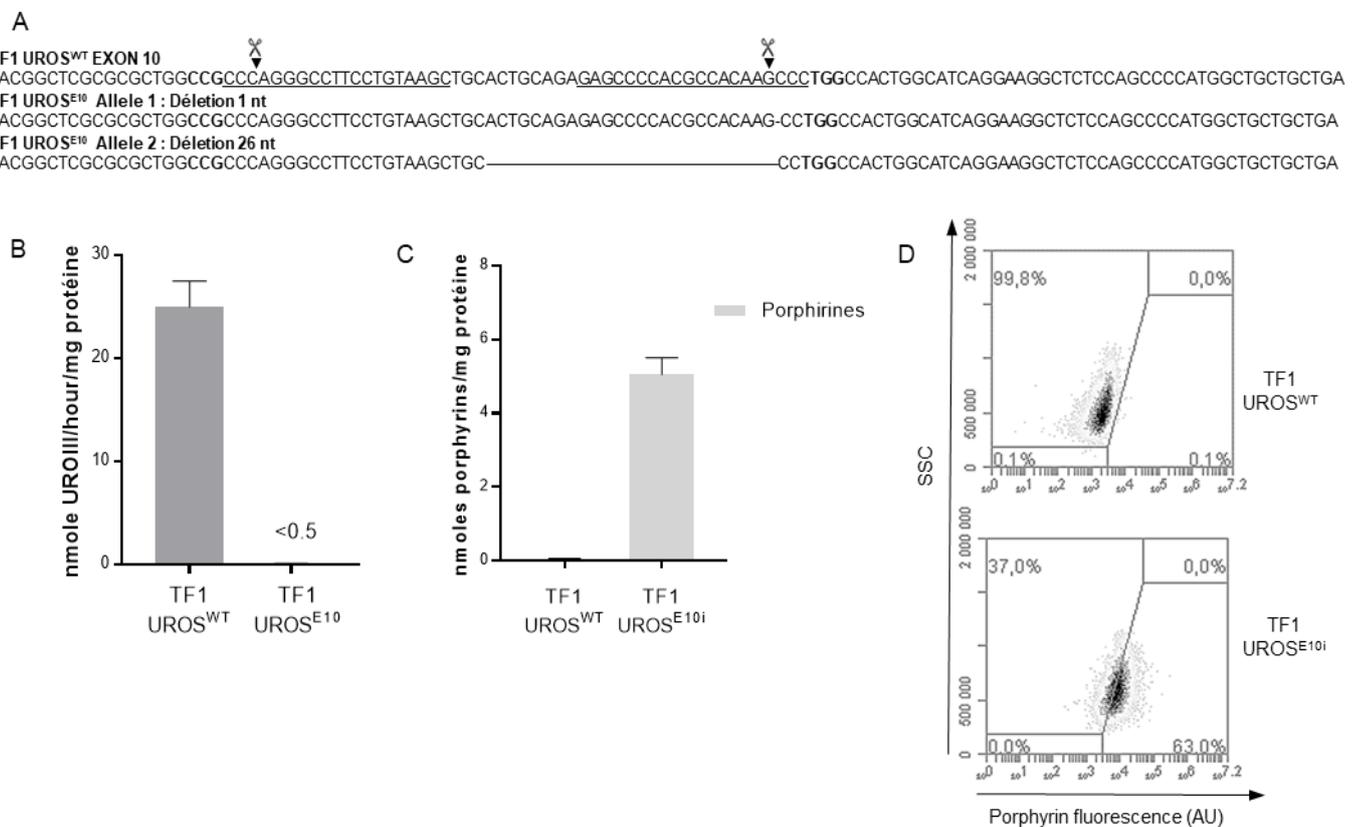


Figure 18 – Caractérisation des lignées cellulaires TF1 UROS<sup>WT</sup> et UROS<sup>E10i</sup>

(A) Génotypage d'un fragment de l'exon 10 du gène UROS. Exon10 UROS<sup>WT</sup> : représentation des deux ARNs (séquences soulignées), de leurs PAMs respectifs (en gras) et des deux sites de coupures (ciseaux). Exon UROS<sup>E10i</sup> présentant une délétion d'un nucléotide (nt) sur l'allèle 1 et de 26 nt sur l'allèle 2. (B) Perte de l'activité enzymatique UROS dans les cellules TF1 UROS<sup>E10i</sup>. (C) L'accumulation spontanée de porphyrines dans les cellules TF1 UROS<sup>E10i</sup> est observable en cytométrie de flux(D).

Les cellules **TF1** sont cultivées dans du milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) [glutamine], [glucose] 4,5 g/L, [HEPES] 2,383g/L, [Bicarbonate de sodium] 1,5 g/L, [sodium pyruvate] 110mg/L, supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (Eurobio®) (SVF), 100 U/mL de pénicilline/streptomycine (P/S) et 2ng/μL de facteur de croissance GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*).

Après transduction par les particules lentivirales codant pour la Cas9, les cellules seront sélectionnées dans un milieu contenant 5μg/mL de Blastidicine. Lors de la sélection des cellules ayant été transduites par les lentivirus ARNg, le milieu de sélection contient de la Puromycine à une concentration de 5μg/mL.

### 3.3.1.2. Librairie GeCKO

Comme décrit précédemment, la librairie GeCKO v2 générée par le laboratoire de Feng Zhang contient 121 413 ARNg qui ciblent 19 050 gènes et 1 864 micro (mi)ARN<sup>146</sup>. Elle est divisée en 2 sous-librairies (contenant chacune 3 ARNg) ciblant la totalité des gènes du génome, ainsi que 1000 ARNg non ciblés servant de contrôles. Chaque gène est donc ciblé par 6 ARNg différents pour augmenter la robustesse des résultats du criblage et chaque miARN est ciblé par 4 ARNg. Les séquences des guides (#1000000049, Addgene) sont fournies par la plateforme CRISPR'édit après leur amplification suivant le protocole décrit par le laboratoire de Zang<sup>139,149</sup>.

### 3.3.1.3. Production de particules lentivirales et transduction

#### Production des particules lentivirales

La production des particules lentivirales est réalisée par un système à 3 plasmides :

- Le plasmide lentiviral portant l'insert d'intérêt : Cas9, eGFP, ARNg-eGFP ou ARNg.
- Un plasmide pVSV-G portant le gène *env* codant pour les protéines d'enveloppe du lentivirus.
- Un plasmide PAX2 portant les gène *gag* et *pol* codant pour les protéines de structure du lentivirus.

Les particules lentivirales sont obtenues par trans-complémentation après transfection transitoire des 3 plasmides (8 µl de vecteur PAX2 à 1 µg/µl + 4 µl de vecteur VSV-G à 1 µg/µl + 10 µl du vecteur contenant l'insert d'intérêt à 1 µg/µl) dans des cellules HEK 293T. La solution de plasmide contient en plus 500 µl de HBS 2X et 50 µl de CaCl<sub>2</sub> à 2,5 M. Le précipité qui se forme entre l'ADN et le phosphate de calcium permet l'entrée des plasmides dans les cellules. Le mélange de plasmides est ajouté dans une boîte de culture contenant 10.10<sup>6</sup> cellules HEK et 10 ml de milieu DMEM. 6 h après la transfection le milieu est éliminé et 8 ml de milieu contenant de l'HEPES à 20 mM est ajouté afin d'éviter la dénaturation des virus. Au bout de 2 jours, le milieu est récupéré dans un tube qui est centrifugé à 2 000 g pendant 10 minutes. Le surnageant (contenant les particules lentivirales) est filtré dans un tube centricon puis centrifugé à 4000 g pendant 10 minutes. Le surnageant au-dessus du filtre (portion concentrée en particules lentivirales) est récupéré et plusieurs aliquots de 50 µl sont réalisés et stockés à -80°C pour réaliser les transductions.

Le titre moléculaire, c'est-à-dire le nombre de particules lentivirales par millilitre est déterminé en quantifiant par qPCR la séquence RRE (séquence du virus intégré dans le génome de la cellule) sur de l'ADN de cellules TF1 transduites avec des quantités croissantes des virus produits. Le titre infectieux est obtenu en transduisant 50 000 cellules TF1 dans 500µL de milieu avec des volumes de particules lentivirales eGFP allant de 2,5µL à 80µL d'une dilution au 1/50 de la solution mère. Le nombre de cellules fluorescentes exprimant la GFP est observé au cytomètre Accuri C6. Une corrélation entre volume de particules et le nombre de cellules fluorescentes est faite afin d'obtenir le titre infectieux de la solution de particules lentivirales. Ce titre sera corrélé avec le titre moléculaire pour déterminer le volume de solution virale à utiliser pour transduire à une MOI voulue.

### Transduction cellulaire

Pour obtenir l'expression constitutive de la nucléase Cas9, 25 000 cellules TF1 UROS<sup>WT</sup> et TF1 UROS<sup>E10i</sup> sont transduites avec les lentivirus Cas9 dans 500µL de milieu à une multiplicité d'infection (MOI) de 2. Pour réaliser la validation fonctionnelle de la Cas9, 25 000 cellules TF1 UROS<sup>WT</sup> Cas9 et TF1 UROS<sup>E10i</sup> Cas9 sont transduites avec des lentivirus eGFP dans 200µL de milieu à une MOI de 10. 4 jours après, 12 500 cellules sont transduites avec des lentivirus ARNg-eGFP à une MOI de 20 dans 200µL de milieu.

Afin de définir les conditions expérimentales optimales pour observer et trier les cellules présentant une modification de leur fluorescence,  $5.10^6$  de cellules TF1 *UROS*<sup>WT</sup> Cas9 et TF1 *UROS*<sup>E10i</sup> Cas9 sont transduites avec des particules lentivirales codant pour la librairie GeCKO dans 5ml de milieu à des MOI de 0,1 et 1. Pour réaliser notre criblage génomique d'intérêt, les cellules TF1 *UROS*<sup>WT</sup> Cas9 et TF1 *UROS*<sup>E10i</sup> Cas9 devront être transduites avec les lentivirus de la librairie GeCKO. Afin de garder une représentativité de la banque de 300X, c'est-à-dire pour qu'un seul et même guide soit présent dans 300 cellules différentes, environ  $360.10^6$  cellules devront être transduites à MOI faible.

