UNIVERSITÉ BORDEAUX SEGALEN

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

Année 2012

Thèse n°1994

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Ecole doctorale

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement

Le 17 Décembre 2012

Par Yann DUCHARTRE

Né le 15 Mai 1986 à Libourne (33)

Biothérapies des porphyries érythropoïétiques :
thérapie cellulaire, thérapie génique et approche pharmacologique

Membres du Jury

M. le Pr Vincent Praloran (UMR 5164).....Président
M. le Pr Laurent Gouya (INSERM U773).....Rapporteur
Mme le Dr Anne Dubart-Kupperschmitt (INSERM U804).....Rapporteur
M le Dr Tuan Huy Nguyen (UMR 1064).....Examinateur
M le Dr Emmanuel Richard (INSERM U1035).....Directeur de thèse

Remerciements

Je remercie le Professeur de Verneuil de m'avoir accueilli dans son laboratoire

Je tiens à remercier le Professeur Praloran de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse.

Je remercie le Dr Dubart-Kupperschmitt et le Pr Gouya pour avoir accepté de juger mon travail de thèse en qualité de rapporteurs.

Je remercie également le Dr Nguyen d'avoir accepté de juger ce travail en qualité d'examinateur.

Je tiens particulièrement à remercier mon directeur de thèse, le Dr Emmanuel Richard pour m'avoir permis d'effectuer cette thèse. Je te remercie également pour ta disponibilité tout au long de la thèse malgré tes multiples activités (et il y en a !!) et je te souhaite bonne chance pour la suite même si je ne doute pas que tout ira pour le mieux.

Je remercie également François et Aurélie, mes copains de galère du week-end. Je n'emprunterai plus la radio, c'est promis. Merci pour toutes nos discussions et pour la bière à Phila, François !

Merci à Katia Obama et Isabelle Lamy pour toutes nos discussions et votre aide pour les commandes.

Je remercie Anne-Marie et Jocelyne pour la propreté des locaux ;-) mais surtout pour leur bonne humeur quotidienne (ou presque, pas vrai Anne-Marie) !!

Merci aux Isa Lamrissi-Garcia et Moranvillier pour votre aide en manip, pour les conseils en orthographe (LG), pour la participation au film de Prisca (M) et votre bonne humeur quotidienne.

Merci aux « Dermato » (Mumu, Cath, Sorilla) pour votre aide, les gâteaux verts (Mmm !) et les fous rires à la cafèt !

J'avais dis que je ne te remercierai pas… Mais je suis bien obligé car c'est sincère : MERCI Véro pour la bosse que j'ai toujours sur la tête !! Te souviens-tu du jour où, tel un Jackie Chan en furie (tu fais sa taille d'ailleurs ☺ !!), tu sautas de 2m50 pour shooter dans le portoir rempli que je tenais à bout de bras !! Tu me dois toujours quelques neurones et 2 miniprep perdues à jamais… Saches en tout cas que je ne remettrais plus jamais en doute tes capacités en arts martiaux. Je me console en pensant que je suis le premier et le seul pour le moment à avoir fait marcher Mme l'Arrache pendant une bonne semaine avec mon histoire au tribunal !! Merci à toi également pour tes conseils en clonage (j'en reviens pas que ça marche à chaque fois…), pour les paris sur les culots d'HEK tous les vendredis, les fraises tagadas, les fous rires pendant les tournages de fin de thèse et les petits délires au P2 qui resteront entre nous !!

Merci Alice pour ta gentillesse et ton sourire quotidien pendant ces 3 années. Il est tellement facile de travailler avec toi. Tu complètes parfaitement Véro !! Au fait, j'attends toujours mon gâteau au chocolat…

Un énorme MERCI à Jean-Marc pour avoir sauvé mes derniers week-ends !! Prisca te remercie également. Je te souhaite bon courage pour la suite et n'oublies pas : tu es responsable de l'azote maintenant !

Merci à toi Magalie pour ton aide précieuse au cours de ces 3 années que ce soit en bio mol ou en soutien psychologique au P2 (soutien mutuel je l'espère !).

Merci aux jeunots : Thibaud et Simon, les Dalton ne sont plus les mêmes sans vous. Merci pour les rigolades au labo ou dehors. Simon, mon frère jumeau mais pas des mêmes parents : tiens bon !! Et commence à écrire LE PLUS TOT POSSIBLE !!!

Miguel : D'abord un énorme FELICITATIONS pour ta réussite au concours. Mais continues à t'entraîner au lancé de boulettes de papier, parce que tu es loin d'être un champion… Merci pour nos pétages de plomb au P2 le vendredi soir ou les petites bières à la cafèt en revenant de courir… Saches en tout cas que tes tirades très fleuries à base de « bordel, putain, merde » et autres joyeusetés me manqueront… « Putainggg » !!

Marina, on ne dirait pas comme ça, mais tu es une véritable pub ambulante pour les kleenex ! Merci pour tous tes conseils dans la manipulations des ARN et ton soutien lors de l'écriture du manuscrit. Félicitations pour ton boulot et bon courage à Marseille !

Merci pour ton aide Marie pour les western blot, pour ton apprentissage d'Excel et pour les pastis (le gâteau !!) et le foie gras… Ta bonne humeur rafraîchissante et ton soutien dans les coups durs (et il y en a eu !!) sont un vrai + !! C'est un vrai bonheur d'avoir travaillé avec toi, je n'aurais pas pu souhaiter meilleure voisine de bureau !! Et la prochaine fois, si il y a une place de parrain, je suis preneur ☺ !!

Je remercie tous les membres du laboratoire U1035 pour votre bonne humeur, vos conseils et vos « films de fin de thèse ». Je n'aurais pas pu tomber mieux !

Je remercie également les copains de mon ancien labo, actuellement collègues de Prisca : Arnaud et Sylvaine pour les parties de rigolade pendant que l'on écrivait le manuscrit et pour les pauses Kinder Bueno ! Nadou pour le soutien qu'elle a apporté à pika et donc à moi-même indirectement et pour les soirées diététiques-McDo. Merci également à vous pour votre engagement et votre superbe prestation au film de Prisca.

Je remercie sincèrement mes parents et ma famille. Sans vous, je n'en serais pas arrivé là.

A ma Prisca

Merci pour ton soutien quotidien, tes coups de gueule pour me faire remonter la pente et ton amour inconditionnel quitte à passer tes dimanches soirs au labo avec moi. Saches que ce que nous vivons en ce moment :

Ce n'est pas la fin de nos thèses,
C'est le début de nouvelles aventures…

Table des matières

ABREVIATIONS 13

INTRODUCTION 17

PARTIE I : LES PORPHYRIES ERYTHROPOÏETIQUES

I-1) VOIE DE BIOSYNTHESE DE L'HEME ET PORPHYRIES 20

I-1) BIOSYNTHESE L'HEME 20
I-2) LES GENES DE LA BIOSYNTHESE DE L'HEME. 22
I-3) REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DE L'HEME 23
I-4) DEGRADATION DE L'HEME 25

I-2) LES PORPHYRIES ERYTHROPOÏETIQUES 25

I-3) LES PORPHYRIES ERYTHROPOÏETIQUES 27

I-3-1) LA PORPHYRIE HEPATOERYTHROCYTAIRE (PHE) 27
I-3-2) LA PORPHYRIE ERYTHROPOÏETIQUE CONGENITALE 27
a) Anomalie métabolique et description clinique de la PEC 27
b) Génétique moléculaire de la PEC 28
c) Présentation clinique de la PEC 29
d) Traitements symptomatiques 29
e) Modèles murins de PEC 30
I-3-3) LA PROTOPORPHYRIE ERYTHROPOÏETIQUE 33
a) Anomalie métabolique et description clinique de la PPE 33
b) Génétique moléculaire de la PPE 36
Cas de la protoporphyrie dominante liée à l'X 39
c) Traitements symptomatiques 40
e) Modèles murins de PPE 42

I-4) THERAPIES CELLULAIRE ET GENIQUE DES PORPHYRIES ERYTHROPOÏETIQUES 45

I- 4 - 1) THERAPIE CELLULAIRE DES PORPHYRIES ERYTHROPOÏETIQUES 45
a) Thérapie cellulaire de la PEC 45
b) Thérapie cellulaire de la PPE 48

I-4 - 2) THERAPIE GENIQUE DES PORPHYRIES ERYTHROPOÏETIQUES 50
a) Thérapie génique de la PEC 51
b) Thérapie génique de la PPE 54

PARTIE II : CELLULES IPS ET THERAPIE GENIQUE DES PORPHYRIES ERYTHROPOÏETIQUES

II- 1) LES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES (CELLULES ES) ... 63

II-1-1) LES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES MURINES 63
a) Historique 63
b) Les cellules ES murines 63
c) Culture et caractéristiques des cellules ES murines 64
II-1-2) CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES HUMAINES 66
a) Les cellules ES humaines 66
b) Culture et caractéristiques des cellules ES humaines 67
c) Les cellules ES humaines : science, éthique et législation. 70

II-2) LES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES INDUITES (IPS) 72

II-2-1) GENERATION ET CULTURE DES CELLULES IPS MURINES 72
II-2-2) GENERATION ET CULTURE DES CELLULES IPS HUMAINES 74
II-2-3) METHODES DE REPROGRAMMATION ET BIOSECURITE DES CELLULES IPS 75
a) Facteurs de reprogrammation 76
b) Méthodes de reprogrammation 80
II-2-4) BIOSECURITE DES CELLULES IPS 83
a) Cellules iPS : dark side of stem cells 83
b) Cellules iPS et thérapie génique 85

II-3) DIFFERENCIATION DES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES 87

II-3-1) DIFFERENCIATION DES CELLULES ES 87
II-3-2) DIFFERENCIATION DES CELLULES IPS 88
II-3-3) CAS PARTICULIER DE LA DIFFERENCIATION HEMATOPOÏETIQUE 90
a) Cellules souches plutipotentes murines et différenciation hématopoïétique 92
b) Cellules souches pluripotentes humaines et différenciation hématopoïétique 94
II-3-4) LA TRANSDIFFERENCIATION : LA FIN DES CELLULES SOUCHES ? 95

II-4) INTERETS ET POTENTIEL THERAPEUTIQUE DES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES 98

II-4-1) POTENTIELS THERAPEUTIQUES DES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES 98

PARTIE III : APPROCHE PHARMACOLOGIQUE DE LA PORPHYRIE ERYTHROPOÏETIQUE CONGENITALE

III-1) LES SYSTEMES DE DEGRADATION PROTEIQUE..... 106

III-1-1) LE SYSTEME UBIQUITINE-PROTEASOME..... 107

III-1-2) LE SYSTEME LYSOSOMAL..... 109

III-2) APPROCHE PHARMACOLOGIQUE DE LA PORPHYRIE ERYTHROPOÏETIQUE CONGENITALE..... 110

RESULTATS..... 115

PRESENTATION GENERALE.....116

RESULTATS 1 :..... 121

RESULTATS 2 :..... 126

RESULTATS 3 :..... 129

Matériels et Méthodes..... *131*

Résultats..... *143*

RESULTATS 4 :..... 167

DISCUSSION..... 199

I – PROTOPORPHYRIE ERYTHROPOÏETIQUE ET GREFFE DE MOELLE OSSEUSE..... 200

II – CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES INDUITES ET THERAPIE GENIQUE DES PORPHYRIES ERYTHROPOÏETIQUES..... 206

III – BIOTHERAPIE DE LA PORPHYRIE ERYTHROPOÏETIQUE CONGENITALE : UNE NOUVELLE APPROCHE THERAPEUTIQUE..... 215

Abréviations

α-MSH : α-melanocyte stimulating hormone

γ-GT : gamma-glutamyl transférase.

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire.

AGM : Aorto-Gonado-Mésonéphrotique.

ALA : Acide δ-aminolévulinique.

ALAS : Acide δ-aminolévulinique Synthase.

ALAT : Alanine Amino Transférase.

ALP : Alcaline Phosphatase.

ARNm : Acide RiboNucléique messager.

ASAT : Aspartate Amino Transférase.

BCNU : bis-chloroethylnitrosourea.

bFGF : basique Fibroblast Growth Factor (Facteur de croissance des fibroblastes - basique).

BIO : 6-bromoindirubin-3′-oxime.

BMP : Bone Morphogenetic Proteins.

CFC : Colony-Forming Cells.

CH : Coproporphyrie héréditaire.

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité (HLA en anglais).

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques.

EC : Embryonal Carcinoma Cells (cellules souches embryonnaires de carcinome).

eIF-2α : Eukaryotic Initiation Factor-2.

ERAD : Endoplasmic Reticulum-Associated protein Degradation.

ERK : Extracellular signal-regulated kinase.

ES (cells) : Embryonic Stem Cells (Cellules Souches Embryonnaires).

FACS : Fluorescence-Activated Cell Sorting.

FDA : Food and Drug Administration.

FECH : Ferrochélatase.

FIV : Fécondation in vitro.

Flt3-L : Fms-related Tyrosine kinase 3 Ligand.

GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase.

(E)GFP : (Enhanced) Green Fluorescent Protein.

GSK3 : Glycogen Synthase Kinase-3.

HAP-1 : Heme Activating Protein-1.

HEK : Human Embryonic Kidney.

HIF : Hypoxia-Inductible Factor.

HLA : Human Leucocyte Antigen (Complexe Majeur d'Histocompatibilité).

HO : Hème Oxygénase.

HRI : Heme-Regulated eIF-2α kinase.

Id : Inhibitor of Differentiation.

IL-3 : Interleukine 3.

iPS : induced Pluripotent Stem cells (cellules souches pluripotentes induites).

IRE : Iron Responsive Element.

IVG : Interruption Volontaire de Grossesse.

JAK : Janus-associated tyrosine Kinase.

KOSR : Knock Out Serum Replacement.

LAM-PCR : Linear Amplification-Mediated - Polymearse Chain Reaction.

LIF : Leukaemia Inhibitory Factor.

LTC-IC : Long-Term Culture Initiating Cells.

LTR : Long Terminal Repeat.

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase.

M-CSF : Macrophage Colony-Stimulating Factor.

MEF : Mouse Embryonic Fibroblasts (Fibroblastes embryonnaires murins).

Mfrn1 : Mitoferrin1.

MGMT : O6-benzylguanine-DNA-méthyle transférase.

MOI : Multiplicity Of Infection.

NK : Natural Killer (type de lymphocyte).

PAI : Porphyrie aiguë intermittente.

PBG : Porphobilinogène.

PCT : Porphyrie cutanée tardive.

PEC (ou CEP) : Porphyrie Erythropoïétique Congénitale (Congenital Erythropoietic Porphyria).

PGK : Phosphoglycérate kinase.

PHE : Porphyrie Hépatoérythrocytaire.

PPE (ou EPP) : Protoporphyrie Erythropoïétique (Erythropoietic Protoporphyria).

PPIX : Protoporphyrine IX.

PV : Porphyrie variegata.

ROS : Reactive Oxygen Species.

SCF : Stem Cell Factor.

SCID : Severe Combined ImmunoDeficiency (Syndrome de l'ImmunoDéficience Combinée Sévère).

SIN : Self-INactivated.

SNCT : Somatic-Cell Nuclear Transfert.

SSEA : stage-specific embryonic antigen.

STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription.

STO : Fibroblastes embryonnaires murins résistants à la 6-Thioguanine et à l'Ouabaïne (souris Sandos).

TPO : Thrombopoïétine.

UROD : Uroporphyrinogène Décarboxylase

UROS : Uroporphyrinogène III Synthase.

VEGF : Vascular Endothelium Growth Factor.

Introduction

Partie I

Les porphyries érythropoïétiques

I-1) Voie de biosynthèse de l'hème et porphyries

Les porphyries sont des affections héréditaires liées à un déficit enzymatique de la voie de biosynthèse de l'hème. Elles sont toutes caractérisées par une accumulation des précurseurs de l'hème (l'acide δ-aminolévulinique, le porphobilinogène) et/ou de porphyrines dans les tissus et les symptômes associés sont multiples et différents selon l'enzyme déficiente.

I-1) Biosynthèse l'hème

La biosynthèse de l'hème a lieu dans toutes les cellules de l'organisme mais se déroule principalement dans la moelle osseuse (plus de 85% de l'hème y est produit) et dans le foie (The Porphyrin Handbook, 2003). Elle est composée d'une suite de huit réactions enzymatiques se répartissant entre la mitochondrie et le cytoplasme (Figure 1).

1) La synthèse de l'hème débute dans la mitochondrie par la condensation d'une molécule de succinyl coenzymeA (succinyl CoA, participant au cycle de Krebs) et d'une molécule de glycine catalysée par l'acide δ-aminolévulinique synthase (ALA-synthase ou ALAS) pour générer de l'acide δ-aminolévulinique (ALA).

2) L'ALA-déshydrase (ou porphobilinogène synthase) permet, après transit de l'ALA vers le cytosol, de combiner deux ALA pour former le dérivé pyrrole porphobilinogène (PBG).

3) Puis l'enzyme porphobilinogène déaminase (PBG déaminase ou uroporphyrinogène I synthase) catalyse la condensation de quatre PBG en l'hydroxyméthylbilane (HMB).

4) Ce composé intermédiaire peut ensuite donner naissance à deux produits différents : l'uroporphyrinogène III (URO III) ou l'uroporphyrinogène I (URO I). Le premier est obtenu par une inversion du quatrième pyrrole et une cyclisation. Cette réaction enzymatique est catalysée par l'uroporphyrinogène III synthase (UROS). En l'absence d'UROS, l'URO I est généré par une cyclisation spontanée de l'HMB. Il peut ensuite être métabolisé en uroporphyrine I ou coproporphyrinogène I ; eux-mêmes susceptibles d'être convertis en coproporphyrine I (COPRO I). Toutes les porphyrines de type I sont des impasses métaboliques, incapables de participer au cycle de synthèse de l'hème et s'accumulent dans la cellule engendrant les symptômes observés dans la Porphyrie Erythropoïétique Congénitale ou PEC).

5) L'URO III subit ensuite quatre décarboxylations de ses résidus acétyles catalysées par l'uroporphyrinogène décarboxylase pour former le coproporphyrinogène III (COPRO III).

6) Cet intermédiaire est transporté dans la mitochondrie où deux de ses résidus propionyles sont oxydés puis décarboxylés en résidus vinyles. Cette réaction est catalysée par la coproporphyrinogène III oxydase et conduit à la formation de protoporphyrinogène IX.

7) Puis la protoporphyrinogène IX oxydase catalyse la réaction d'oxydation du protoporphyrinogène IX en protoporphyrine IX (PPIX).

8) La dernière étape est catalysée par la ferrochélatase et permet l'incorporation d'un atome de fer réduit Fe^{2+} au sein de la protoporphyrine IX générant ainsi une molécule d'hème.

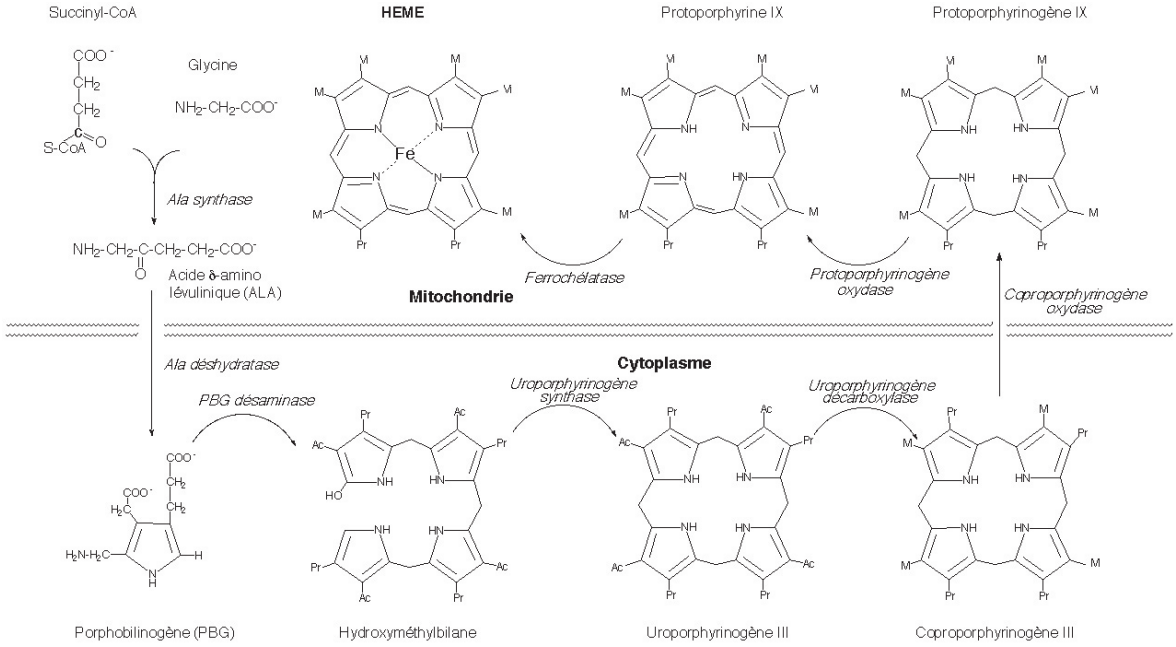


Figure 1. Voie de biosynthèse de l'hème. La voie de biosynthèse de l'hème est constituée de huit étapes, chacune catalysée par une enzyme localisée dans la mitochondrie ou dans le cytoplasme. Chaque porphyrie correspond à un déficit de l'une de ces enzymes.

Bien que la dernière étape de cette voie de biosynthèse se fasse dans la mitochondrie, l'hème est ensuite transporté dans le cytosol pour se lier à des protéines et former ainsi les hémoprotéines (Taketani *et al*. 2005). Une hémoprotéine est donc l'association d'une partie protéique, l'apoprotéine et d'un groupement prosthétique, l'hème. L'hème est le groupement prosthétique de nombreuses hémoprotéines impliquées dans des fonctions variées : le transport de gaz (hémoglobine, myoglobine, …), le transfert d'électrons (cytochrome b et c), la détoxification au niveau hépatocytaire (cytochromes microsomaux b5 et P450), dégradation/métabolisme de différents composés (catalase et des peroxydases) (Tsiftsoglou *et al*. 2006).

L'hème possède également des fonctions régulatrices directes ou indirectes sur l'expression de nombreux gènes. Il induit l'accumulation de globine par stabilisation de son ARNm notamment dans la lignée érythroïde au cours de l'érythropoïèse où le besoin en hémoglobine est le plus important (Ross et Sautner, 1976). Il induit également la transcription des gènes CYC-1p et CYC-2p codant pour des enzymes respiratoires chez la levure (cytochrome c). Pour cela, l'hème se lie au facteur de transcription HAP-1 (Heme Activating Protein-1) et stimule sa fixation sur les séquences génomiques régulatrices de ces deux gènes. L'hème est également capable de se fixer sur la protéine HRI (heme-regulated eIF-2α kinase) dont l'une des fonctions est la phosphorylation inactivatrice du facteur eIF-2α (Eukaryotic Initiation Factor-2). eIF-2α est essentiel à l'initiation de la traduction. L'inhibition de HRI dans des cellules érythroleucémiques murines entraîne donc l'accumulation d'hémoglobine et une augmentation de la prolifération après induction de la différenciation érythroïde au diméthyl-sulfoxide (Crosby *et al*. 2000).
L'hème est également impliqué dans le contrôle des gènes qui interviennent sur sa propre synthèse ainsi que sur sa dégradation.

I-2) Les gènes de la biosynthèse de l'hème.

Tous les gènes codant pour les enzymes de la voie de biosynthèse de l'hème sont uniques excepté le gène codant pour l'ALAS où deux gènes ont été décrits. Ils sont tous dispersés à travers le génome mais possèdent une expression coordonnée lors de l'érythropoïèse (Tableau 1).

Les deux gènes de l'ALAS sont situés sur deux chromosomes différents et ne codent pas pour la même protéine. L'expression de ALAS1 est ubiquitaire tandis que ALAS2 s'exprime exclusivement dans le compartiment érythropoïétique.
L'ALAD, la PBGD et l'UROS possèdent également une expression différentielle selon le tissu : un promoteur d'expression ubiquitaire et un d'expression érythroïde (Bishop *et al*. 1996 ; Sassa *et al*. 1990 ; Aizencang *et al*. 2000).

Le promoteur du gène codant pour ALAS2 ainsi que les promoteurs érythroïdes des gènes codant pour l'ALAD, PBGD et UROS possèdent des séquences régulatrices en *cis* reconnues par des facteurs de transcription érythroïde-spécifiques (GATA-1, NF-E2) permettant une expression différentielle dans le compartiment érythroïde (Taketani, 2005).
UROD, COPROX ainsi que FECH sont exprimées sous le contrôle d'un gène unique possédant un seul promoteur. Cette dernière enzyme possède deux ARNm qui diffèrent dans

leur partie 3' non codante par l'utilisation de deux signaux de polyadénylation différents. L'activité transcriptionnelle de ces gènes augmente de façon coordonnée au cours de la différenciation érythropoïétique (Fujita *et al*. 1991 ; Taketani *et al*. 1995).

Enzyme	Gène	Structure du gène	Séquence codante (pb)	Localisation chromosomique
ALA synthase	ALAS 1	22 kb, 11 exons	1920	3p21
	ALAS 2	22 kb, 11 exons	1764	Xp11,21
ALA déshydratase	ALAD	13 kb, 12 exons	993	9q34
PBG déaminase	PBGD	10 kb, 15 exons	1032/1083	11q24
URO III synthase	UROS	34 kb, 10 exons	798	10q25-26
Uroporphyrinogène décarboxylase	UROD	3 kb, 10 exons	1104	1p34
Coproporphyrinogène oxydase	COPROX	14 kb, 7 exons	1065	3q12
Protoporphyrinogène oxydase	PROTOX	5,5 kb, 13 exons	1434	1q2-23
Ferrochélatase	FECH	45 kb, 11 exons	1272	18q21

Tableau 1. Enzymes et gènes de la voie de biosynthèse de l'hème.

I-3) Régulation de la biosynthèse de l'hème

L'ALAS joue un rôle central dans la régulation de la synthèse de l'hème tant au niveau du foie que du système érythropoïétique.

L'ALAS contrôle la première étape de la voie de biosynthèse de l'hème qui est également l'étape limitante dans le foie. En effet, l'ALAS1 subit une régulation de son expression à différents niveaux. Un rétrocontrôle négatif de la part de l'hème s'effectue au niveau post-transcriptionnel en diminuant la stabilité de son ARNm et au niveau post-traductionnel en inhibant son transport du cytosol vers la mitochondrie (Munakata *et al*. 2004). Ce mécanisme est utilisé lors du traitement de crises aiguës de porphyries hépatiques. Les patients reçoivent de l'hème arginate (Normosang®) qui va bloquer la voie de biosynthèse de l'hème dans le foie, stoppant ainsi l'accumulation de l'ALA et du PBG et/ou de porphyrines.

Dans les cellules érythroïdes, les enzymes de la voie de biosynthèse de l'hème sont globalement exprimées à un taux élevé du fait de la présence de promoteurs érythroïde-spécifiques précédemment décrits, afin d'assurer la production d'hémoglobine. Le fer étant un des composants de l'hème, sa concentration et son métabolisme sont contrôlés parallèlement à ceux de l'hème. La plus grande proportion du fer présent dans les érythrocytes est incorporée

à l'hème (contrairement au fer présent dans les hépatocytes où 30 à 50% seulement sert à la biosynthèse de l'hème - Taketani, 2005). Les ARNm de l'ALAS2 ainsi que de la ferritine possèdent des séquences IRE (Iron Responsive Element) où se fixe une protéine régulatrice IRP (Iron Responsive Protein). En cas de manque de fer, la protéine IRP est active, se lie aux ARNm de l'ALAS2 et de la ferritine afin de bloquer leurs traductions (Figure 2). IRP se lie également à l'ARNm du récepteur de la transferrine, transporteur du fer, afin de le stabiliser et le protéger contre les nucléases : l'expression du récepteur de la transferrine est donc augmentée afin de favoriser l'apport de fer dans les érythrocytes. En cas d'excès de fer et pour éviter une toxicité cellulaire, IRP est inactivée. Les traductions de ALAS2 et la ferritine sont opérationnelles ce qui relance la voie de biosynthèse de l'hème et le stockage du fer libre. Parallèlement, l'ARNm du récepteur de la transferrine n'est plus stabilisé et rapidement dégradé ce qui inhibe son expression (Taketani, 2005). L'hème lui aussi, contrôle l'apport intracellulaire en fer : il empêche l'endocytose des complexes fer-transferrine-récepteur et inhibe la dissociation du fer et de la transferrine après l'internalisation du complexe (Ponka, 1999).

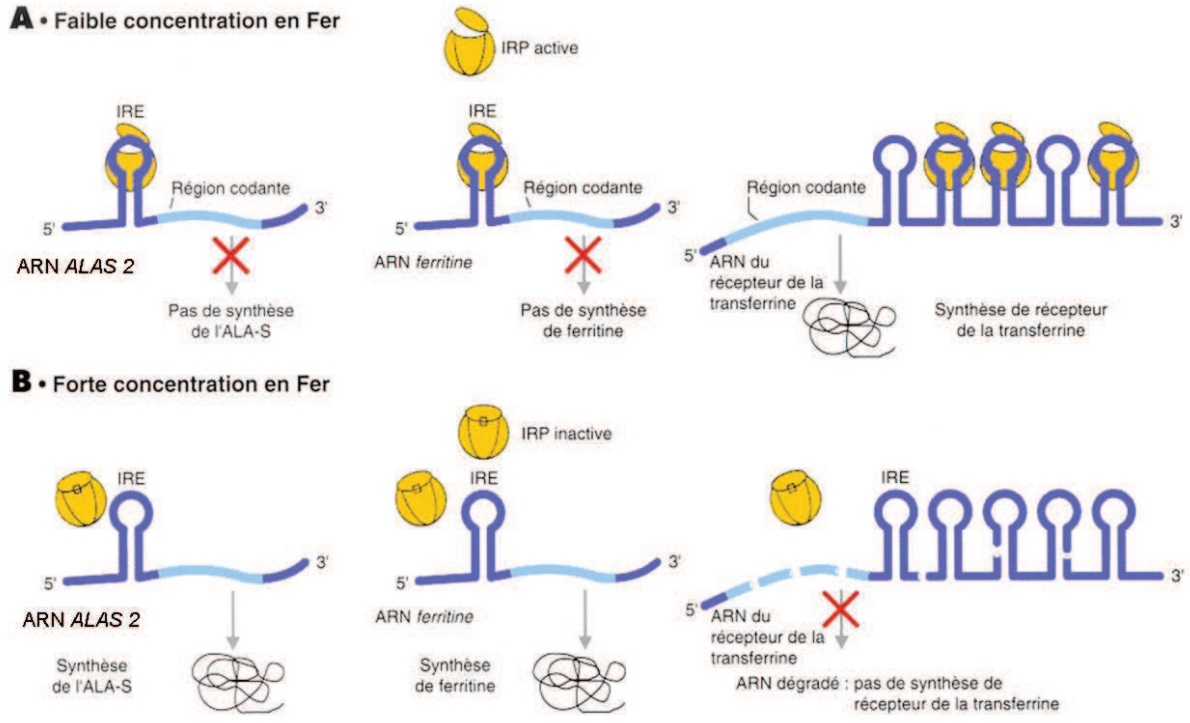


Figure 2. Régulation post-transcriptionnelle de l'expression de l'ALAS2, de la ferritine et de la transferrine par le fer dans les érythrocytes (Modifié d'après de Verneuil *et al*. 1995).

I-4) Dégradation de l'hème

La grande majorité de l'hème provient des érythrocytes (~85%) et 15% du foie et des autres tissus. La dégradation des érythrocytes a principalement lieu au niveau de la rate où les cellules vieillissantes sont filtrées et dégradées par des macrophages. L'hème libéré lors de cette dégradation, est catabolisé par l'hème oxygénase (HO) qui ouvre le noyau tétrapyrrolique et libère du monoxyde de carbone, le fer Fe^{2+} et la biliverdine. La biliverdine est ensuite réduite par la biliverdine réductase qui forme la bilirubine. La bilirubine est liée dans le plasma à l'albumine pour être acheminée dans les hépatocytes où elle sera conjuguée par la bilirubine-UDP-glucuronosyl-transférase et finalement excrétée dans la bile. Son hydrolyse par les bactéries intestinales conduit à son élimination majoritairement dans les selles. Le fer, quant à lui, est exporté hors du macrophage vers le plasma par la ferroportine. Il est oxydé par la céruloplasmine en Fe^{3+}. Sous cette forme, il est pris en charge par la transferrine qui le transporte jusqu'à la moelle osseuse pour retourner dans un cycle de biosynthèse.

I-2) Les porphyries érythropoïétiques

Les porphyries sont communément répertoriées selon les tissus les plus affectés par l'accumulation de précurseurs de l'hème et/ou de porphyrines. Nous retrouvons donc les porphyries sous deux nominations : les porphyries hépatiques affectant principalement le foie et les porphyries érythropoïétiques dont les symptômes sont dus à un déficit enzymatique dans le compartiment hématopoïétique (et plus précisément dans le compartiment érythropoïétique).

Classification	Maladie	Déficit enzymatique	Symptômes	Transmission
Porphyries hépatiques	Anémie Sidéroblastique liée à l'X	ALAS	Anémie sidéroblastique	Lié à l'X
	Porphyrie en déficit en ALAD	ALAD	Neuroviscéral	Récessif
	Porphyrie Aigüe Intermittente	PBGD	Neuroviscéral	Dominant
	Coproporphyrie Héréditaire	CPO	Neuroviscéral Photosensibilité	Dominant
	Porphyrie *variegata*	PPO	Neuroviscéral Photosensibilité	Dominant
	Porphyrie Cutanée Tardive	UROD	Photosensibilité	Dominant
	Porphyrie Hépatoérythrocytaire		Photosensibilité Anémie hémolytique	Récessif
Porphyries érythropoïétiques	Porphyrie Erythropoïétique Congénitale	UROS	Photosensibilité Anémie hémolytique	Récessif
	Protoporphyrie Erythropoïétique	FECH	Photosensibilité	Dominant ou récessif
	Protoporphyrie Erythropoïétique Dominante liée à l'X	ALAS	Photosensibilité	Dominant

Tableau 2. Classification des porphyries héréditaires humaines.

Les porphyries secondaires ou acquises regroupent un certain nombre d'affections ayant pour conséquence une accumulation de porphyrines ou de précurseurs. Elles sont causées par une inhibition des enzymes de la voie de biosynthèse de l'hème suite à une intoxication aux métaux lourds. La plus commune est l'intoxication au plomb (saturnisme) entraînant une anémie sidéroblastique secondaire où les érythroblastes présentent des ponctuations basophiles caractéristiques. L'anémie est causée par une hémolyse ; les signes cliniques sont des douleurs abdominales et musculaires, une atteinte du système nerveux central et/ou périphérique pouvant entraîner une paralysie, une hypertension artérielle. Le plomb inhibe préférentiellement l'ALA déshydrase, la coproporphyrinogène oxydase et la ferrochélatase.