#### 3.3.1.4. RT-PCR

L'expression de la Cas9 dans les cellules transduites avec les lenti Cas9 puis sélectionnées avec la blasticidine a été vérifiée par une réaction de transcription inverse puis de polymérisation en chaîne (RT-PCR). L'ARN cellulaire total est extrait à l'aide du kit NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel®) et dosé par spectrophotométrie d'absorption UV (NanoDrop 2000, Thermo Scientific®). 1µg d'ARN est rétrotranscrit (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®)) en ADNc. Les ADNc sont amplifiés par PCR en ajoutant à chaque réaction 12,5 µL de GoTaq qPCR Master Mix 2X (Promega) à 1X final, 0,5 µL d'amorce sens (F) à 10µM, 0,5 µL d'amorce anti-sens (R) 10µM, 5 µL d'ADNc et 6,5 µL d'eau (H<sub>2</sub>O) stérile pour un volume de réaction final de 25 µL (Tableau 2). Les produits PCR ont été analysés en point final sur gel d'agarose 1,5% après avoir été amplifiés.

Amorces PCR	Séquence amorces 5' – 3'	Taille fragment (bp)
<i>Cas9-F</i>	TGAGCGACATCCTGAGAGTG	236
<i>Cas9-R</i>	CAGGATGGGCTTGATGAACT	
<i>HumanP0-F</i>	TGGAGGGTGTCCGCAATGTT	158
<i>HumanP0-R</i>	GAAGGCCTTGACCTTTTCAG	

Tableau 2 - Amorces utilisées pour amplifier les ADNc Cas9 et Humman-P0 par PCR.

### 3.3.1.5. Détection de la Cas9 par Western Blot

Les culots cellulaires isolées après sélection avec la blasticidine des cellules transduites avec le lentivirus Cas9 sont lysés en présence des tampons TBEN (Tris Base 10mM ; EDTA 3mM ; NaCl 150mM ; H<sub>2</sub>O) et SB2X (SDS 10% ; Glycérol 100% ; Tris-Cl 0,5mM pH 6,8) et incubées 10min à 100°C. La concentration en protéines est déterminée avec le kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific). 30µg de protéines sont séparés par électrophorèse sur des gels SDS-PAGE à 8% pour la Cas9 (158 kDa) et 12% d'acrylamide pour la GAPDH (36 kDa) puis sont transférées sur une membrane en polyfluorure de vinylidène. La membrane est bloquée avec du TBS (Tris 0,5M ; NaCl 1,5M) contenant 5% de lait et incubée toute la nuit à 4°C en présence d'un anticorps primaire anti-Cas9 ou anti-GAPDH dilué dans du TBS contenant 5% d'albumine de sérum de bœuf. Le lendemain la membrane est lavée 3 fois 5minutes avec du TTBS (Tris 0,5M ; NaCl 1,5M ; Tween 20 0,1%) et incubée pendant 1h à température ambiante avec un anticorps secondaire adapté conjugué à une peroxydase diluée dans du TBS+ 5% lait. La membrane est lavée 3 fois 5 minutes avec du TTBS. La révélation est réalisée avec le kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare). L'image est ensuite capturée avec un bioimageur et l'analyse densitométrique est réalisé avec le logiciel ImageJ.

### 3.3.1.6. Cytométrie en flux pour l'analyse de la fluorescence des cellules GFP+

Dans le but de vérifier la fonctionnalité de la Cas9, les cellules TF1 *UROS*<sup>WT</sup> Cas9 et TF1 *UROS*<sup>E10i</sup> Cas9 transduites avec un lenti-eGFP et un lentivirus ARNg-anti-GFP sont analysées en cytométrie de flux sur le Accuri C6 (BD Biosciences). Après excitation à 488nm, le pourcentage de cellules fluorescentes exprimant la eGFP est analysé par le logiciel associé.

Pour réaliser le criblage, la fluorescence des porphyrines dans les cellules TF1 *UROS*<sup>WT</sup> Cas9 et TF1 *UROS*<sup>E10i</sup> Cas9 transduites avec la librairie GeCKO est analysée au cytomètre BD™ LSRFortessa avec le logiciel FACSDiva 8.0.1 (BD Biosciences). Les cellules sont excitées à une intensité de 408nm et la fluorescence des porphyrines est détectée par un filtre Pe-Cy5-A.

### 3.3.2. Résultats et discussion

#### 3.3.2.1. Création de lignées cellulaires exprimant la Cas9

##### Expression de la nucléase Cas9

Les cellules TF1 *UROS*<sup>WT</sup> et les cellules TF1 *UROS*<sup>E10i</sup> ont été transduites à une MOI de 2 avec le lentivirus Cas9. Les cellules transduites ont été sélectionnées avec la blasticidine. Nous nous sommes tout d'abord attachés à vérifier l'expression et la fonctionnalité de la nucléase dans ces cellules. Afin de valider l'expression du gène codant pour la protéine Cas9, une RT-PCR a été réalisée (Fig. 18. A). L'ARNm Cas9 est effectivement présent dans les cellules TF1 *UROS*<sup>WT</sup> Cas9 et TF1 *UROS*<sup>E10i</sup> Cas9 tandis qu'il n'est pas détecté dans les cellules non transduites TF1 *UROS*<sup>WT</sup>. En revanche, on retrouve une faible expression du gène Cas9 dans les cellules TF1 *UROS*<sup>E10i</sup> non transduites. Cette faible expression s'explique par la méthodologie employée pour générer ce modèle cellulaire porphyrique. Les cellules TF1 *UROS*<sup>WT</sup> ont été transfectées avec un système de deux plasmides, un plasmide exprimant l'ARNg ciblant l'exon 10 du gène *UROS* et un plasmide exprimant la nucléase Cas 9, et un gène de résistance à la puromycine utilisé pour sélectionner les cellules transfectées avant le sous-clonage des cellules. Il est donc probable qu'une copie du plasmide se soit insérée dans le génome du clone cellulaire sélectionné aboutissant à une expression résiduelle de la Cas9.

Sur l'analyse par Western Blot nous retrouvons l'expression de la Cas9 uniquement dans les cellules TF1 *UROS*<sup>WT</sup> Cas9 et TF1 *UROS*<sup>E10i</sup> Cas9. L'expression résiduelle de la nucléase dans les cellules TF1 *UROS*<sup>E10i</sup> n'est plus visible certainement par un manque de sensibilité du WB par rapport à la RT-PCR (Fig. 19. B).

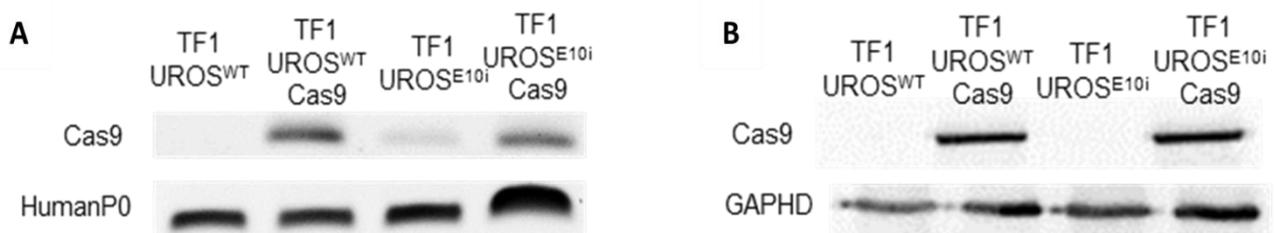


Figure 19 - Validation de l'expression de la nucléase Cas9 par RT-PCR et Western Blot

(A) RT-PCR des cellules TF1 *UROS*<sup>WT</sup> et TF1 *UROS*<sup>E10i</sup> transduites ou non par un lenti-Cas9. Analyse de l'expression de l'ADNc Cas9 avec le gène HumanP0 en contrôle. (B) Western-Blot des cellules TF1 *UROS*<sup>WT</sup> et TF1 *UROS*<sup>E10i</sup> transduites ou non par un lenti-Cas9 avec analyse de l'expression de la Cas9 (158 kDa) et de la GAPDH (36 kDa) en contrôle.

## Validation fonctionnelle de la Cas9

Afin de valider l'activité de la nucléase Cas9, les cellules TF1 *UROS<sup>WT</sup>*, TF1 *UROS<sup>WT</sup> Cas9*, TF1 *UROS<sup>E10i</sup>* et TF1 *UROS<sup>E10i</sup> Cas9* ont été transduites avec un lentivirus-eGFP, puis 4 jours plus tard avec un lentivirus-ARNg-eGFP. En se combinant avec l'ARNg-eGFP la nucléase devrait cliver le gène de la eGFP et éteindre au moins partiellement son expression. Nous avons donc suivi l'expression de la protéine eGFP à intervalles réguliers en cytométrie de flux (Fig. 20). 22 jours après la transduction avec le lentivirus-ARNg-eGFP le nombre de cellules fluorescentes a fortement diminué dans les cellules TF1 *UROS<sup>WT</sup> Cas9* (diminution de 92% à 26%) et TF1 *UROS<sup>E10i</sup> Cas9* (diminution de 92% à 24%). En revanche, aucune diminution significative n'est observée dans les lignées TF1 *UROS<sup>WT</sup>* et TF1 *UROS<sup>E10i</sup>* n'ayant pas été transduites par le lentivirus-Cas9. La nucléase Cas9 est donc bien exprimée et fonctionnelle dans nos deux modèles cellulaires d'intérêt.