I-3) Les porphyries érythropoïétiques

I-3-1) La porphyrie hépatoérythrocytaire (PHE)

La porphyrie hépatoérythrocytaire (PHE) est une forme de porphyrie rare résultant d'un déficit de plus de 90% de la cinquième enzyme de la voie de biosynthèse de l'hème : l'uroporphyrinogène décarboxylase (UROD, EC 4.1.1.37) (Figure 1). La PHE est causée par un homo- ou hétéro-allélisme d'une mutation sur le gène de l'UROD. Elle est considérée comme la forme homozygote de la porphyrie cutanée tardive (PCT) familiale. Depuis le premier cas en 1969 en Espagne, environ 34 cas de PHE ont pu être recensés (Puy *et al*. 2010). Une quinzaine de mutations du gène UROD localisé sur le chromosome 1p34 (Dubart *et al*. 1986) ont été associées à la maladie (Phillips *et al*. 2007 ; To-Figueras *et al*. 2011). Cette maladie rare de transmission autosomique récessive est associée à des symptômes cutanés (vésicules bulleuses après exposition lumineuse) et hématologiques (anémies) qui se manifestent dès l'enfance.

I-3-2) La Porphyrie Erythropoïétique Congénitale

a) Anomalie métabolique et description clinique de la PEC

La Porphyrie Erythropoïétique Congénitale (PEC) est une porphyrie de transmission autosomique récessive. Environ 200 cas ont été répertoriés depuis le premier cas rapporté en 1874 par le Dr J.H. Schultz (prévalence estimée de 1 personne sur 2 à 3 millions – Centre Français des Porphyries www.porphyrie.net). La PEC est une maladie causée par un déficit de la quatrième enzyme de la voie de biosynthèse de l'hème : l'uroporphyrinogène III synthase (EC 4.2.1.75) dont le gène est localisé sur la région chromosomique 10q25.3 → 10q25.6 (Astrin *et al*. 1991). Un déficit en UROS entraîne l'accumulation de précurseurs non métabolisables de l'hème (uroporphyrinogène et coproporphyrine de type I) (Figure 1). Hans Günther est le premier en 1911 à reconnaître les porphyries comme des maladies congénitales du métabolisme. La PEC est panethnique, différents cas ayant été rapportés en Europe, en Asie, en Afrique ainsi qu'en Amérique et ceci sans distinction de sexe (Fritsch *et al*. 1997).

Les deux principaux symptômes de la PEC sont la phototoxicité et l'anémie hémolytique. La déficience en UROS provoque l'accumulation de porphyrines de types I (uroporphyrine et coproporphyrine de type I) dans les tissus. Ces composés photosensibles

génèrent des radicaux oxygénés libres sous l'effet des rayonnements ultraviolets, affectant les lipides membranaires et provoquant une lyse cellulaire (Goldstein BD *et al*. 1972 ; Poh-Fitzpatrick *et al*. 1985). Des lésions apparaissent partout où les porphyrines sont soumises à un rayonnement (peau des mains, du visage…) mais sont également responsables de lésions dans d'autres tissus (foie, système nerveux central, œil…). L'accumulation d'uroporphyrine I dans les érythrocytes entraîne une hémolyse rapide. Les cellules érythroïdes sont éliminées par la rate entraînant une anémie qui peut varier en sévérité selon les patients (Ged *et al*. 2009).

La maladie présente une grande hétérogénéité tant dans le début des symptômes que dans leur sévérité. La maladie a été décrite dans des cas dès le stade de fœtus (présentant une anémie hémolytique importante et un hydrops fœtal avec parfois décès *in utero*) tandis que certains patients ne déclarent une photosensibilité cutanée qu'à l'âge adulte (de Verneuil *et al*. 1995 ; Desnick, 2002). Cette hétérogénéité phénotypique est due à plusieurs facteurs dont l'activité résiduelle de l'UROS, le degré d'hémolyse et la stimulation de l'érythropoïèse qui en découle et l'exposition aux rayons ultraviolets.

b) Génétique moléculaire de la PEC

Une quarantaine de mutations à l'origine d'un défaut de l'UROS ont pu être recensées depuis la description de la maladie (Fortian *et al*. 2011). La majorité sont des mutations faux sens (25 mutations), les autres étant composées de mutations non sens, d'insertion, de délétions… (Ged *et al*. 2009). Si certaines mutations n'entraînent qu'une faible diminution de l'activité enzymatique, d'autres diminuent dramatiquement l'activité enzymatique et conduisent à des phénotypes sévères (C73R, H173Y, T228M, P248Q… Xu *et al*. 1995 ; Fontanellas *et al*. 1996 ; Warner *et al*. 1992 ; Ged *et al*. 2004 ; Ged *et al*. 2009). Ceci n'explique pourtant que partiellement la différence d'expressivité de la maladie selon les patients car une même mutation peut causer une grande variété de phénotypes : ainsi plusieurs individus de la même famille atteints de la même mutation présentent des phénotypes très variable (Ged *et al*. 2004). La mutation S47P remplaçant une sérine en position 47 par une proline cause un déficit important de l'UROS (2,8% d'activité résiduelle). Sur les cinq membres de la famille portant la mutation à l'état homozygote, quatre sont malades et ont développé une photosensibilité cutanée sévère ainsi qu'une porphyrinurie massive. Le cinquième membre, malgré son état homozygote S47P/S47P, n'a jamais développé de symptôme cutané ou hématologique bien que l'activité de l'UROS soit dramatiquement

diminuée comme dans le reste de sa famille. Il n'est pas porteur d'autres pathologies qui aurait pu permettre de diminuer la production de porphyrines (drépanocytose, thalassémie ou dysérythropoïèse). L'ALAS2 étant l'enzyme limitante de la voie de biosynthèse de l'hème, une dérégulation du gène codant pour cette enzyme est envisageable, des mutations ayant déjà été observées dans ce gène (To-Figueras *et al*. 2011). Le mécanisme de protection contre l'accumulation des porphyrines chez cette personne n'a pour le moment pas été découvert. Cette diversité de pénétrance de la maladie a pu être mise en évidence selon les mutations impliquées dans le déficit d'UROS (Desnick *et al*. 2002) mais également au sein d'une famille dont les individus présentaient la même mutation (Ged *et al*. 2004).

c) Présentation clinique de la PEC

La maladie débute dès le plus jeune âge par une photosensibilité cutanée sévère. Les nouveau-nés exposés à la lumière du jour voient leur peau se couvrir d'éruptions bulleuses entraînant un risque d'infection, des cicatrices, des ulcérations et sévères mutilations dans le cas d'une photoprotection et d'un traitement antibiotique inadéquats. Les porphyrines de type I s'accumulent dans les fèces et dans l'urine la rendant rouge foncée (porphyrinurie) facilement détectables sous une lampe de Wood. Le diagnostic est posé par le dosage de ces composés. L'abondance de ces porphyrines dans les globules rouges entraîne leur destruction prématurée par la rate et parfois un défaut d'érythropoïèse. L'accumulation de porphyrines dans ces cellules permet de repérer ces cellules par cytométrie de flux (rayonnement intense dans le rouge quand ils sont excités avec une longueur d'onde de 400nm). Ils sont alors appelés fluorocytes. Les patients sont souvent anémiés de part l'hémolyse importante conduisant généralement à une splénomégalie. Ces symptômes nécessitent des transfusions sanguines répétées et parfois une splénectomie afin de diminuer l'hémolyse. L'anémie hémolytique et les lésions cutanées mutilantes entraînent parfois le décès du malade au début de l'âge adulte. Plus rarement, les patients atteints de PEC peuvent présenter des atteintes oculaires (conjonctivites, kératites, nécrose sclérale,…), une hypertrichose et souvent une érythrodontie (Oguz *et al*. 1993 ; Kurihara *et al*. 2001 ; Desnick *et al*. 2002).

d) Traitements symptomatiques

Les traitements sont le plus souvent symptomatiques. Ils consistent à éviter toute exposition aux rayonnements ultraviolets pour éviter les lésions cutanées. Parfois, une prise de bêta-carotène permet une amélioration de la photosensibilité cutanée (Mathews-Roth *et al*. 1993). Les caroténoïdes sont des pigments ayant la capacité de lier l'oxygène. Des données contraires existent concernant le β-carotène, qui est efficace comme traitement préventif pour la photosensibilité de la protoporphyrie érythropoïétique mais semble moins actif dans le cas de la PEC bien que d'autres résultats montrent une amélioration de la photosensibilité grâce à son utilisation à forte concentration (1000µg/100ml de sérum - Eriksen *et al*. 1974 ; Todd *et al*. 1994 ; Fritsch, 1997). Les infections consécutives aux lésions cutanées doivent être traitées par antibiotiques rapidement pour prévenir les cicatrices et mutilations. L'hémolyse peut être réduite par des transfusions sanguines fréquentes (toutes les 2 à 4 semaines) et permet de diminuer l'érythropoïèse et donc la production de porphyrines et la photosensibilité. Une splénectomie est parfois pratiquée afin de réduire l'anémie hémolytique ainsi que les besoins en transfusions associés (Piomelli *et al*. 1986). L'administration de déféroxamine permet de réduire la surcharge en fer inhérente aux transfusions sanguines répétées (Poh-Fitzpatrick *et al*. 1988). Un traitement à base d'hydroxyurée permet de réduire l'érythropoïèse et donc la production de porphyrines par la moelle osseuse diminuant ainsi les besoins en transfusions sanguines (Guarini *et al*. 1994). Le charbon actif peut contribuer à lier les porphyrines et diminuer leur concentration plasmatique (Tanigawa *et al*. 1994).

e) Modèles murins de PEC

Les porphyries érythropoïétiques ne sont pas des maladies exclusivement humaines. Elles sont également retrouvées à l'état naturel chez différentes espèces animales : bœuf, porc, écureuil, perroquet et chat dans le cas de la PEC. La forme bovine est rare et présente une transmission autosomique récessive (Levin *et al*. 1968). Elle présente le même profil clinique que la maladie humaine avec un déficit de l'activité de l'UROS et un taux élevé de porphyrines de type I excrétées dans les urines. Une PEC de transmission autosomique dominante a été retrouvée chez le chat domestique (Glenn *et al*. 1968 ; Giddens *et al*. 1975) ainsi que chez le porc (Clare et Stephens, 1944). Ces animaux présentent un dépôt d'uroporphyrine de type I dans les dents, les os, les érythrocytes et les fèces.

L'écureuil fauve (*sciurus niger*) présente naturellement une forte concentration d'uroporphyrine I dans son sang, ses os, ses dents, sa moelle osseuse, ses urines et surtout sa rate (probablement à cause de la lyse d'érythrocytes surchargés en porphyrines).

Contrairement à l'homme et au bovin, l'écureuil fauve, bien que possédant une activité de l'UROS déficiente, ne développe pas de photosensibilité ni d'anémie hémolytique (Levin et Flyger, 1973).

Aucun des animaux déclarant une PEC naturellement n'étant utilisable en laboratoire, un modèle murin a été généré au laboratoire. La première approche a consisté à créer des souris KO pour le gène de l'*Uros* (*Uros*^{del}). Mais les embryons homozygotes ne sont pas viables et meurent dès les premières étapes du développement embryonnaire (blastocyste) (Bensidhoum *et al*. 1998). Afin de modéliser les symptômes chez les patients, il est nécessaire de conserver une activité enzymatique de l'UROS minimale. Pour cela, une mutation ponctuelle P248Q a été générée au laboratoire par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires (cellules H1ES) (Ged *et al*. 2006). Elle est située dans l'exon 10 du gène *Uros*. Cette mutation provoque chez les patients comme dans les souris homozygotes un phénotype sévère et une profonde déficience enzymatique (1% d'activité). Ce déficit entraîne l'accumulation de porphyrines dans la moelle osseuse, le foie, la rate, les globules rouges, l'urine et les fèces avec une prédominance de l'uroporphyrine de type I (99,5%). L'anémie, causée par une hémolyse importante, n'empêche pas le développement normal des souris et ne modifie pas leur comportement. L'examen hématologique révèle la présence de fluorocytes dans la fraction des réticulocytes des globules rouges (10 à 30% de fluorocytes). Les souris présentent une hépato-splénomégalie et une érythrodontie. L'exposition aux rayons UV cause des lésions cutanées moyennes sans infection ou cicatrice (Figure 3).

Un autre modèle murin de PEC a également été généré par recombinaison homologue la même année (Bishop *et al*. 2006). Trois mutations faux sens différentes ont été introduites par recombinaison homologue dans des cellules ES. La mutation C73R, la plus retrouvée chez les patients, conduisant à un phénotype sévère ; la mutation V99A, située sur l'exon 5, entraînant un phénotype moyen et la mutation synthétique V99L (ayant une activité résiduelle de 0,24%, 5,9% et 14,8% respectivement). Les souris homozygotes pour ces mutations meurent au stade fœtal sauf celles comportant un concatémère apparu fortuitement et composé d'un triplet de la construction comportant la mutation V99A appelé V99AT. Cette mutation résulte d'une activité de l'Uros inférieure à 2% de l'activité de l'enzyme WT dans le foie et environ 20% dans les érythrocytes. Les souris V99AT/V99AT ou C73R/V99AT présentent les caractéristiques biochimiques et phénotypiques de la PEC : accumulation systémique de porphyrines, érythrocytes périphériques fluorescents (fluorocytes),

érythrodontie, splénomégalie variable et anémie hémolytique non sévère. Les souris développent également une photosensibilité cutanée caractéristique après administration d'acide δ-aminolévulinique (provoquant une saturation de la voie de biosynthèse de l'hème et une accumulation de porphyrines de type I).

Trois modèles murins de PEC (de génotypes C73R/C73R, C73R/V99L, V99L/V99L) ont été obtenus par recombinaison homologue dans des cellules ES 129/OLA et croisement d'animaux hétérozygotes. Le phénotype des souris C73R/C73R est très sévère, tout comme dans la maladie humaine. Une forte mortalité *in utero* est observé et seuls 12% des souris parviennent jusqu'au sevrage. Les souris homozygotes pour la mutation C73R qui parviennent à l'âge adulte ont une durée de vie normale malgré une accumulation de porphyrines de type I importante dans les érythrocytes, le foie et la rate (corrélées avec de faibles activités enzymatiques de l'Uros dans ces tissus) entraînant une photosensibilité cutanée importante. Les souris présentent une anémie hypochrome et microcytaire importante ainsi qu'une splénomégalie et une hépatomégalie. Les souris de génotypes C73R/V99L et V99L/V99L ont un phénotype moins sévère en accord avec l'activité enzymatique de l'Uros dans les érythrocytes et le foie 10 et 20 fois plus élevées respectivement que dans les souris homozygotes C73R). L'accumulation des porphyrines de types I est moins importante réduisant les lésions cutanées lors d'une exposition aux rayons UV (Bishop *et al*. 2011).

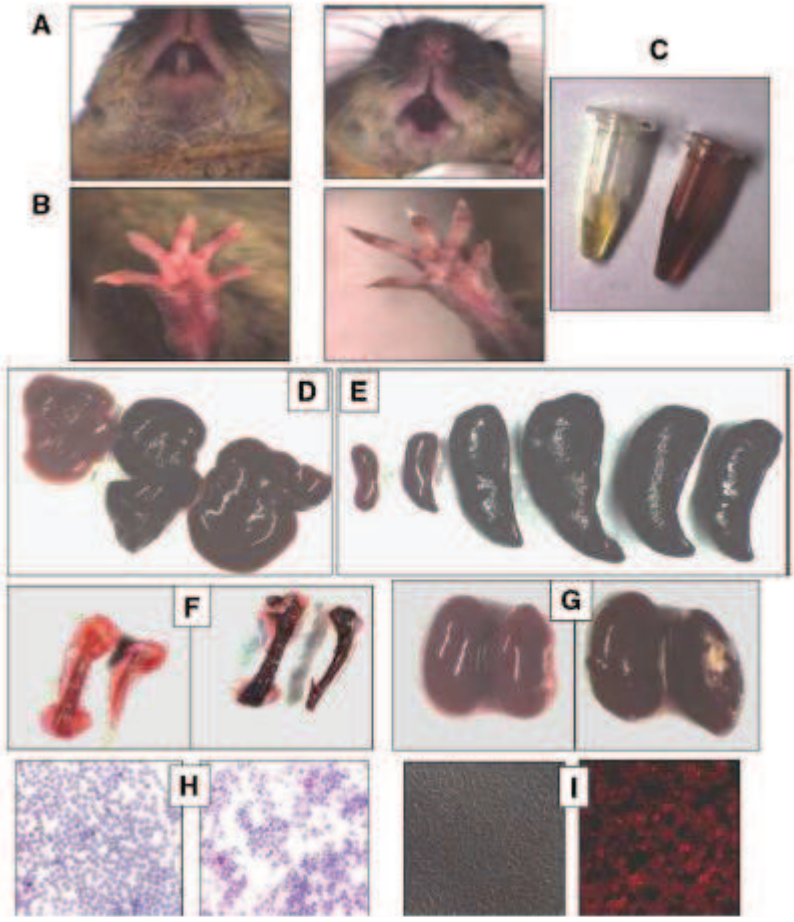


Figure 3. Caractéristiques cliniques du modèle murin de PEC (P248Q). Erythrodontie (A), décoloration des extrémités engendrée par l'anémie (B), porphyrinurie (C), hépatomégalie (D) et splénomégalie (E). Coloration rouge-brune du foie, de la rate, des os (F) ainsi que des reins (G). L'examen hématologique révèle une variété de taille des globules rouges (anisocytose), de pigmentation (polychromasie) (H) et une importante décoloration (hypochromie). Les UV permettent de révéler la présence de nombreux fluorocytes dans le sang des souris PEC (I). Souris ou organes WT à gauche, PEC à droite. D'après Ged *et al*. 2006.