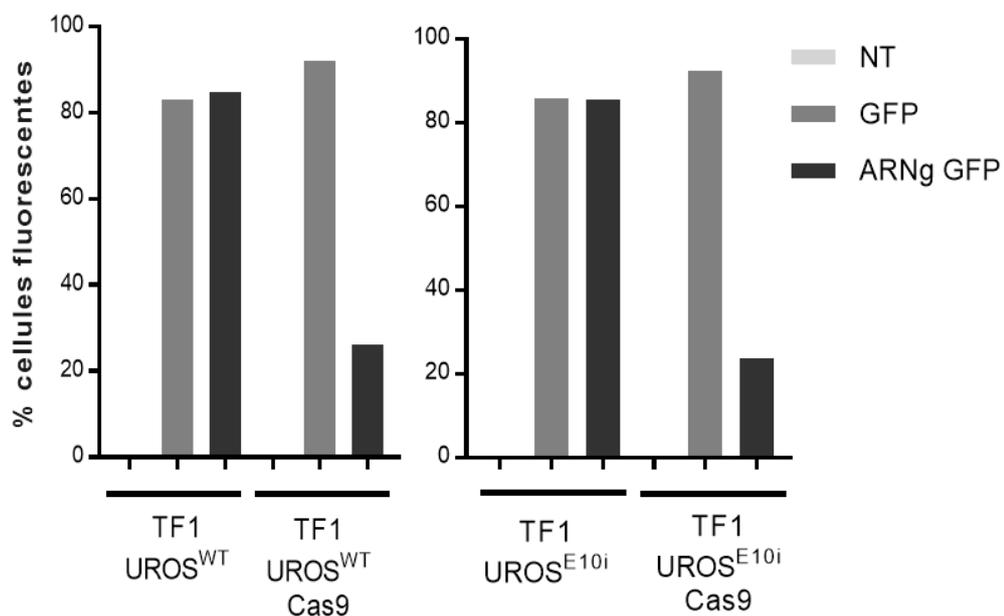


Figure 20 – Analyse cytométrique des cellules TF1 *UROS<sup>WT</sup>*, TF1 *UROS<sup>WT</sup> Cas9*, TF1 *UROS<sup>E10i</sup>* et TF1 *UROS<sup>E10i</sup> Cas9* transduites avec un lentivirus-eGFP puis avec un lentivirus-ARNg-eGFP.

Analyse par cytométrie en flux du pourcentage de cellules fluorescentes TF1 *UROS<sup>WT</sup>*, TF1 *UROS<sup>WT</sup> Cas9*, TF1 *UROS<sup>E10i</sup>* et TF1 *UROS<sup>E10i</sup> Cas9*, non transduites, transduites avec un lentivirus eGFP seul et transduites avec un lentivirus eGFP puis un lentivirus ARNg-GFP.

### 3.3.2.2. Transduction de la librairie GeCKO et tri cellulaire (FACS)

Nous avons souhaité effectuer une expérience préliminaire afin de définir les conditions expérimentales optimales tant au niveau de la cytométrie que de la cinétique d'apparition et de disparition des porphyrines après la transduction des cellules TF1 Cas9 et TF1 *UROS*<sup>E10i</sup> Cas9 avec la banque GeCKO. Tout d'abord, nous avons choisi de réaliser le criblage des cellules TF1 *UROS*<sup>E10i</sup> Cas9 par la librairie GeCKO avant de réaliser celui des cellules TF1 *UROS*<sup>WT</sup> Cas9. Ainsi, les cellules TF1 *UROS*<sup>WT</sup>, TF1 *UROS*<sup>E10i</sup> et TF1 *UROS*<sup>E10i</sup> Cas9 transduites à MOI de 0,1 et 1 avec la banque GeCKO ont été analysées en cytométrie. Les conditions choisies permettent de trier aux mieux les cellules en fonction de leur fluorescence. Nous n'observons pas de vallée entre les cellules normales *UROS*<sup>WT</sup> et les cellules *UROS*<sup>E10i</sup> fluorescentes (Fig. 21). Cette absence de vallée ne nous permet pas de trier parfaitement les cellules *UROS*<sup>E10i</sup> Cas9 présentant une diminution de la fluorescence des porphyrines après avoir été transduites par les ANRg de la banque. Les fenêtres représentant les cellules accumulant ou non des porphyrines ont été choisies arbitrairement et sont séparées d'un demi-logarithme afin de garantir un tri cellulaire optimal. Il sera possible de comparer la population de cellules n'accumulant pas ou peu de porphyrines par rapport à la population totale des cellules TF1 *UROS*<sup>E10i</sup> transduites dans les mêmes conditions et isolées en amont du tri cellulaire.

En revanche, un tri cellulaire plus précis semble être réalisable sur les cellules TF1 *UROS*<sup>WT</sup> non fluorescentes car l'accumulation des porphyrines devrait permettre d'établir un seuil de fluorescence de façon plus spécifique. Malheureusement, en raison de la crise sanitaire actuelle, nous n'avons pas eu le temps d'effectuer cette partie du projet.

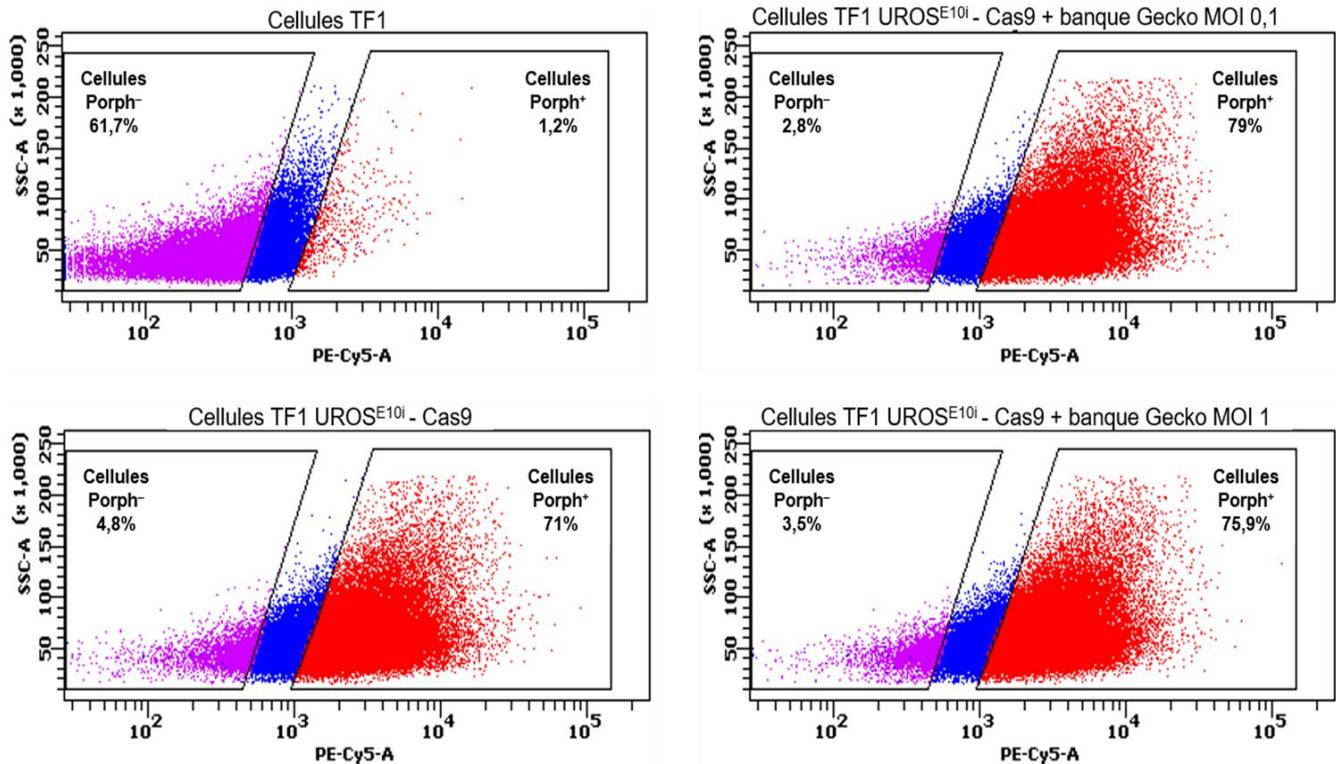


Figure 21 - Analyse cytométrique des cellules TF1 UROSE10i Cas9 transduites avec la banque Gecko à des MOI de 0.1 et 1

La fluorescence des porphyrines des cellules TF1, TF1 UROSE10i Cas9 transduites avec la banque Gecko à MOI 0.1 et TF1 UROSE10i Cas9 transduites avec la banque Gecko à MOI 1 a été analysée et a servi de critère de sélection des populations cellulaires accumulant ou non des porphyrines et nommées cellules Porph<sup>-</sup> et cellules Porph<sup>+</sup>.

### 3.3.2.3. Discussion et résultats attendus

Dans le but de réaliser un criblage génomique fonctionnel à l'aide du système CRISPR-Cas9, des lignées cellulaires TF1 *UROSWT* et TF1 *UROSE10i* exprimant la Cas9 ont été créées et caractérisées. Après transductions de ces deux lignées par des particules lentivirales Cas9, l'expression de la Cas9 a été vérifiée par RT-PCR et Western Blot. La réalisation d'un test de clivage de la protéine fluorescente eGFP a permis de valider l'activité de la Cas9 dans ces lignées. Les lignées TF1 *UROSWT* Cas9 et TF1 *UROSE10i* Cas9 sont donc fonctionnelles et peuvent être utilisées pour réaliser le criblage génomique.

En amont du criblage génomique, il est essentiel de définir les conditions expérimentales du tri cellulaire. Le laser optimal, la longueur d'onde d'excitation et le seuil de fluorescence

négatif ont pu être définis à l'aide des cellules TF1 *UROS*<sup>WT</sup>, TF1 *UROS*<sup>E10i</sup> et TF1 *UROS*<sup>E10i</sup> Cas9 transduites avec la librairie GeCKO à une MOI de 0,1 et 1. Le tri cellulaire se fera à une longueur d'onde d'excitation de 408nm et à l'aide du filtre PE-Cy5-A. Aucune vallée ne sépare les populations cellulaires accumulant ou non des porphyrines. Les fenêtres de tri ont dû être établies arbitrairement afin de représenter au mieux ces populations.