I-3-3) La Protoporphyrie Erythropoïétique

a) Anomalie métabolique et description clinique de la PPE

La Protoporphyrie Erythropoïétique (PPE) est une porphyrie érythropoïétique à caractère autosomique pseudodominant (majoritairement) mais peut être récessive (dans 4% des cas – Gouya *et al*. 2006). Elle a été décrite tardivement par rapport aux autres porphyries puisque le premier cas a été rapporté en 1953 par Kosenow et Treibs en 1953 et complété en 1961 par Magnus et collaborateurs (Kosenow et Treibs, 1953 ; Magnus *et al*. 1961). La PPE est causée par un déficit partiel en ferrochélatase (dernière enzyme de la voie de biosynthèse de l'hème, FECH : EC 4.99.1.1) qui catalyse l'insertion d'un atome de fer réduit Fe^{2+} au

centre du tétrapyrrole de la protoporphyrine IX (PPIX) pour former l'hème. La PPE peut également se déclarer suite à une mutation gain de fonction du gène *ALAS2* entraînant un emballement de la voie de biosynthèse de l'hème saturant le FECH (Whatley *et al*. 2008). La PPE a été rapportée dans le monde entier avec une prévalence 0,9/100 000 (Prévalence des maladies rares, Orphanet, Mai 2012).

La PPE est une maladie entraînant des atteintes diverses selon les individus mais caractérisées par une photosensibilité cutanée importante et précoce, une atteinte hématologique faible ou inexistante et des dommages hépatiques graves dans environ 5% des cas.

Symptômes cutanés

La caractéristique clinique majeure de la protoporphyrie érythropoïétique est la photosensibilité cutanée. Elle se déclare habituellement dès la petite enfance après la première exposition au soleil. La peau exposée déclenche une sensation de brûlure chez le malade pendant et après l'exposition entraînant des érythèmes et des démangeaisons. La sensation douloureuse varie en durée et en intensité selon la durée et le niveau d'exposition à la lumière. Les lésions cutanées évoluent généralement vers une guérison rapide sans cicatrice mais peuvent parfois se compliquer en lésions scléclodermiformes autour des lèvres et épaississements persistant de la peau avec des plis cutanés profonds (Schmitt *et al*. 2010). Contrairement à la PEC, il n'y a que très exceptionnellement apparition de lésions bulleuses et d'érosion et peu de cicatrices (Lecha *et al*. 2009). Une hyperpigmentation apparaît rarement et seulement chez les patients présentant une atteinte hépatique sévère (Lecha *et al*. 2009).

Symptômes hématologiques

Les atteintes hématologiques sont extrêmement rares et en général de faible amplitude n'entraînant pas de gêne pour le patient. Il a toutefois était décrite une anémie microcytaire hypochrome discrète dans plus de 70% des malades due au déficit en hème dans les érythrocytes (Holme *et al*. 2007).

Insuffisance hépatocellulaire

20% des patients contractent une atteinte hépatobiliaire mineure causée par l'apparition de lithiases biliaires : les calculs sont alors souvent constitués exclusivement de PPIX (Richard *et al*. 2008 ; Schmitt *et al*. 2010). Les complications hépatiques sévères affectent entre 1% et 10% des malades (Thunell *et al*. 2000). Contrairement à la PEC où les porphyrines de type I (coproporphyrine I et uroporphyrine I) sont hydrosolubles et donc éliminées partiellement par voie urinaire, la protoporphyrine IX (PPIX, hydrophobe) est éliminée strictement par voie biliaire et fécale. Durant l'érythropoïèse, la PPIX s'accumule dans les érythroïdes. Dans la circulation sanguine, la PPIX érythrocytaire traverse la membrane des globules rouges pour se fixer aux protéines plasmatiques. Le foie filtre le plasma et extrait la PPIX pour l'éliminer par voie biliaire. Une partie de la PPIX est réabsorbée par le foie en même temps qu'une partie des acides biliaires (circulation entéro-hépatique - Figure 4). L'accumulation de la PPIX entraîne sa précipitation intrahépatocytaire ainsi que dans les voies biliaires. Les cristaux de PPIX dans les canaux biliaires causent une lithiase puis une cholestase (Thunell *et al*. 2000). Des réarrangements architecturaux se produisent alors (réaction ductulaire associée à une fibrose péri-portale). Si le malade n'est pas pris en charge, une cirrhose pouvant décompenser en une insuffisance hépatique aigüe s'installe nécessitant une transplantation hépatique (Anstey et Hift, 2007).

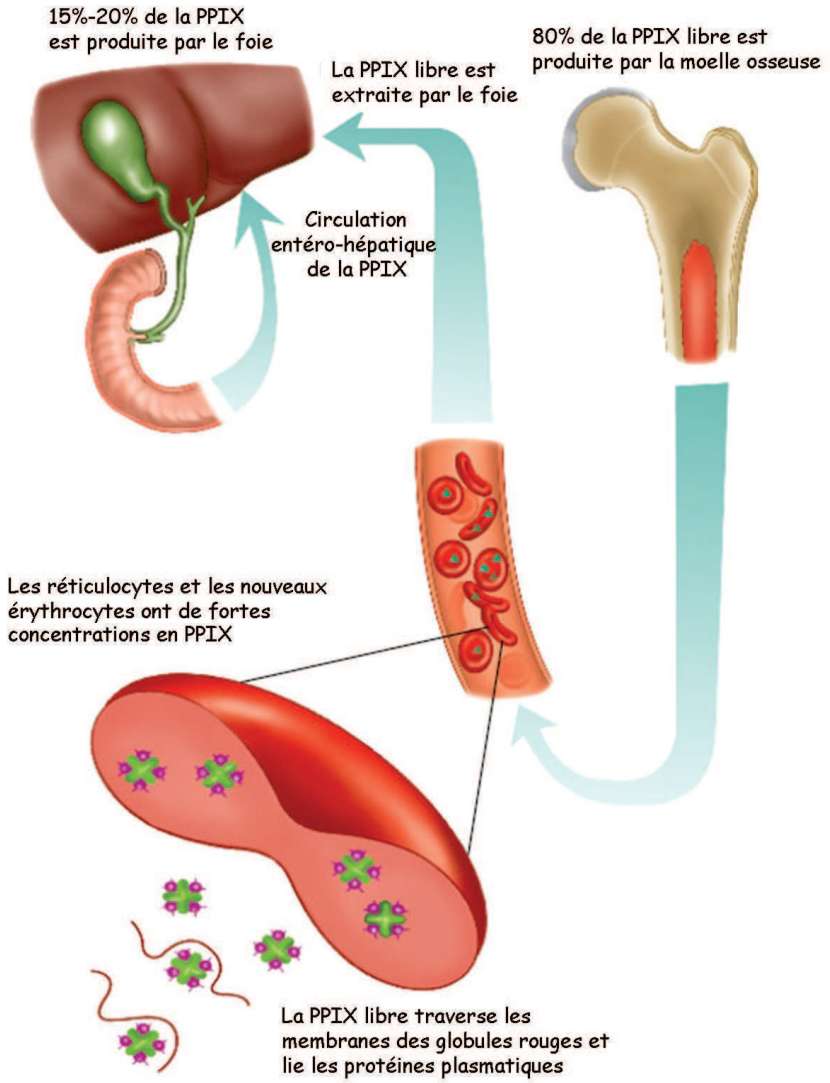


Figure 4. Parcours de la PPIX érythrocytaire dans la circulation sanguine puis entéro-hépatique. (D'après Anstey et Hift, 2007)

b) Génétique moléculaire de la PPE

Le PPE est en général causée par un déficit partiel en ferrochélatase codée par un gène unique localisé chez l'Homme sur le chromosome 18 (18q21.3, Whitcombe *et al*. 1991 ; Brenner *et al*. 1992). Elle se transmet de manière autosomique dominante majoritairement. La ferrochélatase est une enzyme ubiquitaire dans la nature, conservée des bactéries jusqu'à l'Homme. Elle est la dernière enzyme de la voie de biosynthèse de l'hème et catalyse l'insertion d'un atome de fer ferreux (Fe^{2+}) au sein de la protoporphyrine IX (Figure 5). Un manque de cette enzyme conduit à l'accumulation du précurseur en amont de cette étape, la PPIX, dans tous les tissus et plus particulièrement dans la moelle osseuse, les érythrocytes, le foie et la peau.

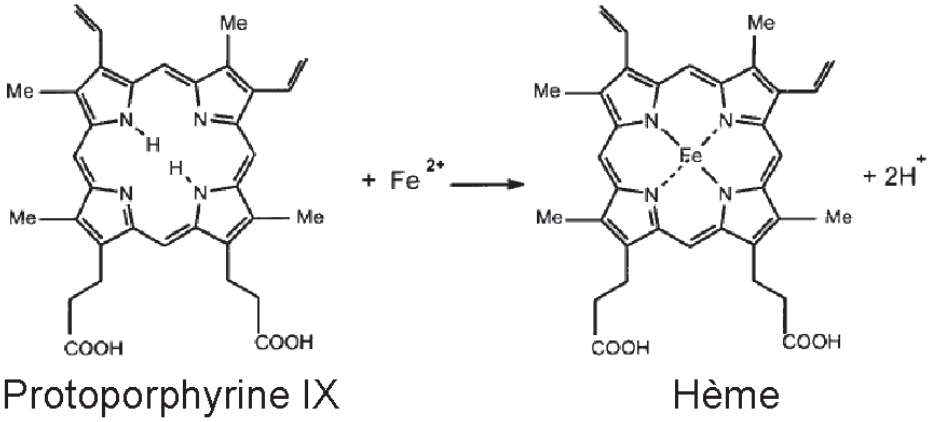


Figure 5. Réaction catalysée par la ferrochélatase. La ferrochélatase permet l'insertion d'un atome de fer ferreux (Fe^{2+}) au sein du tétrapyrrole formé par la protoporphyrine IX. (Modifiée de Ferreira *et al*. 1999).

L'activité de la ferrochélatase a été identifiée en 1956 dans des extraits érythrocytaires de poulet mais ce n'est qu'en 1974 que l'importance de sa fonction biologique a pu être établie lors de l'étude d'un mutant d'*Aquaspirillum itersonii* (Goldberg *et al*. 1956 ; Dailey et Lascelles, 1974). L'enzyme a ensuite été purifiée dans de nombreux organismes (*Rhodobacter spheroides*, *saccharomyces cerevisiae*, foie de bœuf…) jusqu'à la purification de la ferrochélatase humaine issue de foie par Mathews-Roth et collaborateurs en 1987. Le séquençage du gène de la ferrochélatase humaine a permis de déterminer la présence de 11 exons sur 45kb codant pour une protéine de 423 acides aminés (Taketani *et al*. 1992). La protéine formée est un homodimère localisé dans la membrane plasmique des organismes procaryotes et dans la membrane interne des mitochondries des eucaryotes, le site actif étant situé dans la matrice mitochondriale (Ferreira, 1995). La ferrochélatase possède également un groupe de 4 cystéines (C146, C403, C 406 et C411 ; Crouse *et al*. 1996) dont 3 sont présentes en C-terminal de la protéine. Ces cystéines sont capables de lier un groupement fer-soufre [2Fe-2S] servant de cofacteur faisant de la ferrochélatase une métalloprotéine (Dailey *et al*. 1994). Ce groupement est retrouvé dans la ferrochélatase de souris, porc, poulet et *Drosophila melanogaster* mais pas chez leurs homologues bactériennes, végétales et de levures (Schneider-Yin *et al*. 2000). Aucun rôle physiologique n'a pour le moment été attribué à ce cluster mais il semble essentiel à la fonction biologique de la ferrochélatase (Dailey *et al*. 1994 ; Lloyd *et al*. 1996 ; Schneider-Yin *et al*. 2000 ; Crooks *et al*. 2010). Ceci suggère que ce cluster jouerait un rôle structurel permettant à la ferrochélatase d'adopter et de conserver une conformation tridimensionnelle fonctionnelle.

L'étude moléculaire du gène de la ferrochélatase (OMIM n°612386) a ainsi permis de découvrir 164 mutations à ce jour (données de la Human Gene Mutation Database HGMD

http://www.hgmd.org/). Certaines mutations affectent la structure de la protéine et notamment celle du groupement liant le cluster [2Fe-2S] (Schneider-Yin *et al*. 2000). Ce sont majoritairement des mutations faux sens ou non sens, toutes reliées à un phénotype de protoporphyrie érythropoïétique (Tableau 3).

Mutations faux sens / non sens	59
Epissage	42
Régulation	2
Petites délétions	38
Petites insertions	9
Mutations « Indels »	1
Grandes délétions	12
Réarrangements complexes	1
Total	**164**

Tableau 3. Mutations affectant le gène de la ferrochélatase (type et nombre). (D'après HGMD, www.hgmd.org)

Bien que la PPE soit considérée comme une maladie héréditaire majoritairement dominante, des formes récessives ont été décrites (Lamoril *et al*. 1991 ; Sarkany *et al*. 1995). Récemment, un cas de PPE ne présentant aucune mutation du gène FECH a été décrit : une translocation entre les chromosomes 13q12 and 18q21.1 provoquant une pathologie protoporphyrique complète : atteinte hépatique, cutanée et hématologique (Oshikawa *et al*. 2012). Des transfusions ainsi que des plasmaphérèses permirent de contrer l'atteinte hépatique. Dans une autre étude, un patient présentait un syndrome myélodysplasique doublé d'une photosensibilité cutanée mais sans atteinte hépatique. Le clone cellulaire à l'origine de cette pathologie présentait des réarrangements chromosomiques importants ainsi qu'une perte d'un des deux chromosomes 18 ce qui a engendré, malgré la présence d'un second allèle FECH normal, une PPE transitoire. Quelques mois plus tard, la concentration des porphyrines libres dans ses érythrocytes avaient fortement et spontanément diminuée ainsi que sa photosensibilité (Sarkany *et al*. 2006).

Dans le cas d'une transmission autosomique dominante, les patients présentent une activité enzymatique inférieure à 50% (10% à 40% de l'activité normale) suggérant une complexité supérieure dans le mode de transmission de la maladie. En 1996, Gouya et collaborateurs montrent ainsi dans une famille atteinte de PPE, que la transmission autosomique dominante de la maladie proviendrait d'un allèle FECH muté associé à un allèle WT exprimé faiblement. Cet allèle est retrouvé dans 5 nouvelles familles atteinte de PPE et en forte proportion dans la population caucasienne (10%) (Gouya *et al*. 1999). Il entraîne une diminution de l'expression de la protéine sans qu'aucune mutation n'ait pu être découverte

dans l'ADNc de la ferrochélatase ou dans les séquences de l'intron 1 ou du 3'UTR. Ceci confirme la théorie posée par Went et Klasen en 1984 concernant la présence d'un troisième allèle FECH : un allèle WT, un allèle muté et un troisième allèle WT exprimé faiblement. L'association de ces deux derniers allèles causant la PPE. En 2002, cette faible expression du gène est expliquée par la présence d'un polymorphisme nucléotidique (SNP) au niveau du troisième intron (IVS3-48T/C) entraînant la création d'un site accepteur d'épissage aberrant et conduisant à un ARNm beaucoup plus court que le WT (Gouya *et al*. 2002).

La PPE peut également être déclarée sans que le gène de la ferrochélatase soit affecté. Ainsi la délétion ciblée du gène de la mitoferrine 1 dans le foie (Mfrn1, transporteur de fer dans la mitochondrie) dans un modèle murin entraîne un manque de fer intramatriciel. Lors de la stimulation du cycle de biosynthèse de l'hème par ajout d'ALA, le hépatocytes ne sont plus capables produire de l'hème entraînant une accumulation de la PPIX dans le foie suivie d'une cholestase et d'une cirrhose. Suite à la délétion du gène dans la moelle osseuse, les souris développent une anémie sévère due à un déficit dans la formation des érythroblastes (Traodec *et al*. 2011). La délétion totale du gène conduit à une mort *in utero*. Une insertion de 477 paires de bases dans l'intron 2 du gène mitoferrin-1 humain a également été rapportée entraînant l'activation d'un site donneur d'épissage causant l'apparition d'un codon stop et une protéine tronquée (Wang *et al*. 2011).

Cas de la protoporphyrie dominante liée à l'X

En 2008, Whatley et collaborateurs décrivent la première forme de protoporphyrie de transmission dominante liée a l'X (XLDPP pour X-Linked Dominante ProtoPorphyria). Elle a été identifiée chez des patients présentant les symptômes d'une PPE mais dont l'analyse du gène de la ferrochélatase n'a présenté aucune mutation ni même pour 3% des cas celle du SNP IVS3-48T/C. Deux délétions différentes dans l'exon 11 de l'*ALAS2* entraînent une modification importante de la partie C-terminale de la protéine (délétion de 19-20 acides aminés dans un cas et remplacement des 23 derniers acides aminés dans l'autre). Ces mutations assurent un gain de fonction à l'ALAS2 qui emballe le cycle de biosynthèse de l'hème et conduit à une accumulation de PPIX dans les érythrocytes et à une photosensibilité cutanée et à des dommages du foie chez certains patients (Whatley *et al*. 2008). La PPIX impliquées dans les lésions est principalement constituée de zinc-prototporphyrine IX (40% de Zn-PPIX). En effet, la FECH étant fonctionnelle, elle produit de l'hème jusqu'à ce que le

fer devienne limitant, ensuite elle poursuit son activité en insérant du zinc au centre de l'anneau porphyrique.

La région C-Terminale de l'ALAS2 aurait donc une fonction inhibitrice sur la fonction de la protéine. La délétion de cette région (mutation gain de fonction) induit une levée de l'inhibition et une suractivation de la voie de biosynthèse de l'hème alors que toutes les autres mutations de l'*ALAS2* décrites étaient perte de fonction et conduisaient au développement d'une anémie sidéroblastique héréditaire (Bottomley *et al*. 1995).

c) Traitements symptomatiques

Comme dans le cas de la porphyrie érythropoïétique congénitale, l'exposition aux rayons UV doit être réduite au maximum, pour éviter l'apparition de lésions cutanées. Le port de vêtements adaptés et l'utilisation de crèmes solaires « écran totales » (à base de dioxyde de titane ou d'oxyde de zinc réfléchissant les rayonnements UVA, UVB et partiellement le visible) sont conseillées. La prise de bêta-carotène améliore la photosensibilité chez certains patients (Mathews-Roth *et al*. 1984). Ce composé appartient à la famille des caroténoïdes. Il est capable d'absorber les rayonnements avec un maximum compris entre 450 et 470nm et interfère donc avec l'activité chromophore de la protoporphyrine IX des tissus. Il permet également de lier les ROS générés par effet photodynamique diminuant ainsi les dommages cutanés dus au stress oxydatif. L'α-tocophérol (vitamine E) est également parfois utilisé en thérapie : sa fonction antioxydante permet de réduire la photosensibilité par fixation des ROS (Moshell et Bjornson, 1977 ; Komatsu *et al*. 2000). La puvathérapie ainsi que la photothérapie aux UVB à spectre étroit permettent également une amélioration de la photosensibilité (Warren et George, 1998).

Un essai clinique testant l'efficacité d'un analogue de l'α-MSH (CUV1647 ou afamelatonide) développé par la société australienne Clinuvel) est terminé depuis 2009. Ce composé est capable de lier le récepteur de l'α-MSH, le récepteur à la mélanocortine 1 (melanocortin 1 receptor MC1R) permettant la stimulation de la synthèse de mélanine par les mélanocytes (Minder *et al*. 2010). Les deux effets significatifs observés sont une diminution de la douleur chez les patients traités à l'afamélatonide et une augmentation du temps d'exposition au soleil des patients. Ce composé a été retenu par l'Agence Européenne de Médecine, la FDA (Food and Drug Administration) ainsi que la Swissmedic comme médicament pour le traitement de la photosensibilité cutanée développée dans la PPE et la CEP (Minder *et al*. 2010 ; www.clinuvel.com).

Le traitement de l'atteinte hépatique dépend de la gravité de celle-ci. La protoporphyrine IX s'accumule dans les cellules érythroïdes pendant l'hématopoïèse. Lors de leur entrée dans la circulation sanguine, la PPIX diffuse dans le plasma et se lie aux protéines plasmatiques filtrées par le foie. La plus grande partie de la PPIX est excrétée par la bile puis par voie fécale. Dans la PPE, la PPIX en excès cristallise entraînant un dépôt de cristaux de porphyrines IX et une obstruction des canaux biliaires (lithiase biliaire). La cholestase qui s'ensuit provoque un changement de l'architecture du système hépatobiliaire s'aggravant parfois en inflammation puis en fibrose et cirrhose hépatiques. Le tableau clinique présente aussi une augmentation du taux des transaminases (ALAT et ASAT), de la phosphatase alcaline (ALP), de la gamma-glutamyle transférase (γ-GT) plasmatiques et de la bilirubine dues à une lyse hépatocytaire. La progression en cirrhose décompensée est fatale en l'absence d'une transplantation hépatique. Différents traitements permettent de contrer ou différer cette évolution. Le traitement à base de cholestyramine bloque la circulation entéro-hépatique (le recyclage des acides biliaires) en séquestrant les acides biliaires et permet l'augmentation de l'excrétion de la PPIX (Bloomer *et al*. 1979 ; McCullough *et al*. 1988). Des hémodialyses, plasmaphérèses et transfusions permettent de diminuer la concentration plasmatique de PPIX. Un traitement à base acide chénodésoxycholique (acide biliaire normalement sécrété par le foie) permet de diminuer les dépôts de protoporphyrines dans le foie (Rademakers *et al*. 1990). La réduction de la production de porphyrines est obtenue par l'utilisation d'haematin (hydroxyde de l'hème qui court-circuite le cycle de biosynthèse de l'hème) ou par la diminution de l'érythropoïèse par des transfusions de globules rouges ou de fer. Un traitement ou une combinaison de ces traitements est souvent utilisée antérieurement à une transplantation hépatique, pour favoriser l'environnement de transplantation.

En effet, dans 1 à 10% des cas de PPE, les symptômes dérivent vers une insuffisance hépatique grave nécessitant une greffe. La première greffe de foie a été reportée par Wells et collaborateurs en 1980 (Wells *et al*. 1980). Depuis plus d'une quarantaine de greffes ont été effectuées pour 5 décès des suites de complications opératoires (infections, hémorragies gastro-intestinales… - Anstey et Hift, 2007). Des précautions doivent être prises au moment de l'opération chirurgicale (de nombreux patients ont développé une phototoxicité abdominale due à l'exposition aux lampes des blocs opératoires). Une neuropathie, complication inattendue dans le cadre de la PPE, s'est déclarée dans de nombreux cas de patients transplantés, conséquente au haut taux de protoporphyrines circulantes au moment de la greffe (Herbert *et al*. 1991). La PPIX présente au moment de la greffe est également responsable de « l'attaque » du foie greffé avant que celui-ci puisse fonctionner efficacement.

Ces exemples mettent en évidence l'avantage thérapeutique de préparer l'environnement de greffe en diminuant au maximum le taux de protoporphyrines plasmatiques et érythrocytaires par un traitement adapté.

Plusieurs études présentent des patients avec un dépôt de PPIX et fibrose hépatiques toujours en bonne santé 7 ans après transplantation (Meerman *et al*. 1999) ou une rémission complète du phénotype hépatique (la photosensibilité persistant) jusqu'à 19 ans après la greffe (Herbert *et al*. 1991). Mais bien que la transplantation restaure une fonction hépatique normale (excrétion de la PPIX), elle ne corrige pas le problème sous-jacent. McGuire et collaborateurs rapportent le suivi de 20 patients transplantés aux USA. 65% des patients greffés avec succès (2 mois post-transplantation) développent à nouveau un phénotype protoporphyrique hépatique (cholestase) dès huit semaines après la greffe (McGuire *et al*. 2005). Trois patients ont nécessité une nouvelle transplantation. Trois patients décédés après transplantation présentaient à la biopsie des dépôts de protoporphyrines et une fibrose et cirrhose avancées. La forte récurrence et la vitesse de réapparition des symptômes mettent en exergue la nécessité de pratiquer une transplantation de moelle osseuse chez les patients avec une atteinte hépatique sévère et potentiellement récidivante.

e) Modèles murins de PPE

La PPE est déclarée chez des espèces bovines et se transmet de manière autosomique récessive (Bloomer *et al*. 1982). Ces animaux présentent une photosensibilité et un taux élevé de porphyrines érythrocytaire et fécales causée par un déficit de l'activité de la FECH (10% de l'activité normale). Contrairement à la pathologie humaine, la forme bovine de PPE n'entraîne pas de forme hépatique de la maladie. L'augmentation du taux de protoporphyrine dans les hépatocytes et dans la bile est compensée par une augmentation de sécrétion de sels biliaires qui permet son excrétion sans dépôts dans le foie (Bloomer *et al*. 1990).

Dans une étude génétique à grande échelle chez le zébrafish, une mutation induisant la lyse des globules rouges par l'exposition à la lumière a été mise en évidence. Cette mutation récessive, nommée dracula drc (m248), est située dans le gène de la ferrochélatase. C'est une mutation faux sens localisée au niveau d'un site donneur d'épissage créant un codon stop prématuré (Childs *et al*. 2000).

Ces animaux n'étant pas des modèles utilisables en laboratoire dans le cadre de protocoles de thérapie cellulaire ou génique, les mutations retrouvées chez l'homme ont été établies dans

des lignées murines pour recréer le plus fidèlement possible la pathologie humaine et pouvoir tester de nouvelles approches thérapeutiques.

Le premier modèle murin de protoporphyrie érythropoïétique a été obtenu en 1991 lors d'expériences de mutagenèse aléatoire par injection d'éthylnitrosourée (ENU) dans la souris domestique (*mus musculus*) (Tutois *et al*. 1991). Un séquençage a permis d'établir la présence d'une transversion d'une base T en A en position 293 de l'ADNc de la ferrochélatase soit un remplacement d'une méthionine par une lysine en position 98 de la protéine (M98K, Boulechfar *et al*. 1993). Cette mutation provoque une diminution importante de l'activité enzymatique de la ferrochélatase (2,7-6,3% de l'activité enzymatique normale). Le taux de protoporphyrines IX est fortement augmenté dans les érythrocytes, le plasma, le foie et les selles. Les souris homozygotes (*Fech*^{m1Pas}/*Fech*^{m1Pas}) développent une photosensibilité cutanée au niveau des oreilles et du dos entraînant des lésions inflammatoires pouvant devenir ulcérantes. Bien que n'ayant pas de retard de croissance ni de diminution de poids en comparaison avec les souris WT ou hétérozygotes, elles développent une hépatomégalie et une splénomégalie significatives avec l'âge. Les animaux homozygotes sont légèrement anémiés et présentent un fort pourcentage de réticulocytes dans le sang et de érythroblastes dans la moelle osseuse, reflet d'une stimulation de l'érythropoïèse et expliquant la splénomégalie. Une polychromasie, hypochromie et anisocytose sont observées dans la population érythrocytaire. L'atteinte hépatique est très importante et se caractérise par une accumulation de cristaux de protoporphyrine dans les canaux biliaires, les hépatocytes et les cellules de Kupffer. Une cholestase s'installe rapidement et entraîne une hépatolyse et une fibrose portale et périportale accompagnées par une régénération anarchique des hépatocytes. La bilirubine est augmentée dans le plasma provoquant une jaunisse disparaissant avec l'âge. Les niveaux sériques des transaminases et de la phosphatase alcaline sont également augmentés. Les souris hétérozygotes ne présentent pas d'anémie, ni d'atteinte hépatique ou de photosensibilité. L'activité de la ferrochélatase est d'environ 50% dans tous les tissus. Après plusieurs croisements, la mutation a été introduite dans les fonds génétiques murins BALB/cByJCrl, C57BL/6JCrl, and SJL/JOrlCrl. Bien que portant la même mutation, ces lignées murines ne déclarent pas le même phénotype protoporphyrique : les souris BALB/c développent une anémie mycrocytaire et hypochrome avec une diminution de 21% de son hématocrite stable dans le temps. Les dépôts de PPIX dans le foie sont modérés pour ce modèle. Par contre, la dégradation de la fonction excrétoire du foie est rapidement diminuée comme attestée par les taux élevés de bilirubine totale et de phosphatase alcaline ainsi que par la réduction progressive de l'excrétion de la PPIX par voie fécale. Le modèle C57BL/6

déclare une anémie modérée avec un hématocrite diminué de 15% à 3 mois. Le phénotype le plus marqué est l'atteinte hépatique. Les dépôts de PPIX sont très importants et présents dans les hépatocytes, les cellules de Küppfer, les canaux biliaires et les conduits biliaires périportaux caractérisés par une élévation des taux de transaminases et une hépatite chronique. L'excrétion de PPIX est pourtant modérément affectée, les souris excrétant de grandes quantités de PPIX par voie fécale encore à 6 mois. Les souris SRJ présentent le phénotype le moins marqué avec une anémie hypochrome discrète et une fonction hépatique légèrement affectée avec des lésions moyennes. Ces souris ont un taux de PPIX érythrocytaires plus élevé que les deux autres modèles mais ne présentent que peu d'accumulation de PPIX dans le foie. Ces modèles murins mettent en exergue la présence d'une régulation génétique indépendante du gène de la ferrochélatase sur la surproduction de PPIX et son implication dans l'anémie et les dépôts intra-hépatiques (Abitbol *et al*. 2005).

Le deuxième modèle murin de PPE a été généré par recombinaison homologue dans des cellules ES murines (Magness *et al*. 2002). L'exon 10 de la ferrochélatase a ainsi été totalement délété afin de reproduire une des mutations retrouvée chez l'homme. Contrairement à la mutation *Fech*^{m1Pas}, cette délétion est létale à l'état embryonnaire (J3,5 postcoïtum) pour les embryons homozygotes. Les animaux hétérozygotes présentent une activité résiduelle réduite à 37% de l'activité normale malgré une quantité équivalente de ferrochélatase suggérant un rôle de dominant négatif de la ferrochélatase tronquée. La protoporphyrine s'accumule dans les érythrocytes et la bile. La photosensibilité cutanée aux rayons UV est importante au bout de 3 jours et se caractérise par des lésions nécrotiques et des oedèmes. Par contre, aucune pathologie hépatique n'a pu être détectée malgré l'accumulation de PPIX dans la bile (Magness *et al*. 2002).

La griséofulvine (composé fongistatique produit par *Penicillium griseofulvum*) utilisée comme un inhibiteur de la ferrochélatase, permet de reproduire un phénotype protoporphyrique chez la souris. Les sites d'accumulation de la protoporphyrine IX sont principalement le foie puis les érythrocytes (Nakao *et al*. 1967 ; Janousek *et al*. 1970). La photosensibilité et l'atteinte hépatique sont sévères (Konrad *et al*. 1975).

I-4) Thérapies cellulaire et génique des porphyries érythropoïétiques

I- 4 - 1) Thérapie cellulaire des porphyries érythropoïétiques

a) Thérapie cellulaire de la PEC

Bien que la porphyrie érythropoïétique congénitale soit une maladie relativement rare, les cas étudiés montrent bien l'extrême gravité des symptômes et la souffrance des patients. Les traitements symptomatiques sont le plus souvent peu efficaces : protection contre toute exposition solaire, traitement à base de bêta-carotène, transfusions sanguines répétées et injection d'hydroxyurée afin de limiter la synthèse de porphyrines et splénectomie afin de réduire l'anémie et diminuer ainsi le besoin en transfusions (Katugampola *et al*. 2012). Le seul traitement permettant une totale guérison, la transplantation de moelle osseuse d'un donneur HLA-compatible, est risqué (22 greffes recensées - Tableau 4). Elle est pratiquée exclusivement dans les cas sévères de PEC et le plus tôt possible. En effet, l'âge semble être un facteur important dans la réussite de la greffe : 2 des trois patients décédés avaient 10 ans ou plus au moment de la greffe et une autre greffe a échoué sur un enfant de 12 ans et 9 mois (Katugampola *et al*. 2012 ; Handbook Of Porphyria, 2013). Les patients traités avec succès étaient pour la plupart de jeunes enfants de moins de 5 ans. La décision d'une transplantation de moelle osseuse se prend donc en fonction de la gravité des symptômes du patient (notamment hématologiques) et du pronostic sur le long terme de la maladie chez ce patient. Lors d'une bonne prise de greffe, toutes les transplantations permettent une réduction importante des symptômes de la maladie : activité de l'UROS érythrocytaire normale, diminution des taux de porphyrines (urinaires, fécales et érythrocytaires), diminution du taux de fluorocytes jusqu'à un taux normal et donc de la photosensibilité, diminution ou disparition des spléno- et hépato-mégalie. Les premières greffes ont été pratiquées entre donneur et receveur HLA compatibles issues de la fratrie du malade. En effet, il existe de meilleures chances de trouver un donneur HLA-compatible avec le malade chez les frères et sœurs de ce dernier. Mais une transplantation a également eu lieu en utilisant des cellules souches hématopoïétiques (CSH) issues de cordon ombilical. D'autres ont suivies sans compatibilité familiale : des donneurs du « Bone Marrow Registry » partiellement compatibles ont permis de greffer deux patients (Dupuis-Girod *et al*. 2004). Dans tous les cas de transplantation, le receveur subit un conditionnement basé sur un cocktail de produits permettant une

myéloablation (busulfan ou par irradiation corporelle totale) et un traitement post-greffe afin d'éviter les phénomènes de rejet (lymphoablation par le cyclophosphamide, thymoglobuline, cyclosporine) et de la maladie du greffon contre l'hôte (méthotrexate). Mais ce traitement reste lourd et risqué : la première tentative de greffe a entraîné le décès du patient onze mois après sa transplantation suite à une infection virale au CMV ; un autre patient décéda suite à deux rejets de greffe et une hypertension pulmonaire chronique responsable d'hémorragies pulmonaires (Kauffman *et al*. 1991 ; Hogeling *et al*. 2011).