Au cours du criblage, chaque gène sera ciblé par 6 ARNg différents et chaque ARNg spécifique sera représenté environ 300 fois afin de garder une bonne représentativité de la banque d'ARNg (Fig. 22). Les cellules TF1 *UROS*<sup>E10i</sup> Cas9 transduites avec la librairie GeCKO à une MOI faible n'accumulent pas de porphyrines (Fig. 20. Cellules Porph-) seront triées et analysées par NGS. Le séquençage NGS sera réalisé par la plateforme CRISP'édit citée précédemment. La proportion de chaque ARNg sera comparée à celle de la population témoin représentée par les cellules TF1 *UROS*<sup>E10i</sup> Cas9 transduites dans les mêmes conditions avec la banque GeCKO et non sélectionnées en fonction de leur fluorescence. L'analyse et la comparaison par NGS de ces deux populations nous permettra de déterminer les ARNg sur-représentés et sous-représentés dans la population cible par rapport à la population témoin. La population Porph- de cellules TF1 *UROS*<sup>E10i</sup> Cas9 transduites avec la librairie GeCKO sera enrichie en ARNg qui ciblent des gènes impliqués dans la diminution de l'accumulation de porphyrines. En effet, si ces gènes sont éteints par CRISPR-Cas9, la cellule devient moins fluorescente car elle accumule moins de porphyrines. À l'inverse, cette même population de cellules Porph- sera appauvrie en ARNg impliqués dans l'augmentation de l'accumulation de porphyrines.

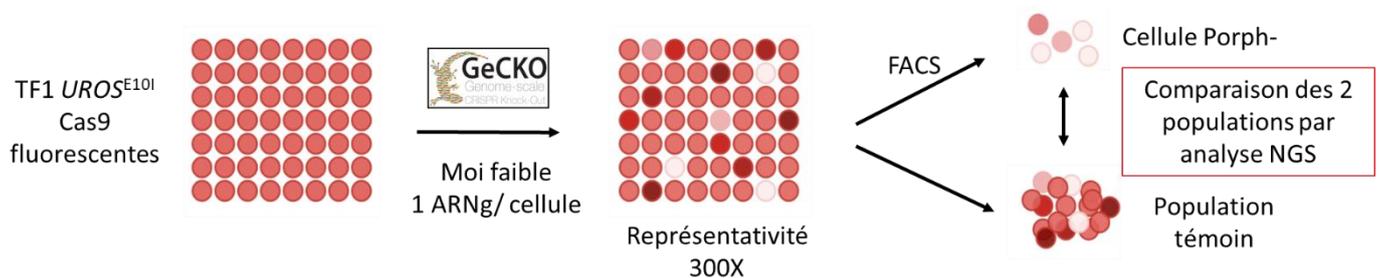


Figure 22 - Stratégie de criblage des cellules TF1 *UROS*<sup>E10i</sup> Cas9 transduites avec la librairie GeCKO.

Au cours du criblage, chaque gène sera ciblé par 6 ARNg différents et chaque ARNg spécifique sera représenté environ 300 fois afin de garder une bonne représentativité de la banque d'ARNg. Les cellules TF1 *UROS*<sup>E10i</sup> Cas9 transduites avec la librairie GeCKO à une MOI faible n'accumulent pas de porphyrines (Fig. 20. Cellules Porph-) seront triées et analysées par NGS. La proportion de chaque ARNg sera comparée à celle de la population témoin représentée par les cellules TF1 *UROS*<sup>E10i</sup> transduites dans les mêmes conditions avec la banque GeCKO.

Afin de valider cette expérience, nous utiliserons comme contrôle des gènes déjà connus pour modifier positivement ou négativement l'accumulation des porphyrines dans les cellules (Tableau 3). En premier lieu nous nous intéresserons à la représentativité des ARNg ciblant les gènes de la voie de biosynthèse de l'hème directement impliqués dans les autres formes de porphyries érythropoïétiques (*ALAS2*, *UROD*, *FECH*) (Figure1). Les ARNg ciblant les gènes *UROD* et *FECH* devraient être sous-représentés dans notre population cible car l'inactivation de ces gènes bloque la biosynthèse de l'hème et induit l'accumulation de porphyrines<sup>150</sup>. En ce qui concerne le gène *ALAS2*, les cas de protoporphyrie dominante liée à l'X sont dus à l'apparition de mutations gain de fonction du gène. En revanche une inhibition de l'expression du gène *ALAS2* permet de réduire l'accumulation des porphyrines par une stratégie de réduction de substrat<sup>14</sup>. Les ARNg ciblant *ALAS2* devraient donc être sur-représentés dans notre population cible. Ensuite, nous observerons la représentativité des ARNg ciblant le gène *ClpX*. Ce gène bien que n'appartenant pas à la biosynthèse de l'hème est associé à des formes de protoporphyrie érythropoïétique. Le gène *ClpX* code pour une ATPase associée à un système mitochondrial de dégradation des protéines qui régule l'activité d'*ALAS2*. Dans les cas où les deux allèles du gène *ClpX* sont mutés, l'activation d'*ALAS2* et donc la biosynthèse de l'hème sont inhibées<sup>151</sup>. Les ARNg ciblant le gène *ClpX*, entraînant un KO du gène devraient donc diminuer l'accumulation des porphyrines et être sur-exprimés dans nos cellules cibles. Enfin nous prêterons attention au gène *GATA-1*. Le facteur de transcription *GATA-1* est fortement impliqué dans la différenciation érythropoïétique et il a été démontré que des mutations du gène *GATA-1* engendraient un phénotype proche de la PEC en plus d'une bêta-thalassémie<sup>57</sup>. L'expression du gène *UROS* est très fortement augmentée au cours de la différenciation érythropoïétique et la présence d'éléments de réponse au facteur de transcription *GATA-1* a été démontrée dans le promoteur érythroïde spécifique du gène *UROS*. Ainsi un KO du gène *GATA-1* dans nos modèles cellulaires devrait aboutir à une diminution de l'expression du gène *UROS* et à une augmentation de l'accumulation des porphyrines se traduisant par une sous-représentation des ARNg ciblant *GATA-1* dans nos cellules cibles.

<u>ARNg sur-représentés (enrichis)</u>	<u>ARNg sous-représentés (appauvris)</u>
<p><i>ALAS2</i> <i>ClpX</i></p>	<p><i>UROS</i> <i>UROD</i> <i>FECH</i> <i>GATA-1</i></p>

Tableau 3 - Représentativité attendue des ARNg contrôles dans la population Porph- de cellules TF1 *UROS*<sup>E10i</sup> Cas9 transduites avec la librairie GeCKO.

Les gènes candidats identifiés grâce au criblage devront être analysés et validés individuellement afin d'évaluer leur potentiel intérêt thérapeutique. En effet, comme tous types d'expérience de criblage, il peut y avoir des faux positifs ou des faux négatifs. Il est donc nécessaire de vérifier que le KO des gènes candidats identifiés confère le phénotype d'intérêt. Une analyse des indels sera effectuée et chacun des ARNg d'intérêt sera cloné individuellement afin de valider le phénotype obtenu lors du criblage. Après la validation du phénotype de criblage et du KO du gène, nous vérifierons la diminution de l'expression des protéines par immunohistochimie et Western blot. De cette façon, nous pourrions établir une relation phénotype-génotype.

La réalisation du criblage sur les cellules TF1 *UROS*<sup>WT</sup> non fluorescentes sera également nécessaire pour avoir une vision exhaustive des gènes impliqués dans l'accumulation de porphyrines (Fig. 22). Les cellules TF1 *UROS*<sup>WT</sup> Cas9 devenues fluorescentes après avoir été transduites par la banque GeCKO seront sélectionnées et analysées de la même manière que pour les cellules TF1 *UROS*<sup>E10i</sup> Cas9 dont la fluorescence diminue suite à la transduction par la librairie.

## **Conclusion**

## Conclusion

La PEC est une des formes les plus rares et sévères des porphyries. Elle se caractérise par une accumulation massive de composés photoréactifs dans la lignée érythroïde de la moelle osseuse, entraînant les manifestations symptomatiques de la PEC. Alors que des approches thérapeutiques prometteuses sont à l'étude, une meilleure compréhension de la physiopathologie sous-jacente de la PEC au niveau moléculaire et biochimique est nécessaire afin d'optimiser les modalités thérapeutiques actuelles et élaborer de nouveaux traitements. De récentes études ont souligné l'importance des gènes modificateurs associés à la PEC<sup>48</sup>. Les découvertes actuelles suggèrent l'existence d'autres gènes modificateurs actuellement non identifiés participant au phénotype de la PEC.

L'objectif du projet qui m'a été confié était de réaliser un criblage génomique fonctionnel à l'aide du système CRISPR-Cas9 afin d'identifier de nouveaux gènes impliqués directement ou indirectement dans la voie de la biosynthèse de l'hème et modulant l'accumulation de porphyrines. Dans cet optique, des lignées cellulaires sauvages : TF1 *UROS*<sup>WT</sup> et modélisant la PEC : TF1 *UROS*<sup>E10i</sup> ont été transduites avec un lentivirus Cas9 puis caractérisées. Les conditions d'expérimentation du criblage ont également été définies. La crise sanitaire actuelle ne m'a pas permis de continuer mes expériences au sein du laboratoire. Néanmoins, pour la prochaine étape du projet, environ 360.10<sup>6</sup> cellules TF1 *UROS*<sup>WT</sup> Cas9 et TF1 *UROS*<sup>E10i</sup> Cas9 seront transduites à une MOI nous assurant de n'avoir qu'un ARNg par cellules par les lentivirus de la librairie GeCKO. Dans ces conditions, les cellules devront intégrer un seul des 121 413 ARNg de la banque tout en conservant sa représentativité à 300X. Une sélection à la puromycine permettra d'éliminer les cellules non transduites. Par la suite, les cellules TF1 *UROS*<sup>WT</sup> et TF1 *UROS*<sup>E10i</sup> seront triées en fonction de la fluorescence des porphyrines. Les populations TF1 *UROS*<sup>WT</sup> accumulant des porphyrines et TF1 *UROS*<sup>E10i</sup> n'accumulant plus de porphyrines seront sélectionnées. L'ADN de ces cellules sera ensuite analysé par NGS afin de déterminer quels ARNg sont enrichis ou appauvris par rapport à une population témoin correspondante.