Numéro de cas	Âge de transplantation	Sexe	Méthodes de conditionnement et traitement MGcH	Source de cellules souches	Issue clinique	Durée du suivi	Ref.
1	10 ans	F	Busulfan, cyclophosphamide	TCSH haplo-identique	Décédée, infection CMV	11 mois	Kauffman *et al*. 1991
2	4 ans	F	Busulfan, cyclophosphamide, globuline anti-thymocyte	TCSH sang de cordon	Vivante, guérison complète	10 mois	Zix-Kieffer *et al*. 1996
3	22 mois	F	Busulfan, cyclophosphamide	TCSH histocompatible	Vivante, guérison complète	21 mois	Thomas *et al*. 1996 ; Lagarde *et al*. 1996
4	18 mois	F	Busulfan, cyclophosphamide	TCSH histocompatible	Vivante, guérison complète	35 mois	Tezcan *et al*. 1998
5	11 ans	M	NA	TCSH histocompatible	Décédé, septicémie	10 jours	Fritsch *et al*. 1998
6	23 mois	M	Busulfan, cyclophosphamide	TCSH histocompatible	Vivante, guérison complète	15 mois	Shaw *et al*. 2001
7	23 mois	F	NA	TCSH d'un donneur non lié au malade	Vivante, guérison complète	15 mois	Harada *et al*. 2001
8	22 et 24 mois	F	Busulfan, cyclophosphamide	TCSH histocompatible (x2)	Vivante, guérison complète	32 mois	Lebreuilly-Sohyer *et al*. 2010
9	23 mois	F	NA	NA	Vivante, guérison complète	NA	Lazebnik et Lazebnik, 2004
10	4 ans	M	Busulfan, cyclophosphamide, anti-thymocyte	TCSH d'un donneur non lié au malade	Vivant, infection CMV, guérison complète	36 mois	Dupuis-Girod *et al*. 2005
11	2 ans	F	Busulfan, cyclophosphamide, anti-thymocyte	TCSH d'un donneur non lié au malade	Vivante, guérison complète	24 mois	Dupuis-Girod *et al*. 2005
12	7 ans	F	Busulfan, cyclophosphamide, fludarabine, ciclosporine, immunoglobulines	TCSH histocompatible	Vivante, MGcH chronique	4 ans	Taibjee *et al*. 2007
13	12 ans	M	Busulfan, cyclophosphamide, thiotépa, anti-thymocyte, méthotrexate, ciclosporine	TCSH d'un donneur non lié au malade	Vivante, guérison complète	7 ans	Faraci *et al*. 2008
14	10 mois	F	Busulfan, cyclophosphamide	TCSH d'un donneur non lié au malade	Vivante, guérison complète	25 mois	Lebreuilly-Sohyer *et al*. 2010
15	22 mois	M	Busulfan, fludarabine, alemtuzumab, cyclophosphamide	TCSH d'un donneur non lié au malade 9/10 allèle B	Décédé, rejet de greffe	4 mois	Hogeling *et al*. 2011
16	14 ans	M	Méthotrexate, ciclosporine, globuline anti-thymocyte	TCSH histocompatible	Vivante, guérison complète	4 ans	Singh *et al*. 2012
17[a]	3 ans	M	NA	TCSH d'un donneur non lié au malade	Vivante, guérison complète	5 ans	Phillips *et al*.2007
18	11 mois	F	Busulfan, cyclophosphamide, ciclosporine, méthotrexate, immunoglobulines	TCSH histocompatible	Vivante, guérison complète	11,5 ans	Katugampola *et al*. 2012
19	12 ans et 9 mois	M	Busulfan, cyclophosphamide, ciclosporine, méthotrexate, immunoglobulines	TCSH histocompatible	Echec TMO, PEC progressive	8,5 ans	Katugampola *et al*. 2012
20	10 mois	M	Busulfan, cyclophosphamide, ciclosporine, méthotrexate, immunoglobulines	TCSH histocompatible	Vivante, guérison complète, MGcH peau	7 ans	Katugampola *et al*. 2012
21	11 ans et 4 mois	F	Fludarabine, thiotépa, ciclosporine, méthotrexate, anti-thrombotic	TCSH histocompatible	NA	82 jours	Katugampola *et al*. 2012
22	22 mois	F	Busulfan, cyclophosphamide, globuline anti-thymocyte, ciclosporine	TCSH haplo-identique (x2)	Vivante, guérison complète	9 ans et 7 mois	Katugampola *et al*. 2012

MGcH : Maladie du Greffon contre l'Hôte

TMO : Transplantation Moelle Osseuse

TCSH : Transplantation Cellules Souches Hématopoïétiques

Tableau 4. Transplantation de moelle osseuse chez les patients PEC (Modifié de Handbook of Porphyria, sous presse, 2013).

Les traitements symptomatiques sont insuffisants pour améliorer l'état général des patients ou leur qualité de vie. La difficulté à trouver un donneur histocompatible et le risque de rejet du greffon rendent la thérapie cellulaire difficile à mettre en place et risquée. Ce sont ces raisons qui ont permis l'avancée de nouvelles voies thérapeutiques s'appuyant principalement sur la thérapie génique.

b) Thérapie cellulaire de la PPE

Comme dans le cas de la PEC, le seul traitement curatif de la PPE est la transplantation de moelle osseuse. Ce traitement est réservé aux cas les plus sévères de PPE avec une maladie hépatique importante d'une part à cause de la forte morbidité/mortalité de la transplantation et d'autre part du faible nombre de donneurs compatibles HLA. Seules quatre transplantations de moelle osseuse ont été reportées dans la littérature (Tableau 5), Handbook of Porphyria, sous presse, 2013). Une patiente présentant une PPE avec une forte photosensibilité et ayant également développé une leucémie aigüe myélocytaire a reçu une transplantation de moelle de son frère, lui-même atteint de protoporphyrie mais moins sévèrement. La transplantation a permis une rémission de la leucémie sur le long terme (5 ans en 2001) et une évolution de sa porphyrie vers un phénotype intermédiaire (Poh-Fitzpatrick *et al*. 2002). Les deux autres cas rapportent un schéma de photosensibilité sévère et de détérioration de la fonction hépatique due à une cholestase ou une cirrhose entraînant des douleurs abdominales. La stratégie thérapeutique consiste dans les deux cas à améliorer la pathologie hépatique par un traitement adéquat (plasmaphérèse, α-tocophérol, greffe hépatique si besoin…) puis à transplanter la moelle osseuse saine. Smiers et collaborateurs ont traité un jeune patient de 9 ans souffrant de graves brûlures et d'une fibrose hépatique et cholestase sévères par une greffe de foie suivie d'une greffe de moelle osseuse provenant d'un des parents haploidentiques. La correction fut observée rapidement par une diminution de la concentration de la protoporphyrine IX. Cependant, la mise en place du système immunitaire fut retardée et entraîna, en corrélation avec une réactivation du virus de la varicelle-zona, une perte de la vision et un décès causé par une déficience multiple des organes (Smiers *et al*. 2010).

Numéro de cas	Âge de transplantation	Sexe	Méthodes de conditionnement et traitement MGcH	Source de cellules souches	Issue clinique	Ref.
1	47 ans	F	Leucémie myéloïde aiguë	TCSH HLA-identique	Rémission de la leucémie Réversion de la photosensibilité cutanée	Poh-Fitzpatrick *et al*. 2002
2	15 ans	M	Atteinte hépatique récurrente après TH	TCSH HLA-compatible (x2) 6 mois après TH	Correction de la lithisase biliaire	Rand *et al*. 2006
3	62 ans	M	Cholestase progressive sévère	TCSH haplo-identique d'un donneur non apparenté	Correction de la maladie cutanée et hépatique	Wahlin *et al*. 2007
4	9 ans	M	Prévention insuffisance hépatique après TH	TCSH haplo-identique parental	Restauration de l'immunité retardée, infection virale et déficience de multiples organes	Smiers *et al*. 2010

MGcH : Maladie du Greffon contre l'Hôte
TCSH : Transplantation Cellules Souches Hématopoïétiques
TH : Transplantatin Hépatique

Tableau 5. Transplantation de moelle osseuse chez les patients PPE (Modifié de Handbook of Porphyria, sous presse, 2013).

Bien que la photosensibilité des patients protoporphyriques soit un symptôme majeur jouant sur leur qualité de vie, c'est bien le symptôme hépatique qui, quand il se développe, entraîne les complications les plus sévères et met le pronostic vital en jeu. Plusieurs cas chez des patients avec des fibroses et changements architecturaux du système hépatobiliaire montrent qu'une greffe de moelle corrige la photosensibilité mais pas ou peu les fonctions du foie. Les études de thérapies cellulaire et génique chez la souris protoporphyrique modèle montrent toutes une réduction importante du taux de porphyrines circulantes et une diminution voire une disparition de la photosensibilité cutanée (Fontanellas *et al*. 2001 ; Richard *et al*. 2001 ; Pawliuk *et al*. 1999). Même si la transplantation de moelle osseuse permet d'améliorer la fonction hépatique chez des souris jeunes (3-4 semaines), aucune réversion complète du phénotype hépatique n'a pu être obtenue (Fontanellas *et al*. 2000 ; Garcia-Bravo *et al*. 2009). Les fibroses et arrangements structuraux du foie causés par les dépôts de porphyrines IX sont irréversibles.

Il était donc intéressant de découvrir à quel moment débutent les dépôts de porphyrines ainsi que la fibrose hépatique et si une greffe de moelle osseuse précoce pouvait les prévenir. Nous sommes partis de ce postulat et avons testé un protocole de thérapie cellulaire chez le

nouveau-né de souris PPE ($Fech^{m1Pas}/Fech^{m1Pas}$) dont les résultats sont décrits dans la 1ère partie du chapitre Résultats.

I-4 - 2) Thérapie génique des porphyries érythropoïétiques

Dans la PEC comme dans la PPE, même si le défaut enzymatique caractéristique de ses maladies est présent dans toutes les cellules, l'accumulation de porphyrines de type I et de protoporphyrine IX a lieu principalement dans les érythrocytes (où l'hème est synthétisé en grande quantité). Les protections solaires, transplantations hépatiques ne sont des solutions que symptomatiques et souvent temporaires. La transplantation de moelle osseuse est le seul traitement curatif. La thérapie génique est une solution à envisager pour pallier au manque de donneurs compatibles. Ce type de thérapie a déjà fait ses preuves, notamment dans le cas du traitement du syndrome d'immunodéficience combinée sévère liée à l'X (SCID-X en anglais) par l'équipe du Pr Fischer à Paris en 1999. Cette maladie possède plusieurs causes génétiques dont la plus commune est une mutation du gène IL-2Rγ (localisé sur le chromosome X) codant pour la chaîne γ_c, composante essentielle des récepteurs aux interleukines 2, 4, 7, 9, 15 et 21. Ceci entraîne une interruption de la différenciation des lymphocytes T et B et résulte sur un phénotype immuno-incompétent avec peu ou pas de lymphocytes B, T et NK. Fischer et collaborateurs pratiquèrent une greffe de cellules autologues corrigées avec un vecteur rétroviral (Moloney) exprimant la chaîne déficiente sous contrôle du promoteur rétroviral. Sur une période de 12 ans, 17 enfants (atteint d'ADA-SCID ou de SCID-X) furent traités avec succès : nombre et activité des lymphocytes comparables à ceux obtenus lors d'une greffe de moelle osseuse permettant une sortie de l'isolateur (« bulle ») entre 45 et 90 jours post-greffe (Hacein-Bey-Abina *et al*. 2002 et Hacein-Bey-Abina *et al*. 2010). Mais le protocole a été amélioré notamment au niveau de la sécurité des vecteurs rétroviraux. En effet, sur les neuf patients traités entre 1999 et 2002, quatre ont développé des leucémies suite à l'insertion du vecteur thérapeutique à proximité du promoteur de proto-oncogènes (LMO2, BMI1 et CCND2) (Hacein-Bey-Abina *et al*. 2003). Un patient a également présenté des anormalités chromosomiques (translocations et délétion), une variation du nombre de copies, une délétion d'un gène suppresseur de tumeur (CDKN2A), un réarrangement SIL-TAL1 ainsi qu'une mutation gain de fonction activant le gène *NOTCH1* (Hacein-Bey-Abina *et al*. 2008). Par la suite, les vecteurs utilisés ont été modifiés pour augmenter la sécurité de cette thérapie : la région U3 des LTR (région promotrice rétrovirale) a subit une délétion nécessitant l'ajout d'un promoteur interne pour exprimer le transgène. Des séquences isolatrices ont également

été rajoutées dans les LTR afin de ne pas affecter l'expression des gènes aux alentours du site d'intégration et ainsi éviter les phénomènes de sur-activation de ces gènes.

La thérapie génique a prouvée son efficacité dans d'autres protocoles thérapeutiques : β-thalassémie (Cavazzana-Calvo *et al*. 2010), adrénoleucodystrophie liée à l'X (Cartier *et al*. 2009), amaurose congénitale de Leber (essai clinique de phase I - Jacobson *et al*. 2012), maladie de Gaucher (Dunbar *et al*.1998)… Elle est particulièrement applicable aux maladies monogéniques où l'apport d'une copie du gène déficient « suffit » pour rétablir un phénotype normal. Les porphyries érythropoïétiques sont donc des maladies candidates pour ce type de thérapie.

a) Thérapie génique de la PEC

Depuis une vingtaine d'années, de nombreuses études, au laboratoire comme ailleurs, ont déjà montré la faisabilité d'un tel protocole. Le transfert du gène de l'URO III synthase a été pratiqué avec succès dans des fibroblastes murins et de patients PEC puis dans des lignées lymphoblastoïdes déficientes (Moreau-Gaudry *et al*. 1995a ; Moreau-Gaudry *et al*. 1995b). Les résultats montrent une restauration de l'expression de l'activité de l'UROS dans les lignées déficientes transduites et une diminution de l'accumulation des porphyrines jusqu'à un taux normal. Lors de la co-culture de cellules corrigées avec des cellules déficientes, aucune correction croisée ou avantage sélectif des cellules corrigées n'a pu être mis en évidence dans ce modèle cellulaire. Ceci démontre l'importance d'un bon transfert de gènes et d'une déplétion des cellules anormales quasi-complète pour corriger au mieux le phénotype porphyrique. Des cellules mononuclées de moelle osseuse ont ensuite été infectées par un vecteur rétroviral exprimant l'ADN complémentaire (ADNc) de l'UROS conduisant à une restauration de l'activité enzymatique de l'UROS et une disparition des porphyrines dans les cellules transduites (Moreau-Gaudry *et al*. 1996). La transduction de fibroblastes PEC ainsi que de lignées lymphoblastoïde et érythroleucémique (K562) entraîne une augmentation de l'activité enzymatique de l'UROS (Kauppinen *et al*. 1998). La nouvelle fonctionnalité de la voie de biosynthèse de l'hème est prouvée par l'adjonction d'acide δ-aminolévulinique. L'ALAS étant l'enzyme limitante dans la voie de biosynthèse de l'hème, l'ajout de son produit sert à court-circuiter cette étape et à emballer la voie de biosynthèse. Ceci, en présence d'un déficit enzymatique, conduit à l'accumulation des porphyrines de types I et recrée le phénotype de la PEC. Or, l'ajout de 0,5mM d'ALA n'entraîne pas d'accumulation de porphyrines dans les cellules. Le transgène intégré s'exprime durablement (pendant au moins

6 mois) et sans observation de toxicité cellulaire démontrant ainsi la faisabilité et la réussite d'une thérapie génique sur des cellules PEC.

Afin de modéliser un protocole de thérapie génique, des cellules progénitrices de la moelle osseuse $CD34^+$ normales ont été isolées à partir de sang périphérique mobilisé ou de sang de cordon ombilical afin d'être transduites par un vecteur rétroviral exprimant la GFP (Green Fluorescent Protein) ou l'UROS (Mazurier *et al*. 1997 ; Mazurier *et al*. 2001). Ce dernier vecteur a permis une augmentation de l'expression de l'UROS d'un facteur 1,5 à 2 par rapport à l'activité enzymatique de cellules non transduites. Ces travaux démontrent la possibilité d'une transduction de progéniteurs hématopoïétiques et l'efficacité du vecteur thérapeutique rétroviral. La mobilisation d'un patient atteint de PEC par l'utilisation de cytokines (G-CSF) a permis d'isoler des progéniteurs $CD34^+$ déficients. La transduction de ces cellules a montré une correction de l'activité de l'UROS dans les cellules transduites et une diminution de 53% de l'accumulation des porphyrines (Mazurier *et al*. 2001).

Cependant, l'efficacité de transduction de cellules souches/progénitrices hématopoïétiques par des vecteurs oncorétroviraux est limitée. Afin de remédier à ce problème, des vecteurs lentiviraux ont été générés. Cette nouvelle génération de vecteurs viraux, dérivés du virus de l'immunodéficience humaine 1 (VIH-1), possède les caractéristiques des rétrovirus : virus à ARN, intégration dans le génome et expression stable du transgène. Leur particularité est leur capacité à transduire tout type de cellules, y compris des cellules hors du cycle cellulaire (en G0) (Naldini, 1998 ; Uchida *et al*. 1998 ; Miyoshi *et al.* 1999 ; Case *et al.* 1999 ; Evans *et al.* 1999). Géronimi et collaborateurs ont ainsi montré en 2003 une transduction efficace dans les cellules $CD34^+$ ainsi que dans les progéniteurs hématopoïétiques ($CD34^+/38^-/lin^-$) issues de sang périphérique ou de sang de cordon. Une préstimulation courte de ces cellules par des cytokines (IL-3, SCF, Flt3-L et TPO sur 18 heures) améliore nettement les taux de transductions (>85%) tout en conservant une expression du transgène sur le long terme (10 semaines) (Géronimi *et al.* 2003a). La même année, le transfert de l'ADNc de l'UROS dans des lignées porphyriques et dans des cellules primaires $CD34^+$ de patients est réalisé avec succès (Géronimi *et al.* 2003b). La transduction élevée (90% sans sélection) permet une correction enzymatique et métabolique. Des expériences *in vitro* ont permis de démontrer la persistance de l'expression du transgène dans toute la lignée érythroïde ainsi que dans les cellules primitives (LTC-IC) et progénitrices hématopoïétiques (CFC).