Ce criblage permettrait de découvrir des gènes ou des mécanismes cellulaires jouant un rôle dans le développement de la PEC. De manière générale, ce criblage permettra d'avoir une

vision exhaustive des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'hème. En plus de permettre une meilleure caractérisation de la maladie, ces découvertes seront essentielles d'un point de vue thérapeutique. En effet, l'identification de nouvelles cibles permettra d'élaborer de nouvelles thérapies pour le traitement de la PEC ainsi que pour d'autres types de porphyries comme la protoporphyrine érythropoïétique.

## Bibliographie et Webographie

1. Ramanujam, V. S. & Anderson, K. E. Porphyrin Diagnostics—Part 1: A Brief Overview of the Porphyrins. *Current Protocols in Human Genetics* **86**, 17.20.1-17.20.26 (2015).
2. Mohan, G. & Madan, A. Ala Dehydratase Deficiency Porphyrin. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2020).
3. Sassa, S. Modern diagnosis and management of the porphyrias. *Br J Haematol* **135**, 281–292 (2006).
4. Karim, Z., Lyoumia, S., Nicolasa, G., Deybacha J-C., Gouya L., Puy H., . Porphyrins: A 2015 update. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* **39**, 412–425 (2015).
5. Szlendak, U., Bykowska, K. & Lipniacka, A. Clinical, Biochemical and Molecular Characteristics of the Main Types of Porphyrin. *Adv Clin Exp Med* **25**, 361–368 (2016).
6. Fujiwara, T. & Harigae, H. Biology of Heme in Mammalian Erythroid Cells and Related Disorders. *BioMed Research International* **2015**, 1–9 (2015).
7. Ajioka, R. S., Phillips, J. D. & Kushner, J. P. Biosynthesis of heme in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1763**, 723–736 (2006).
8. Layer, G., Reichelt, J., Jahn, D. & Heinz, D. W. Structure and function of enzymes in heme biosynthesis. *Protein Science* **19**, 1137–1161 (2010).
9. Chiabrando, D., Mercurio, S. & Tolosano, E. Heme and erythropoiesis: more than a structural role. *Haematologica* **99**, 973–983 (2014).
10. Cotter, P. D., Drabkin, H. A., Varkony, T., Smith, D. I. & Bishop, D. F. Assignment of the human housekeeping delta-aminolevulinic synthase gene (ALAS1) to chromosome band 3p21.1 by PCR analysis of somatic cell hybrids. *Cytogenet. Cell Genet.* **69**, 207–208 (1995).
11. Cotter, Huntington, Gorski & Bishop. Assignment of human erythroid  $\delta$ -aminolevulinic synthase (ALAS2) to a distal subregion of band Xp11.21 by PCR analysis of somatic cell hybrids containing X;Autosome translocations. *Genomics* **13**, 211–212 (1992).
12. Harigae H., Suwabe N., Weinstock P H., Nagai N., Fujita H., Yamamoto M., Sassa S. Deficient heme and globin synthesis in embryonic stem cells lacking the erythroid-specific delta-aminolevulinic synthase gene. *Blood* **91**, 798–805 (1998).
13. Sadlon, T. J., Dell’Oso, T., Surinya, K. H. & May, B. K. Regulation of erythroid 5-aminolevulinic synthase expression during erythropoiesis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **31**, 1153–1167 (1999).

14. Peoc'h, K., Nicolas G., Schmitt C., Mirmirana A., Daher R., Lefebvre T., Gouya L., Karim Z., Puy H. Regulation and tissue-specific expression of  $\delta$ -aminolevulinic acid synthases in non-syndromic sideroblastic anemias and porphyrias. *Mol Genet Metab* **128**, 190–197 (2019).
15. Mc, E. & Clinics, I. Diagnostic and therapeutic strategies for porphyrias. *The Netherlands Journal of Medicine* **78**, 12 (2020).
16. Wang, B., Rudnick, S., Cengia, B. & Bonkovsky, H. L. Acute Hepatic Porphyrias: Review and Recent Progress: Hepatology Communications. *Hepatol Commun* **3**, 193–206 (2019).
17. Besur, S., Schmeltzer, P. & Bonkovsky, H. L. Acute Porphyrias. *The Journal of Emergency Medicine* **49**, 305–312 (2015).
18. Bonkowsky, H., Tschudy D.P., Collins A., Doherty J., Bossenmaier I., Cardinal R., and Watson C.J.. Repression of the Overproduction of Porphyrin Precursors in Acute Intermittent Porphyria by Intravenous Infusions of Hematin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **68**, 2725–2729 (1971).
19. Akagi, R., Kato. K., Inoue R., Anderson K.E., Jaffe E.K., Sassa S.  $\delta$ -Aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) porphyria: The first case in North America with two novel ALAD mutations. *Molecular Genetics and Metabolism* **87**, 329–336 (2006).
20. Balwani, M. & Desnick, R. J. The porphyrias: advances in diagnosis and treatment. *Blood* **120**, 4496–4504 (2012).
21. Potluri, V. R., Astrin, K. H., Wetmur, J. G., Bishop, D. F. & Desnick, R. J. Human delta-aminolevulinic acid dehydratase: chromosomal localization to 9q34 by in situ hybridization. *Hum. Genet.* **76**, 236–239 (1987).
22. Neeleman, R. A., van Beers E., Friesema E., Koole-Lesuis R., van der Pol W., Wilson P.,<sup>1</sup> and Langendonk J. Clinical Remission of Delta-Aminolevulinic Acid Dehydratase Deficiency Through Suppression of Erythroid Heme Synthesis. *Hepatology*. **70**, 434-436 (2019).
23. Stölzel, U., Doss, M. O. & Schuppan, D. Clinical Guide and Update on Porphyrias. *Gastroenterology* **157**, 365-381 (2019).
24. Doss, M., Laubenthal, F. & Stoeppeler, M. Lead poisoning in inherited delta-aminolevulinic acid dehydratase deficiency. *Int Arch Occup Environ Health* **54**, 55–63 (1984).
25. Sassa, S. & Kappas, A. Hereditary tyrosinemia and the heme biosynthetic pathway. Profound inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydratase activity by succinylacetone. *J. Clin. Invest.* **71**, 625–634 (1983).

26. Inoue, R. & Akagi, R. Co-synthesis of Human  $\delta$ -Aminolevulinatase Dehydratase (ALAD) Mutants with the Wild-type Enzyme in Cell-free System—Critical Importance of Conformation on Enzyme Activity—. *J Clin Biochem Nutr* **43**, 143–153 (2008).
27. Wang, A. L., Arredondo-Vega F.X., Giampietro P.F., Smith M., Anderson W.F., Desnick R.J. Regional gene assignment of human porphobilinogen deaminase and esterase A4 to chromosome 11q23 leads to 11qter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 5734–5738 (1981).
28. Cardenas, J. L. & Guerrero, C. Acute intermittent porphyria: general aspects with focus on pain. *Current Medical Research and Opinion* **34**, 1309–1315 (2018).
29. Puy, H., Gouya, L. & Deybach, J.-C. Porphyrrias. *The Lancet* **375**, 924–937 (2010).
30. Floderus, Y., Shoolingin-Jordan, P. & Harper, P. Acute intermittent porphyria in Sweden. Molecular, functional and clinical consequences of some new mutations found in the porphobilinogen deaminase gene: Acute intermittent porphyria in Sweden. *Clinical Genetics* **62**, 288–297 (2002).
31. Phillips, J. D. Heme biosynthesis and the porphyrias. *Molecular Genetics and Metabolism* **128**, 164–177 (2019).
32. Whatley, S. D. & Badminton, M. N. Role of genetic testing in the management of patients with inherited porphyria and their families. *Ann Clin Biochem* **50**, 204–216 (2013).
33. Fontanellas, A., Ávila, M. A. & Berraondo, P. Emerging therapies for acute intermittent porphyria. *Expert Reviews in Molecular Medicine* **18**, (2016).
34. Singal, A. K., Parker C., Bowden C., Thapar M., Liu L., and McGuire B.M. Liver Transplantation in the Management of Porphyria. *Hepatology* **60**, 1082–1089 (2014).
35. Singal, A. K. Porphyria cutanea tarda: Recent update. *Molecular Genetics and Metabolism* **128**, 271–281 (2019).
36. Handler, N. S., Handler, M. Z., Stephany, M. P., Handler, G. A. & Schwartz, R. A. Porphyria cutanea tarda: an intriguing genetic disease and marker. *Int J Dermatol* **56**, e106–e117 (2017).
37. Wang, B. & Bissell, D. M. Hereditary Coproporphyria. in *GeneReviews* (eds. Adam, M. P. et al.) (1993).
38. Roberts, A. G., Whatley S.D., Daniels J., Holmans P., Fenton I., Owen M.J., Thompson P., Long C., Elder G.H. Partial characterization and assignment of the gene for protoporphyrinogen oxidase and variegate porphyria to human chromosome 1q23. *Hum Mol Genet* **4**, 2387–2390 (1995).