Dernièrement, la thérapie génique d'un modèle murin de porphyrie érythropoïétique congénitale a été réalisée avec succès (Robert-Richard *et al*. 2008). La transduction de cellules souches hématopoïétiques résistantes au 5-FU (5-fluorouracile) sélectionnées sur

l'expression de l'épitope Sca-1^+ s'est faite à l'aide d'un vecteur lentiviral thérapeutique SIN (Self-Inactivated) exprimant l'ADNc de l'UROS sous contrôle d'un promoteur érythroïde spécifique. Les transductions se sont faites *ex vivo*, 36 heures avant de réinjecter les cellules dans des souris myélosupprimées par un protocole à base de busulfan (Figure 6). Dès le premier mois, on observe une diminution des fluorocytes dans tous les groupes de souris traitées. 20 semaines après la greffe, l'activité enzymatique est restaurée, les porphyrines urinaires et érythrocytaires sont diminuées de manière significative et la photosensibilité est supprimée (sauf dans le groupe de faible MOI –Multiplicity Of Infection). Après 20 semaines post-greffe, des souris secondaires ont été greffées avec de la moelle osseuse totale de souris corrigées (groupe I) et présentaient elles aussi une correction enzymatique, métabolique et phénotypique confirmant que la transduction du vecteur thérapeutique concernait bien des cellules souches hématopoïétiques à fort potentiel de repopulation. L'expression spécifique du vecteur thérapeutique dans les cellules érythroïdes est démontrée par l'analyse de l'activité enzymatique dans les cellules $Ter119^+$ et $Ter119^-$ (activité augmentée dans les cellules $Ter119^+$ uniquement chez les souris traitées). Ceci démontre également que la correction des cellules érythroïdes uniquement suffit pour corriger le phénotype porphyrique. Robert-Richard et collaborateurs démontrent également un avantage sélectif des cellules érythroïdes transduites par rapport aux non corrigées (expression de la GFP deux fois plus importante dans les cellules érythroïdes corrigées que dans celles transduites avec un vecteur GFP par rapport aux cellules $Gr1^+$) contrairement à la protoporphyrie érythropoïétique (Pawliuk *et al*. 1999 ; Richard *et al*. 2001). Une transduction de 40% de la population cellulaire semble suffisante pour corriger durablement le phénotype sans sélection des cellules corrigées (pré- ou post-greffe). Si la transduction est inférieure à 40%, le phénotype est intermédiaire (réduction faible des porphyrines, augmentation faible de l'activité enzymatique) voir identique aux souris PEC. Ce travail montre donc bien l'efficacité d'une thérapie génique de la PEC.

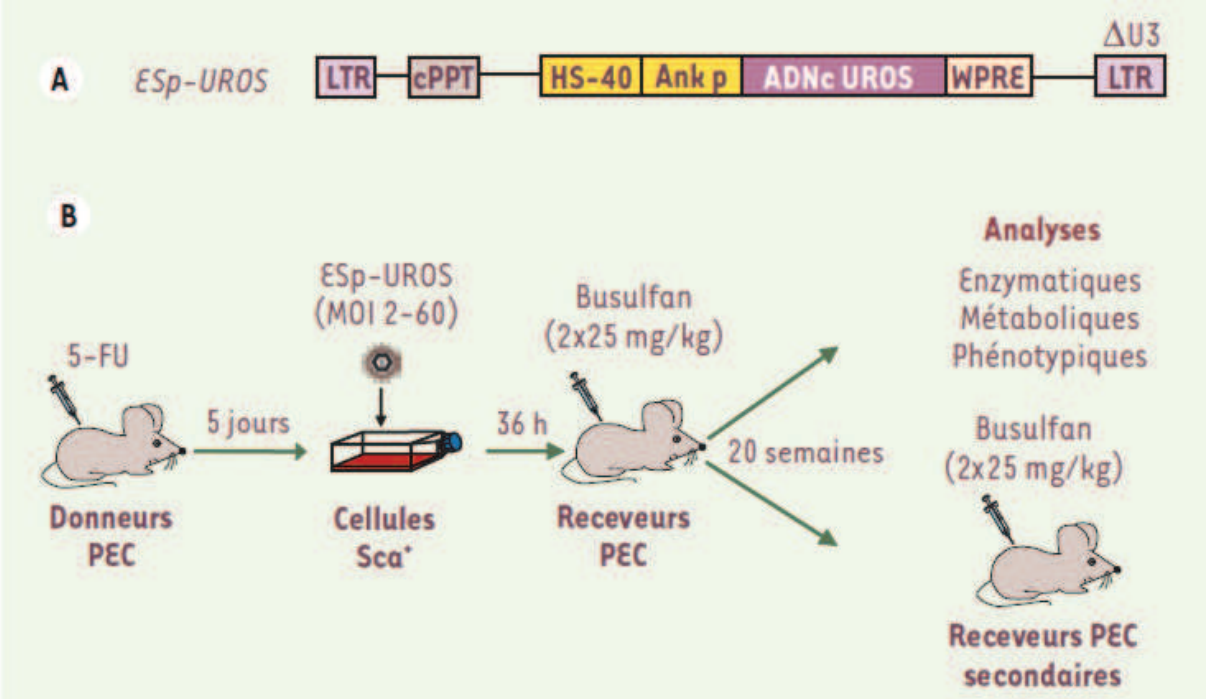


Figure 6 : Protocole de thérapie génique d'un modèle de souris PEC. **A)** Vecteur lentiviral thérapeutique exprimant l'ANDc de l'URO III synthase sous contrôle d'un promoteur érythroïde spécifique. **B)** Schéma du protocole thérapeutique : les souris donneuses PEC sont traitées au 5-FU pour entraîner la prolifération des cellules souches hématopoïétiques. Les cellules Sca^+ sont transduites avec le lentivecteur et conservées en culture 36 heures avant d'être réinjectées dans des souris malades receveuses et myélosupprimées par un traitement au busulfan. Les animaux sont ensuite analysés ou sacrifiés afin de greffer des animaux secondaires. (de Verneuil *et al*. 2008)

Un modèle cellulaire de PEC a été généré dans des cellules $CD34^+$ de sang de cordon grâce à un ARN interférent (ARNsh) ciblant l'exon 9 de l'*UROS* (Robert-Richard *et al*. 2010). Une diminution drastique de l'activité de l'UROS a été démontrée (96% proche de ce qui est observé dans des cellules PEC) entraînant l'accumulation de porphyrines après ajout d'ALA. La greffe de cellules de moelle osseuse transduites avec ce ARNsh a permis de transposer ce phénotype dans une souris immunodéficiente (NOG). La transduction avec un vecteur construit pour ne pas subir l'inhibition par le ARNsh (modifications de la séquence à 4 positions différentes sans altération de l'acide aminé codé ni de sa fréquence d'utilisation) permet de restaurer l'activité enzymatique. Ce modèle cellulaire est donc un bon outil pour tester de nouveaux protocoles ou vecteurs thérapeutiques.

b) Thérapie génique de la PPE

Dans les cas de fibrose ou cirrhose hépatique avancée, l'expérience montre que 65% des patients ayant subit une greffe de foie, voient l'état de leur nouveau foie se détériorer dans un laps de temps plus ou moins long du fait d'une correction incomplète du déficit

enzymatique. Le déficit enzymatique majoritairement impliqué dans le phénotype hépatique est localisé dans les cellules souches hématopoïétiques. Pour ces patients, la transplantation de moelle osseuse ou la thérapie génique est recommandée. 3 patients ont déjà été greffés avec succès. Parallèlement, des expériences de transfert de gènes ont été menées dans des lignées cellulaires puis dans un modèle murin de PPE. Mathews-Roth et collaborateurs ont montré en 1995 que la transfection de l'ADNc de la ferrochélatase dans des cellules COS-1 and CHO-DUKX augmente l'expression de cette enzyme. La transduction de fibroblastes de patient PPE par un vecteur rétroviral permet la restauration de l'expression de la ferrochélatase dans ces cellules. Celles-ci n'accumulent plus de porphyrines même en présence d'ALA dans leur milieu de culture (Mathews-Roth *et al*. 1995). Par la suite, Pawliuk et collaborateurs utilisèrent un vecteur rétroviral pour corriger des souris $Fech^{m1Pas}/Fech^{m1Pas}$. Des cellules souches hématopoïétiques (5-FU/Sca^{+}) ont été transduites avec un vecteur exprimant la GFP ou un vecteur biscistronique co-exprimant la FECH et la GFP. Les cellules ont été sélectionnées par FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) avant d'être transplantées dans des souris PPE. Les souris greffées avec le vecteur thérapeutique sont corrigées durablement (diminution des protoporphyrines érythrocytaires et disparition de la photosensibilité 7 mois après la greffe) contrairement aux souris greffées avec le vecteur GFP toujours photosensibles. Ce fut la première démonstration d'une thérapie génique dans un modèle murin sans sélection ni avantage sélectif des cellules greffées *in vivo* (Pawliuk *et al*. 1999). La greffe de cellules corrigées associées à des cellules non transduites dans des animaux secondaires a permis de montrer que l'on retrouvait la même proportion de cellules GFP positives que dans les animaux primaires. Ceci prouve d'une part que les cellules transduites étaient bien des cellules souches avec une capacité de repeuplement de la moelle osseuse mais aussi qu'aucun avantage sélectif ne s'exerçait sur les cellules corrigées.

Fontanellas et collaborateurs infectèrent *ex vivo* des cellules de moelle osseuse avec un vecteur rétroviral exprimant l'ADNc de la ferrochélatase humaine. Ils sélectionnèrent par cytométrie de flux les cellules corrigées n'accumulant plus de porphyrine et les greffèrent dans des souris PPE. Une diminution de la fluorescence des érythrocytes fut observée ainsi qu'une disparition de la photosensibilité dans les souris greffées avec des cellules sélectionnées. Les cellules non sélectionnées n'offrirent au mieux qu'une correction partielle du phénotype protoporphyrique (Fontanellas *et al*. 2001). Il est donc possible de corriger la maladie en sélectionnant les cellules sur la base de leur phénotype et non de marqueurs exogènes (GFP) potentiellement toxiques pour l'homme.

Contrairement à la PEC où les érythrocytes corrigés ont un avantage sélectif, les expériences de thérapie génique dans la PPE illustrent la nécessité de corriger un maximum de cellules

souches car elles n'ont aucun avantage sélectif. Or la correction d'un grand nombre de cellules souches (>50%) ne peut se faire efficacement avec des vecteurs rétroviraux ne transduisant que les cellules en cycle. Les vecteurs lentiviraux s'imposèrent d'eux-mêmes et une correction du modèle murin PPE fut obtenu en 2001 par transduction de cellules souches hématopoïétiques avec un lentivecteur exprimant l'ADNc de la ferrochélatase humaine sous contrôle d'un promoteur érythroïde-spécifique (Richard *et al*. 2001 et Figure 7). Les souris greffées sont corrigées et ne présentent plus de photosensibilité. Après huit mois de greffe, 80% des CFC (Colony-Forming Cells) provenant des souris secondaires possédaient le vecteur thérapeutique démontrant le bon transfert de gènes dans les cellules souches et sa stabilité d'expression. Ces expériences montrent que l'utilisation d'un promoteur érythroïde-spécifique est suffisant et préférable pour corriger des symptômes sans risquer une expression exogène du transgène trop importante.

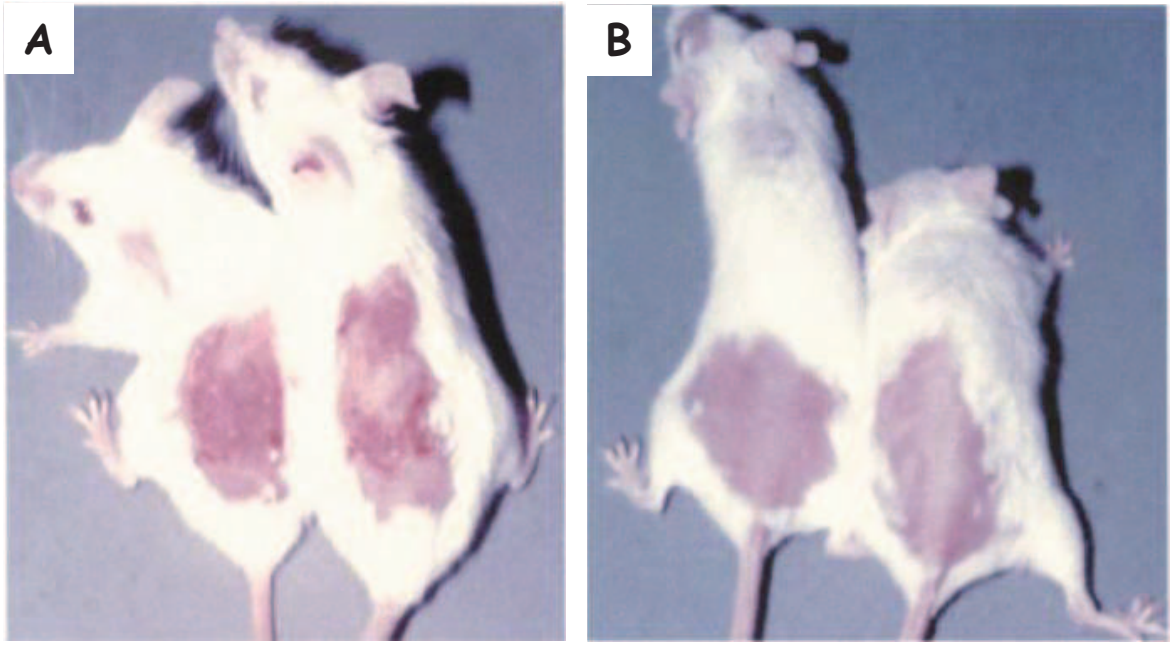


Figure 7. Test de photosensibilité dans un protocole de thérapie génique de la protoporphyrie érythropoïétique. **A)** Souris PPE BALB/c non traitées. **B)** Souris PPE BALB/c corrigées par un vecteur lentiviral thérapeutique. (Richard *et al*. 2001)

Le problème rencontré actuellement dans le cadre des transplantations de moelle osseuse est le manque de compatibilité entre donneur et accepteur. La thérapie génique chez l'homme soulève également la question du nombre de cellules souches/progénitrices de la moelle osseuse à transduire pour restaurer une activité enzymatique suffisante (40% dans le modèle murin de la PEC). De plus, dans le but de tendre vers un protocole thérapeutique adaptable à l'homme, un conditionnement sans myéloablation serait préférable, les porphyries érythropoïétiques n'étant pas des maladies génétiques malignes. Dans le cas où les cellules corrigées n'ont pas d'avantage sélectif (comme dans la PPE), il est possible de greffer des

cellules corrigées et exprimant un gène de résistance à un produit chimiothérapeutique permettant une sélection des cellules *in vivo*. La sélection de cellules *in vivo* a déjà été obtenue par l'expression de gènes de résistance comme le MDR-1 (MultiDrug Resistance protein-1), la dihydrofolate réductase (DHFR), l'O^6-méthylguanine-DNA méthyltransférase (MGMT) ou par l'expression de récepteurs de lignad pro-mitotiques comme le récepteur de l'érythropoïétine (EPO) pour la thalassémie. Cependant, la sélection utilisant les gènes MDR-1 et DHFR dans des modèles de grands animaux est variable et transitoire (Neff *et al*. 2006). Un vecteur combinant l'expression de la FECH avec le gène de résistance MGMT a été ainsi généré. Il permet la transduction de cellules souches hématopoïétiques greffées et sélectionnées *in vivo* par chimiothérapie (agents alkylants : BCNU ou temozolomide). Ce vecteur utilisé dans des lignées lymphoblastoïdes PPE, des cellules érythroleucémiques (K562) et des cellules $CD34^+$ de sang de cordon a montré la sélection des cellules transduites après chimiothérapie (Richard *et al*. 2003). Il a également permis la sélection *in vivo* de cellules souches hématopoïétiques PPE transplantées dans des souris malades et une correction complète au niveau métabolique et phénotypique aussi bien des souris primaires que secondaires (Richard *et al*. 2004). La combinaison du gène MGMT sous le contrôle d'un promoteur humain ubiquitaire PGK (Phosphoglycerate kinase) et de la FECH sous le contrôle d'un promoteur érythroïde-spécifique a permis *in vivo* la sélection des cellules souches hématopoïétiques corrigées et l'expression spécifique de la ferrochélatase dans les cellules érythroïdes corrigeant le phénotype PPE.

La thérapie génique des porphyries semble donc possible chez l'homme. Son efficacité a pu être démontrée dans les modèles murins des deux porphyries avec une correction du phénotype porphyrique. Cependant, les complications observées au cours des premiers essais cliniques pratiqués (SCID-X) suggèrent que des études restent à faire afin de sécuriser ces protocoles. De nouveaux vecteurs lentiviraux, plus sécuritaires, ont été développés par la suite mais le risque d'une mauvaise intégration est toujours présent.

La génération de cellules iPS (cellules souches pluripotentes induites = induced Pluripotent Stem cells) offre un espoir de mieux contrôler les risques inhérents à toute thérapie génique. Ces cellules sont générées à partir de cellules différenciées reprogrammées pour posséder les mêmes caractéristiques qu'une cellule souche embryonnaire : autorenouvellement et pluripotence. Il est donc possible de corriger les cellules iPS dérivées spécifiquement d'un patient et de les redifférencier dans le tissu d'intérêt. De plus, différents

clones peuvent être établis ce qui permet par diverses techniques de sélectionner une lignée possédant les intégrations provirales les moins risquées possible.

Nous avons donc réalisé un protocole de thérapie génique utilisant des cellules iPS (induced Pluripotent Stem Cells) issues de cellules de patients ou de modèles de souris porphyriques. Ces travaux seront décrits dans la 2ème et 3ème parties du chapitre Résultats.

Partie II

Cellules iPS et thérapie génique des porphyries érythropoïétiques

Il existe différents types de cellules souches ayant des potentiels et des localisations spatio-temporelles différentes. Les cellules souches totipotentes sont les seules à pouvoir reconstituer un individu complet. Elles sont présentes de la fécondation au stade 8 cellules. Les cellules souches pluripotentes sont issues de la masse interne du blastocyste. Elles sont capables de former tous les types cellulaires issus des trois feuillets embryonnaires mais ne peuvent se différencier en annexe embryonnaire (placenta provenant du trophectoderme). Les cellules souches multipotentes sont présentes dans l'embryon mais aussi dans l'organisme adulte. Il est admis qu'elles possèdent un potentiel de pluripotence plus limité que les cellules souches pluripotentes (restreint à toutes les cellules matures d'un même type de tissu). Les cellules souches unipotentes peuvent se différencier en un seul type cellulaire. Elles sont souvent impliquées dans le renouvellement d'épithélium (peau, intestin) mais également dans le foie.