39. Elder, G., Harper, P., Badminton, M., Sandberg, S. & Deybach, J.-C. The incidence of inherited porphyrias in Europe. *J Inherit Metab Dis* **36**, 849–857 (2013).
40. Bales, L., Day, R. S. & Blekkenhorst, G. H. The clinical and biochemical features of variegate porphyria: An analysis of 300 cases studied at Groote Schuur Hospital, Cape Town. *International Journal of Biochemistry* **12**, 837–853 (1980).
41. van Tuyll van Serooskerken, A. M., Drögemöller B.I., te Velde K., Bladergroen R.S., Steijlen P.M., P. Poblete-Gutiérrez P., van Geel M., van Heerden C.J., L. Warnich L. and Frank J. Extended haplotype studies in South African and Dutch variegate porphyria families carrying the recurrent p.R59W mutation confirm a common ancestry: Recurrent mutation p.R59W in variegate porphyria. *British Journal of Dermatology* **166**, 261–265 (2012).
42. Singal, A. K. & Anderson, K. E. Variegate Porphyria. in *GeneReviews* (eds. Adam, M. P. et al.) (1993).
43. Brenner, D. A., Didier J.M., Frasier F., Christensen S.R., Evans G.A., Dailey H.A. A molecular defect in human protoporphyria. *Am J Hum Genet* **50**, 1203–1210 (1992).
44. Whatley, S. D., Mason N.G., Holme S.A., Anstey A.V., Elder G.H., Badminton M.N. Molecular epidemiology of erythropoietic protoporphyria in the U.K. *British Journal of Dermatology* **162**, 642–646 (2010).
45. Darwich, E. & Herrero, C. New Developments in Erythropoietic Porphyrias. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)* **104**, 212–219 (2013).
46. Singal, A. K., Parker C., Bowden C., Thapar M., Liu L., and McGuire B.M.. Liver Transplantation in the Management of Porphyria. *Hepatology*. 60, 1082-1089 (2015).
47. Whatley, S. D., Ducamp S., Gouya L., Grandchamp B., Beaumont C., Badminton M.N., Elder G.H., Alexander Holme S., Anstey A.V., Parker M., orrigall A.V., Meissner P.N., Hift R.J., Marsden J.T., Ma Y., Mieli-Vergani G., Deybach J-C and Puy H. C-terminal deletions in the ALAS2 gene lead to gain of function and cause X-linked dominant protoporphyria without anemia or iron overload. *Am. J. Hum. Genet.* **83**, 408–414 (2008).
48. Yasuda, M., Chen, B. & Desnick, R. J. Recent advances on porphyria genetics: Inheritance, penetrance & molecular heterogeneity, including new modifying/causative genes. *Molecular Genetics and Metabolism* **128**, 320–331 (2019).
49. Cotter, P. D., Baumann, M. & Bishop, D. F. Enzymatic defect in ‘X-linked’ sideroblastic anemia: molecular evidence for erythroid delta-aminolevulinate synthase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4028–4032 (1992).

50. Seager, M. J., Whatley, S. D., Anstey, A. V. & Millard, T. P. X-linked dominant protoporphyria: a new porphyria. *Clin Exp Dermatol* **39**, 35–37 (2014).
51. Landefeld, Kentouche K., Gruhn B., Stauch T., Rößler S., Schuppan D., Whatley S.D., Beck J.F., Stölzel U. X-linked protoporphyria: Iron supplementation improves protoporphyrin overload, liver damage and anaemia. *Br J Haematol* **173**, 482–484 (2016).
52. Liu, L. U., Phillips, J., Bonkovsky, H., & Porphyrins Consortium of the Rare Diseases Clinical Research Network. Hepatoerythropoietic Porphyria. in *GeneReviews* (eds. Adam, M. P. et al.) (1993).
53. Darwich, E., To-Figueras, J., Badenas, C. & Herrero, C. Hepatoerythropoietic Porphyria and Familial Porphyria Cutanea Tarda in Spanish Patients: G281E Mutation in the Uroporphyrinogen Decarboxylase Gene. *Arch Dermatol* **146**, 1313–1314 (2010).
54. Cantatore-Francis, J. L., Cohen J., Balwani M., Kahn P., Lazarus H.M., Desnick R.J., Schaffer J.V. Hepatoerythropoietic Porphyria Misdiagnosed as Child Abuse: Cutaneous, Arthritic, and Hematologic Manifestations in Siblings With a Novel *UROD* Mutation. *Arch Dermatol* **146**, 529–33 (2010).
55. Di Pierro, E., Brancaloni, V. & Granata, F. Advances in understanding the pathogenesis of congenital erythropoietic porphyria. *Br J Haematol* **173**, 365–379 (2016).
56. Madan, Schaaf C.P., Vardhan P., Bhayana S., Chandra P., Anderson K.E. Hans Gunther and his disease. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **23**, 261–263 (2007).
57. Phillips, J. D., Steensma, D. P., Pulsipher, M. A., Spangrude, G. J. & Kushner, J. P. Congenital erythropoietic porphyria due to a mutation in GATA1: the first trans-acting mutation causative for a human porphyria. *Blood* **109**, 2618–2621 (2007).
58. Sassa, S. & Kappas, A. Molecular aspects of the inherited porphyrias. *J Intern Med* **247**, 169–178 (2000).
59. Fritsch, C., Bolsen, K., Ruzicka, T. & Goerz, G. Congenital erythropoietic porphyria. *Journal of the American Academy of Dermatology* **36**, 17 (1997).
60. Desnick, R. J. & Astrin, K. H. Congenital erythropoietic porphyria: advances in pathogenesis and treatment: Review. *British Journal of Haematology* **117**, 779–795 (2002).
61. Bensidhoum, M., Larou, M., Lemeur, M., Dierich, A., Costet, P., Raymond, S., Daniel, JY., and de Verneuil, H. *et al.* The disruption of mouse uroporphyrinogen III synthase (*uros*) gene is fully lethal. *Transgenics* 275–280 (1998).

62. Verstraeten, L., N. Van Regemorter N., Pardon A., de Verneuil H., Da Silva V., Rodesch F., Vermeylen D., Donner C., J. C. Noel J.C., Nordmann Y. and Hassoun A.. Biochemical diagnosis of a fatal case of Günther's disease in a newborn with hydrops foetalis. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* **31**, 121–128 (1993).
63. Warner, C. A., Poh-Fitzpatrick, M. B., Zaider, E. F., Tsai, S.-F. & Desnick, R. J. Congenital Erythropoietic Porphyria: A Mild Variant With Low Uroporphyrin I Levels due to a Missense Mutation (A66V) Encoding Residual Uroporphyrinogen III Synthase Activity. *Arch Dermatol* **128**, 1243–1248 (1992).
64. Martinez Peinado, C., Diaz de Heredia C., To-Figueras J., Arias-Santiago S., Nogueras P., Elorza I., Olive T., Badenas C., Moreno J., Tercedor J., and Herrero C. Successful Treatment of Congenital Erythropoietic Porphyria Using Matched Unrelated Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Pediatr Dermatol* **30**, 484–489 (2013).
65. Dupuis-Girod, S., Akkari V., Ged C., Claire Galambrun C., Kebaïli K., Deybach J-C., Claudy A., Geburher L., Philippe N., de Verneuil H., and Bertrand Y. Successful match-unrelated donor bone marrow transplantation for congenital erythropoietic porphyria (Günther disease). *Eur J Pediatr* **164**, 104–107 (2005).
66. Tezcan, I., Xu W, Gurgey A, Tuncer M, Cetin M, Oner C, Yetgin S, Ersoy F, Aizencang G., Astrin K.H, Desnick R.J. Congenital erythropoietic porphyria successfully treated by allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **92**, 4053–4058 (1998).
67. Erwin, A., Balwani, M. & Desnick, R. J. Congenital Erythropoietic Porphyria. *GeneReviews* Porphyrins Consortium of the NIH-Sponsored Rare Diseases Clinical Research Network (2013).
68. Mathews-Roth, M. M. Carotenoids in Erythropoietic Protoporphyrin and Other Photosensitivity Diseases. *Ann NY Acad Sci* **691**, 127–138 (1993).
69. Erwin, A. L. & Desnick, R. J. Congenital erythropoietic porphyria: Recent advances. *Molecular Genetics and Metabolism* **128**, 288–297 (2019).
70. Howard, M., Hall, A. & Ramsay, D. Beneficial use of a novel topical hypochlorous acid preparation for chronic dematoses at risk of secondary infection. *Australasian Journal of Dermatology* **57**, 326–327 (2016).
71. Katugampola, R. P., Anstey A.V., Inlay A.Y., Whatley S., Woolf J., Mason N., Deybach J.C., Puy H., Ged C., de Verneuil H., Hanneken S., Minder E., Schneider-Yin X. and Badminton M.N. A management algorithm for congenital erythropoietic porphyria derived from a

- study of 29 cases: Management algorithm for congenital erythropoietic porphyria. *British Journal of Dermatology* **167**, 888–900 (2012).
72. Piomelli, S., Poh-Fitzpatrick, M. B., Seaman, C., Skolnick, L. M. & Berdon, W. E. Complete suppression of the symptoms of congenital erythropoietic porphyria by long-term treatment with high-level transfusions. *N Engl J Med* **314**, 1029–1031 (1986).
  73. Centre de Référence Maladies Rares Porphyries – Centre Français des Porphyries – Informations et médicaments. <https://www.porphyrie.net/>.
  74. What is EPNET ? | European Porphyria Network. <http://porphyria.eu/>.
  75. Richard, E., Robert-Richard, E., Ged, C., Moreau-Gaudry, F. & de Verneuil, H. Erythropoietic porphyrias: animal models and update in gene-based therapies. *Curr Gene Ther* **8**, 176–186 (2008).
  76. Moreno, D. F. & Cid, J. Graft-versus-host disease. *Med Clin (Barc)* **152**, 22–28 (2019).
  77. Yasuda, M. & Desnick, R. J. Murine models of the human porphyrias: Contributions toward understanding disease pathogenesis and the development of new therapies. *Molecular Genetics and Metabolism* **128**, 332–341 (2019).
  78. Ged, C. *et al.* A knock-in mouse model of congenital erythropoietic porphyria. *Genomics* **87**, 84–92 (2006).
  79. Bishop, D. F., Johansson A, Phelps R., Shady A., Ramirez M., Yasuda M., Caro A., and Desnick R.J. Uroporphyrinogen III synthase knock-in mice have the human congenital erythropoietic porphyria phenotype, including the characteristic light-induced cutaneous lesions. *Am J Hum Genet* **78**, 645–658 (2006).
  80. Bishop, D. F., Clavero, S., Mohandas, N. & Desnick, R. J. Congenital erythropoietic porphyria: characterization of murine models of the severe common (C73R/C73R) and later-onset genotypes. *Mol Med* **17**, 748–756 (2011).
  81. Robert-Richard, E., Moreau-Gaudry F., Lalanne M., Isabelle Lamrissi-Garcia I., Cario-André M., Guyonnet-Dupérat V., Taine L., Ged C., and de Verneuil H. Effective Gene Therapy of Mice with Congenital Erythropoietic Porphyria Is Facilitated by a Survival Advantage of Corrected Erythroid Cells. *The American Journal of Human Genetics* **82**, 113–124 (2008).
  82. Hacein-Bey-Abina, S., Garrigue A, Wang G, Soulier J, im A, Morillon E, Iappier E, Caccavelli L, Delabesse E, Beldjord K, Vahid Asnafi V, MacIntyre E, Dal Cortivo L, Radford I., Brousse N, Sigaux F, Moshous D., Hauer J, Borkhardt A, Belohradsky, Wintergerst U., Velez M, Leiva L, Sorensen R., Wulffraat N., Blanche S., Bushman F., Fischer A., and Marina Cavazzana-

- Calvo M. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* **118**, 3132–3142 (2008).
83. Howe, S. J., Mansour M.R., Schwarzwaelder K, Bartholomae C, Hubank M, Kempinski H, Brugman M, Pike-Overzet K, Chatters S, de Ridder D, Gilmour K, Adams S, Thornhill S, Parsley K, Staal F, Gale R, Linch D, Bayford J, Brown L, Quaye M, Kinnon C, Ancliff P, Webb D, Schmidt M, von Kalle C, Gaspar B and J. Thrasher A. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest* **118**, 3143–3150 (2008).
84. Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nature Protocols* **2**, 3081–3089 (2007).
85. Papapetrou, E. P., Lee G, Malani N, Setty M, Riviere I, Tirunagari L, Kadota K, Roth S, Giardina P, Viale A, Leslie C, Bushman F., Studer L. and Sadelain M. Genomic safe harbors permit high  $\beta$ -globin transgene expression in thalassemia induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* **29**, 73–78 (2011).
86. Bedel, A., Taillepierre M, Guyonnet-Duperat V., Lippert E., Dubus P., Dabernat S., Mautuit T., Cardinaud B., Pain C., Rousseau B., Lalanne M., Ged C., Duchartre Y., Richard E., de Verneuil H. and Moreau-Gaudry F. Metabolic correction of congenital erythropoietic porphyria with iPSCs free of reprogramming factors. *Am. J. Hum. Genet.* **91**, 109–121 (2012).
87. Wu, C. & Dunbar, C. E. Stem cell gene therapy: the risks of insertional mutagenesis and approaches to minimize genotoxicity. *Front Med* **5**, 356–371 (2011).
88. Doudna, J. A. & Charpentier, E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* **346**, 1258096 (2014).
89. Cong, L. , Ran A, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu P, Wu X, Jiang W, Marraffini L, and Feng Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**, 819–823 (2013).
90. Kohn, D. B. & Kuo, C. Y. New frontiers in the therapy of primary immunodeficiency: From gene addition to gene editing. *J Allergy Clin Immunol* **139**, 726–732 (2017).
91. Prat, F., Toutain J., Boutin J., Amintas S., Cullot G., Lalanne M., Lamrissi-Garcia I., Moranvillier I., Richard E., Blouin J-M., Dabernat S., Moreau-Gaudry F. and Bedel A. Mutation-Specific Guide RNA for Compound Heterozygous Porphyria On-target Scarless Correction by CRISPR/Cas9 in Stem Cells. *Stem Cell Reports* **15**, 677–693 (2020).

92. Ged, C., Mégarbané H., Chouery E., Lalanne M., André Mégarbané A., de Verneuil H. Congenital erythropoietic porphyria: report of a novel mutation with absence of clinical manifestations in a homozygous mutant sibling. *J Invest Dermatol* **123**, 589–591 (2004).
93. Fortian, A., Castaño D, Ortega G, Laín A, Pons M, and Millet O. Uroporphyrinogen III synthase mutations related to congenital erythropoietic porphyria identify a key helix for protein stability. *Biochemistry* **48**, 454–461 (2009).
94. Frank, J, Wang X., Lam H.M., Aita V.M., Jugert F., Goerz G., Merk H., Poh-Fitzpatrick, Christiano A.M. C73R is a hotspot mutation in the uroporphyrinogen III synthase gene in congenital erythropoietic porphyria. *Ann Hum Genet* **62**, 225–230 (1998).
95. ben Bdira, F., González E, Pluta P, Lain A, Sanz-Parra A, Falcon-Perez J.M. and Millet O. Tuning intracellular homeostasis of human uroporphyrinogen III synthase by enzyme engineering at a single hotspot of congenital erythropoietic porphyria. *Human Molecular Genetics* **23**, 5805–5813 (2014).
96. Blouin, J.-M., Duchartre Y, Costet P, Lalanne M, Ged C, Lain A, Millet O, de Verneuil H, and Richard E. Therapeutic potential of proteasome inhibitors in congenital erythropoietic porphyria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 18238–18243 (2013).
97. Mori, K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* **101**, 451–454 (2000).
98. Fortian, A., González, E., Castaño, D., Falcon-Perez, J. M. & Millet, O. Intracellular rescue of the uroporphyrinogen III synthase activity in enzymes carrying the hotspot mutation C73R. *J Biol Chem* **286**, 13127–13133 (2011).
99. Blouin, J.-M., Bernardo-Seisdedos G, Sasso E, Esteve J, Ged C, Lalanne M., Sanz-Parra A, Urquiza P, de Verneuil H, Millet O and Richard E. Missense UROS mutations causing congenital erythropoietic porphyria reduce UROS homeostasis that can be rescued by proteasome inhibition. *Human Molecular Genetics* **26**, 1565–1576 (2017).
100. Résumé des Caractéristiques du Produit. <http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/rcp/R0311838.htm>.
101. Schenkein, D. Proteasome inhibitors in the treatment of B-cell malignancies. *Clin Lymphoma* **3**, 49–55 (2002).
102. Thibaudeau, T. A. & Smith, D. M. A Practical Review of Proteasome Pharmacology. *Pharmacol Rev* **71**, 170–197 (2019).

103. Schmidt, M. & Finley, D. Regulation of proteasome activity in health and disease. *Biochim Biophys Acta* **1843**, 13–25 (2014).
104. Lagarde, C. D Hamel-Teillac, Y De Prost, S Blanche, C Thomas, A Fischer, Y Nordmann, C Ged, H De Verneuil. Allogeneic bone marrow transplantation in congenital erythropoietic porphyria. Gunther's disease. *Ann Dermatol Venereol* **125**, 114–117 (1998).
105. Bruna, J. , Udina E., Vilches J., Vynckier A., Monbaliu J., Silvermane L., Navarro X. Neurophysiological, histological and immunohistochemical characterization of bortezomib-induced neuropathy in mice. *Exp Neurol* **223**, 599–608 (2010).
106. Mujtaba, T. & Dou, Q. P. Advances in the understanding of mechanisms and therapeutic use of bortezomib. *Discov Med* **12**, 471–480 (2011).
107. Muntau, A. C., Leandro, J., Staudigl, M., Mayer, F. & Gersting, S. W. Innovative strategies to treat protein misfolding in inborn errors of metabolism: pharmacological chaperones and proteostasis regulators. *J Inherit Metab Dis* **37**, 505–523 (2014).
108. Parenti, G., Andria, G. & Valenzano, K. J. Pharmacological Chaperone Therapy: Preclinical Development, Clinical Translation, and Prospects for the Treatment of Lysosomal Storage Disorders. *Mol Ther* **23**, 1138–1148 (2015).
109. Schubert, H. L., Phillips, J. D., Heroux, A. & Hill, C. P. Structure and mechanistic implications of a uroporphyrinogen III synthase-product complex. *Biochemistry* **47**, 8648–8655 (2008).
110. Urquiza, P., Laín A, Sanz-Parra A, Moreno J, Bernardo-Seisdedos G, Dubus P, González E, Gutiérrez-de-Juan V, García S, Eraña H, San Juan I, Macías I, Ben Bdira F, Pluta P, Ortega G, Oyarzábal J, González-Muñiz R, Rodríguez-Cuesta J, Anguita J, Díez E, Blouin J-M, de Verneuil H, Mato J, Emmanuel Richard E, Falcón-Pérez J, Castilla J, Millet O. Repurposing ciclopirox as a pharmacological chaperone in a model of congenital erythropoietic porphyria. *Sci Transl Med* **10**, 7467 (2018).
111. Gambello, M. J. & Li, H. Current strategies for the treatment of inborn errors of metabolism. *Journal of Genetics and Genomics* **45**, 61–70 (2018).
112. Balwani, M. *et al.* Phase 3 Trial of RNAi Therapeutic Givosiran for Acute Intermittent Porphyria. *N Engl J Med* **382**, 2289–2301 (2020).
113. Minder, E. I. & Barman-Aksözen, J. Iron and erythropoietic porphyrias. *Blood* **126**, 130–132 (2015).

114. Barman-Aksözen, J., Minder, E. I., Schubiger, C., Biolcati, G. & Schneider-Yin, X. In ferrochelatase-deficient protoporphyria patients, ALAS2 expression is enhanced and erythrocytic protoporphyrin concentration correlates with iron availability. *Blood Cells Mol Dis* **54**, 71–77 (2015).
115. Barman-Aksözen, J., Halloy, F; Iyer, P; Schümperli, D; Minder, AE; Hall, J; Minder, EI.; Schneider-Yin. Delta-aminolevulinic acid synthase 2 expression in combination with iron as modifiers of disease severity in erythropoietic protoporphyria. *Mol Genet Metab* **128**, 304–308 (2019).
116. To-Figueras, J., Ducamp S, Clayton J, Badenas C, Delaby C, Ged C, Lyoumi S, Gouya L, de Verneuil H, Beaumont C, Ferreira G, Deybach JC, Carmen Herrero C, and Puy H. ALAS2 acts as a modifier gene in patients with congenital erythropoietic porphyria. *Blood* **118**, 1443–1451 (2011).
117. Egan, D. N., Yang, Z., Phillips, J. & Abkowitz, J. L. Inducing iron deficiency improves erythropoiesis and photosensitivity in congenital erythropoietic porphyria. *Blood* **126**, 257–261 (2015).
118. Kontoghiorghe, C. N. & Kontoghiorghes, G. J. Efficacy and safety of iron-chelation therapy with deferoxamine, deferiprone, and deferasirox for the treatment of iron-loaded patients with non-transfusion-dependent thalassemia syndromes. *Drug Des Devel Ther* **10**, 465–481 (2016).
119. Hider, R. C. & Hoffbrand, A. V. The Role of Deferiprone in Iron Chelation. *New England Journal of Medicine* **379**, 2140–2150 (2018).
120. Sheth, S. Iron chelation: an update. *Curr Opin Hematol* **21**, 179–185 (2014).
121. Blouin, J.-M., Ged C, Lalanne M., Isabelle Lamrissi-Garcia I., Costet P, Daher R., Moreau-Gaudry F, Bedel A, Herve Puy H., Laurent Gouya L., Karim Z, and Richard E. Iron chelation rescues hemolytic anemia and skin photosensitivity in congenital erythropoietic porphyria. *Blood* **136**, 2457–2468 (2020).
122. Mirmiran, A., Poli A., Ged C., Schmitt C., Lefebvre T., Manceau H., Daher R, Moulouel B, Peoc'h K, Simonin S, Blouin JM, Deybach JC, Nicolas G, Puy H, Richard E, and Laurent Gouya. Phlebotomy as an efficient long-term treatment of congenital erythropoietic porphyria. *Haematologica* (2020) doi:10.3324/haematol.2019.228270.
123. Naessens, V., Ward, R. & Kuo, K. H. M. A proposed treatment algorithm for adults with Haemoglobin SC disease. *Br J Haematol* **182**, 607–609 (2018).

124. Lionnet, F. *et al.* Hemoglobin sickle cell disease complications: a clinical study of 179 cases. *Haematologica* **97**, 1136–1141 (2012).
125. Abkowitz, J. L. A simple Rx for congenital erythropoietic porphyria. *Blood* **136**, 2371–2372 (2020).
126. Sharp, R. A., Lowe, J. G. & Johnston, R. N. Anti-tuberculous drugs and sideroblastic anaemia. *Br J Clin Pract* **44**, 706–707 (1990).
127. Piso, R. J., Kriz, K. & Desax, M.-C. Severe isoniazid related sideroblastic anemia. *Hematology Reports* **3**, 2–2 (2011).
128. Konopka, L. & Hoffbrand, A. V. Haem synthesis in sideroblastic anaemia. *Br J Haematol* **42**, 73–83 (1979).
129. Fratz-Berilla, E. J., Breydo L., Gouya L., Puy H., Uversky V., Ferreira G. Isoniazid inhibits human erythroid 5-aminolevulinic synthase: Molecular mechanism and tolerance study with four X-linked protoporphyria patients. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1863**, 428–439 (2017).
130. Parker, C. J., Desnick R., Bissel M., Bloomer J, Singal A, Gouya L, Puy H, Anderson KE, Balwani M, Phillips JD. Results of a pilot study of isoniazid in patients with erythropoietic protoporphyria. *Mol Genet Metab* **128**, 309–313 (2019).
131. Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. & Nakata, A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* **169**, 5429–5433 (1987).
132. Fineran, P. C. & Charpentier, E. Memory of viral infections by CRISPR-Cas adaptive immune systems: acquisition of new information. *Virology* **434**, 202–209 (2012).
133. CRISPR Systems. *Doudna Lab* [https://doudnalab.org/research\\_areas/crispr-systems/](https://doudnalab.org/research_areas/crispr-systems/).
134. Makarova, K. S. *et al.* An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* **13**, 722–736 (2015).
135. Koonin, E. V., Makarova, K. S. & Zhang, F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol* **37**, 67–78 (2017).
136. A passion for science. *NobelPrize.org* <https://www.nobelprize.org/>.
137. Chapman, J. R., Taylor, M. R. G. & Boulton, S. J. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell* **47**, 497–510 (2012).
138. Jiang, F. & Doudna, J. A. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu Rev Biophys* **46**, 505–529 (2017).

139. Cong, L. & Zhang, F. Genome engineering using CRISPR-Cas9 system. *Methods Mol. Biol.* **1239**, 197–217 (2015).
140. Zhang, C., Quan, R. & Wang, J. Development and application of CRISPR/Cas9 technologies in genomic editing. *Hum Mol Genet* **27**, R79–R88 (2018).
141. Koblan, L. W. *et al.* In vivo base editing rescues Hutchinson–Gilford progeria syndrome in mice. *Nature* **589**, 608–614 (2021).
142. Shalem, O., Sanjana, N. E. & Zhang, F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nat Rev Genet* **16**, 299–311 (2015).
143. Shalem, O., Sanjana N, Hartenian E, Shi X, Scott D, Mikkelsen T, Heckl D, Ebert B, Root D, Doench JG, and Zhang F. Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells. *Science* **343**, 84–87 (2014).
144. Joung, J., Konermann S, Gootenberg J, Abudayyeh O, Platt R, Brigham M, Sanjana E, and Zhang F. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening. *Nat Protoc* **12**, 828–863 (2017).
145. Wang, T., Wei, J. J., Sabatini, D. M. & Lander, E. S. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science* **343**, 80–84 (2014).
146. Sanjana, N. E., Shalem, O. & Zhang, F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods* **11**, 783–784 (2014).
147. Gu, W., Miller, S. & Chiu, C. Y. Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. *Annu Rev Pathol* **14**, 319–338 (2019).
148. Podnar, J., Deiderick, H., Huerta, G. & Hunicke-Smith, S. Next-Generation Sequencing RNA-Seq Library Construction. *Curr Protoc Mol Biol* **106**, 4.21.1-19 (2014).
149. Plateforme CRISP’edit TBMCORE | TBMCORE. <https://www.tbmcore.u-bordeaux.fr/crispedit/>.
150. Balwani, M. & Desnick, R. J. The porphyrias: advances in diagnosis and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2012**, 19–27 (2012).
151. Yien, Y. Y., Ducamp S, van der Vorm L., Kardone J., Manceau H, Kannengiesser C, Bergoniah H, Kafinaa M, Karim Z, Gouya L, Bakere T, Puy H, Phillips J, Nicolas G, and Pawa G. Mutation in human CLPX elevates levels of  $\delta$ -aminolevulinate synthase and protoporphyrin IX to promote erythropoietic protoporphyria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **114**, E8045–E8052 (2017).

## Résumé

La porphyrie érythropoïétique congénitale (PEC) est une maladie rare de transmission autosomique récessive, caractérisée par un déficit en uroporphyrinogène III synthase (UROS), la quatrième enzyme de la voie de biosynthèse de l'hème. Les découvertes récentes suggèrent l'existence de gènes modificateurs importants dans la PEC. L'identification de ces gènes et la connaissance des mécanismes cellulaires par lesquels ils seraient impliqués dans la PEC et la biosynthèse de l'hème sont essentiels afin d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques. La découverte de la technologie CRISPR-Cas9 a permis de réaliser des criblages génomiques rapides et efficaces en utilisant l'endonuclease Cas9 avec des banques d'ARNg, accélérant ainsi considérablement notre compréhension des processus pathologiques de nombreuses maladies.

L'objectif de ce projet est d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la modulation de la voie de biosynthèse de l'hème en transduisant des cellules saines et des cellules modélisant la maladie à l'aide de la librairie GeCKO (*Genome-Scale CRISPR Knock-Out*). Afin de réaliser le criblage, des lignées cellulaires exprimant la Cas9 ont été créées et les conditions d'expérimentation du tri cellulaire ont été définies en se basant sur le caractère fluorescent des cellules porphyriques. Les cellules d'intérêt seront par la suite sélectionnées et analysées génétiquement par NGS (*Next Generation Sequencing*). Les gènes et les mécanismes cellulaires identifiés pourront faire l'objet d'une thérapie ciblée de la PEC.

Mots clés : Porphyrie érythropoïétique congénitale, criblage génomique, CRISPR-Cas9.



## SERMENT DE GALIEN

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

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances,

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement,

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité,

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession,

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens,

De coopérer avec les autres professionnels de santé.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

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

Signature de l'étudiant

Nom :

Prénom :

du Président du jury

Nom :

Prénom :

## Résumé

La porphyrie érythropoïétique congénitale (PEC) est une maladie rare de transmission autosomique récessive, caractérisée par un déficit en uroporphyrinogène III synthase (UROS), la quatrième enzyme de la voie de biosynthèse de l'hème. Les découvertes récentes suggèrent l'existence de gènes modificateurs importants dans la PEC. L'identification de ces gènes et la connaissance des mécanismes cellulaires par lesquels ils seraient impliqués dans la PEC et la biosynthèse de l'hème sont essentiels afin d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques. La découverte de la technologie CRISPR-Cas9 a permis de réaliser des criblages génomiques rapides et efficaces en utilisant l'endonuclease Cas9 avec des banques d'ARNg, accélérant ainsi considérablement notre compréhension des processus pathologiques de nombreuses maladies.

L'objectif de ce projet est d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la modulation de la voie de biosynthèse de l'hème en transduisant des cellules saines et des cellules modélisant la maladie à l'aide de la librairie GeCKO (*Genome-Scale CRISPR Knock-Out*). Afin de réaliser le criblage, des lignées cellulaires exprimant la Cas9 ont été créées et les conditions d'expérimentation du tri cellulaire ont été définies en se basant sur le caractère fluorescent des cellules porphyriques. Les cellules d'intérêt seront par la suite sélectionnées et analysées génétiquement par NGS (*Next Generation Sequencing*). Les gènes et les mécanismes cellulaires identifiés pourront faire l'objet d'une thérapie ciblée de la PEC.

Mots clés : Porphyrie érythropoïétique congénitale, criblage génomique, CRISPR-Cas9.