Les cellules souches embryonnaires (cellules ES) sont définies par deux propriétés : l'autorenouvellement et la pluripotence. Elles sont donc capables, à chaque division cellulaire, de former deux cellules filles strictement identiques à la cellule mère et ce, de façon illimitée. Ces cellules sont également pluripotentes c'est à dire capables de se différencier en toute cellule différenciée, cette pluripotence se conservant au fil des divisions mitotiques grâce à l'autorenouvellement. Elles ne sont présentes qu'à partir d'un stade précis du développement embryonnaire : le stade blastocyste où elles forment la masse interne (ICM : Inner Cell Masse) entourée par le trophectoderme donnant naissance au placenta. Les cellules de la masse interne continuent ensuite leur prolifération et différenciation vers les différents feuillets de l'embryon (endoderme, mésoderme et ectoderme) (Figure 8).

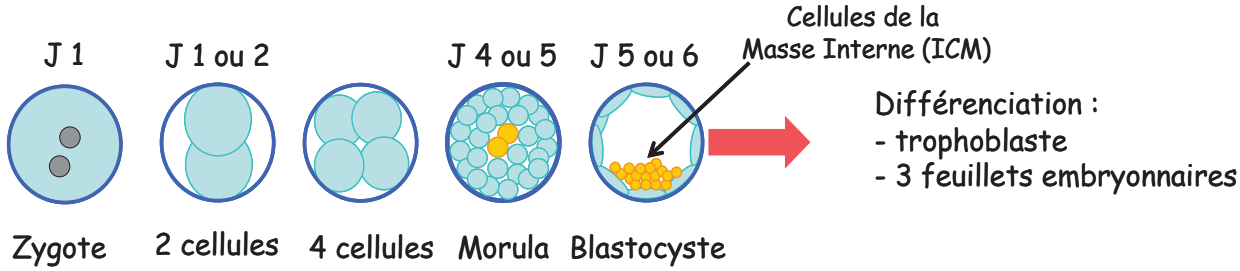


Figure 8. Embryogenèse humaine de la fécondation au stade blastocyste. Après plusieurs divisions cellulaires, l'embryon est formé de deux tissus différents : le trophoblaste participant à la formation du placenta et les cellules de la masse interne se différenciant en endoderme, mésoderme et ectoderme pour former l'embryon.

C'est de cette masse interne que les premières lignées de cellules ES murines puis humaines ont été dérivées. Plus tard, une nouvelle catégorie de cellules pluripotentes a fait son apparition : les cellules iPS (induced Pluripotent Stem cells) obtenues par

reprogrammation de cellules somatiques même totalement différenciées grâce à l'expression ectopique de facteurs de reprogrammation. Les capacités d'autorenouvellement et de différenciation de ces différents types de cellules souches ont enthousiasmé les chercheurs et médecins depuis les années 1950 qui les ont placées au centre des protocoles de modélisation de pathologies, criblage de médicaments, génération de modèles murins et bien entendu de thérapies cellulaire et génique.
Dans notre étude des protocoles thérapeutiques des porphyries, nous discuterons l'utilisation des cellules souches hématopoïétiques (multipotentes) en thérapie cellulaire et de cellules souches pluripotentes (iPS) en thérapie génique.

II- 1) Les cellules souches embryonnaires (cellules ES)

II-1-1) Les cellules souches embryonnaires murines

a) Historique

Les premières études sur les cellules souches pluripotentes concernaient les cellules à l'origine de la récidive des tératocarcinomes. Ces tumeurs malignes sont composées de cellules différenciées issues d'une deuxième population tumorale souche : les cellules souches embryonnaires de carcinome (Embryonal Carcinoma Cells : cellules EC). Ces cellules sont douées de pluripotence et d'autorenouvellement. Même à l'état unicellulaire, les EC sont capables d'induire la formation d'un tératocarcinome composé de tissus différenciés issus des trois feuillets embryonnaires (Kleinsmith et Pierce, 1964). Des lignées cellulaires d'EC ont pu être générées à partir de tératocarcinomes mais beaucoup d'entre elles ont montré une aptitude réduite à participer à l'élaboration de souris chimériques. En effet, bien que proches des cellules ES, ces cellules EC restent des cellules cancéreuses dont les mutations génétiques, accumulées au cours du processus de transformation, engendrent une perte de pluripotence (Kahan et Ephrussi, 1970 ; Atkin *et al*. 1974).

b) Les cellules ES murines

Les premières lignées de cellules souches embryonnaires murines ont été dérivées en 1981 par deux équipes différentes (Evans et Kaufman, 1981 ; Martin, 1981). Ces lignées,

établies à partir de cellules de la masse interne d'un blastocyste, sont cultivées dans les mêmes conditions que les cellules EC : en présence de sérum de veau fœtal (entre 10 et 20%) et sur un stroma de fibroblastes embryonnaires. Les lignées de cellules ES présentent les mêmes caractéristiques que les cellules EC : morphologie identique, autorenouvellement et pluripotence. *In vitro*, elles forment des corps embryoïdes quand elles sont ensemencées sans stroma. *In vivo*, quand elles sont injectées chez la souris par voie sous-cutanée, elles forment des tératocarcinomes où est présente une grande variété de tissus issus des trois feuillets embryonnaires. Les cellules ES possédant un caryotype normal, elles participent au développement embryonnaire lors de leur implantation dans des blastocystes et à la formation de souris chimériques (Bradley *et al*. 1984).

c) Culture et caractéristiques des cellules ES murines

La culture des cellules pluripotentes en général est complexe : il est nécessaire de trouver et conserver les conditions permettant aux cellules de proliférer tout en conservant leur pluripotence. Elles sont souvent cultivées sur un stroma « feeder » (cellules nourricières) composé de fibroblastes embryonnaires. Anciennement, les cellules STO (résistante à la 6-thioguanine et à l'ouabaïne) étaient utilisées mais d'autres protocoles existent employant des MEF (Mouse Embryonic Fibroblasts) issus d'embryons murins de stade E10,5 à E14,5. Le stroma est traité à la mitomycine-C ou irradié afin de générer des cassures double brin de l'ADN et de stopper sa prolifération. Il est ensuite capable de maintenir l'état pluripotent des cellules ES en sécrétant des facteurs dont le Leukemia Inhibitory Factor (LIF). Cette cytokine (de la famille des interleukines 6) est une glycoprotéine agissant via son récepteur hétéromérique composé des sous-unités gp130 et gp190. Le LIF permet la dimérisation de son récepteur et entraîne l'activation des voies JAK/STAT3 et ShP2/ERK2 MAPK (Yoshida *et al*. 1994 ; Takahashi-Tezuka *et al*. 1998). La première confère la propriété d'autorenouvellement du LIF et la seconde inhibe la prolifération des cellules ES. L'effet du LIF est donc minutieusement dosé par ses deux voies de signalisation issues du même récepteur. Cette cytokine permet, en présence de sérum, de cultiver les cellules ES sans stroma sur une surface traitée (gélatine, matrigel…). Les ligands BMP (Bone Morphogenetic Proteins) participent également au maintien de l'autorenouvellement dans les cellules ES murines (Ying *et al*. 2003). La signalisation des BMP passe par l'activation des protéines SMAD. Les SMAD permettent l'expression des gènes Id (pour « Inhibitor of Differenciation ») qui bloquent uniquement la différenciation ectodermique mais favorise la différenciation vers le

mésoderme et l'endoderme. STAT3, phosphorylé en réponse à la fixation du LIF sur son récepteur, inhibe SMAD et donc la différenciation mésodermique. La coopération des voies de signalisations LIF/STAT3 et BMP/SMAD est donc un équilibre d'activation et de répression où les deux actions permettent un maintien de la pluripotence nécessaire à l'autorenouvellement (Figure 9).

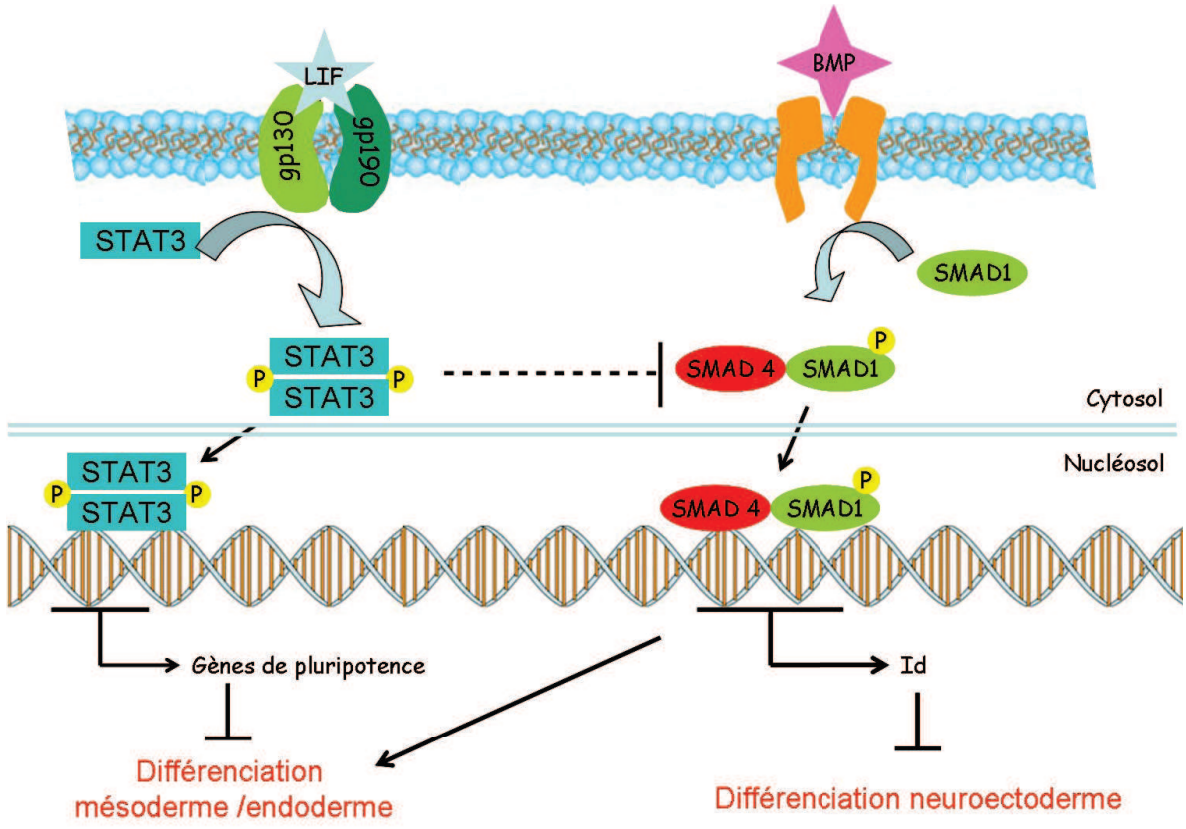


Figure 9. Voies de signalisations intracellulaires contribuant au maintien de la pluripotence dans les cellules ES murines. La fixation du ligand LIF entraîne la dimérisation des récepteurs gp130 et gp190 favorisant la phosphorylation de STAT3 et sa dimérisation. Le dimère peut migrer dans le noyau et stimuler l'expression des gènes impliqués dans le maintien de la pluripotence. Parallèlement, la fixation de BMP sur son récepteur permet la phosphorylation de SMAD1. Une fois activé, SMAD1 lie SMAD4 et migre dans le noyau pour activer l'expression des protéines Id inhibant la différenciation neuroectodermique mais favorisant la différenciation en mésoderme et endoderme. Cette différenciation est inhibée par la voie du LIF. STAT3 phosphorylé semble également impliqué dans l'inhibition directe de la voie BMP. (D'après Ying *et al*. 2003)

Les cellules ES murines sont de petites cellules proliférant en colonies arrondies. La différenciation cellulaire qui apparaît parfois au bord de ces colonies est aisément repérable par la présence de cellules étalées morphologiquement différentes du reste de la colonie (Figure 10). Les cellules ES sont caractérisées par l'expression de plusieurs marqueurs membranaires (phosphatase alcaline, SSEA-1…) ou intracellulaires (Oct4, Sox2, Nanog…) (voir Tableau 6). La télomérase est également exprimée et active. La télomérase est un complexe ribonucléoprotéique composé d'une sous-unité protéique appelée TERT (TElomerase Reverse Transcriptase) et d'un ARN Terc. Ce complexe ajoute, lors de la

division cellulaire, une répétition de six séquences nucléiques « TTAGGG » appelée télomère permettant la protection de l'extrémité des chromosomes lors de chaque division (Blasco, 2007 ; Lange, 2005). Dans les cellules différenciées, le gène TERT n'est le plus souvent plus exprimé et la division cellulaire entraîne un raccourcissement des télomères reconnut par la cellule comme un signal la faisant entrer en sénescence ou en apoptose (Harley, 1991). L'expression de TERT dans les cellules ES les protège donc d'un vieillissement cellulaire et permet leur autorenouvellement.

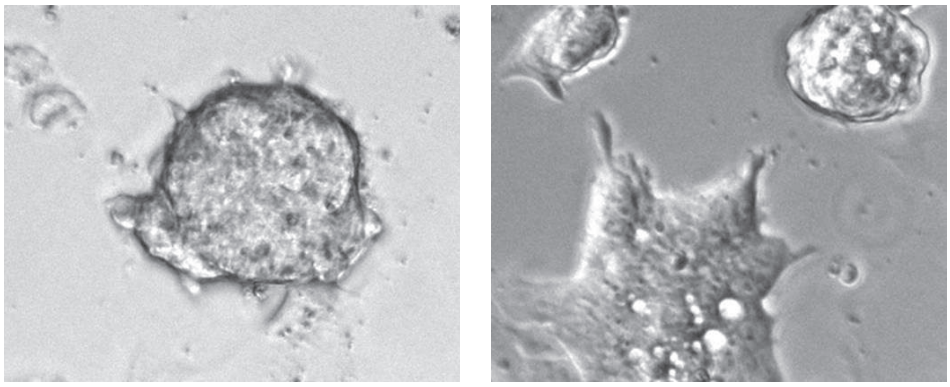


Figure 10. Culture de cellules ES murines CGR8. A) Les cellules ES poussent en colonies rondes au bord lisse et en relief. B) Lorsqu'elles se différencient, les cellules s'étalent et les colonies perdent leur aspect arrondi. (Images obtenues au laboratoire - Contraste de phase, 10x)

II-1-2) Cellules souches embryonnaires humaines

Bien que la souris soit le modèle mammifère expérimental le plus couramment utilisé, de nombreuses structures embryonnaires diffèrent entre ce modèle et l'homme (placenta, membranes extra-embryonnaires…). Il était donc indispensable de générer des lignées de cellules ES humaines afin de mieux comprendre les étapes du développement embryonnaire humain et permettre d'étudier les fonctions des tissus différents du modèle murin ou encore d'élucider les principes de différenciation de ces cellules dans le cadre de futures thérapies cellulaires.

a) Les cellules ES humaines

La première lignée de cellules souches embryonnaires humaines (hES) a été dérivée en 1998, soit 17 ans après la première lignée de cellules souches embryonnaires murines (Thomson *et al*. 1998). Elle provient de cellules de la masse interne d'un blastocyste. Les chercheurs maîtrisant les conditions de dérivations des cellules embryonnaires murines, ils ont

tenté de copier ce protocole pour leurs homologues humaines. Or, la culture des cellules ES humaines en présence de sérum et de LIF, assurant la pluripotence des cellules ES murines, n'entraîne que la différenciation des cellules ES humaines (Bongso *et al*. 1994). La culture de ces cellules dans ces conditions permet le maintien de la pluripotence sur deux passages et non pas la dérivation d'une lignée comme dans le cas des cellules murines, ce qui explique ce laps de temps important. La dérivation de lignées ES de primates non-humains, macaque rhésus (*Macaca mulatta* – Thomson *et al*. 1995) puis marmoset (*Callithrix jacchus* – Thomson *et al*. 1996), ont permis de mettre au point la technique et les conditions de cultures nécessaires aux cellules ES humaines.

b) Culture et caractéristiques des cellules ES humaines

Des embryons surnuméraires générés lors de fécondation *in vitro* (FIV) ont été cultivés jusqu'au stade blastocyste (après que la procédure soit acceptée par l'Institutional Review Board (IRB)). Les cellules de la masse interne ont été isolées et cultivées sur un stroma feeder de MEF. Les cellules ES humaines poussent en colonies aplaties similaires à celles obtenues avec les ES de macaque rhésus (Figure 11). Les cellules possèdent un ratio noyau/cytoplasme élevé et des nucléoles bien visibles. Les lignées cellulaires dérivées possèdent un caryotype normal et le conservent même après plusieurs passages. Comme dans le cas des cellules ES murines, un haut niveau d'expression de l'activité télomérase est observé expliquant comment les cellules ont pu être entretenues pendant 8 mois consécutifs sans entrer en sénescence. Les cellules expriment des marqueurs spécifiquement embryonnaires retrouvés sur les cellules ES de primates ainsi que sur les cellules EC humaines : SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, phosphatase alcaline… (Tableau 6). La pluripotence des cellules ES est prouvée *in vivo* par la formation de tératomes après injection des cellules par voie sous-cutanée dans des souris immunodéficientes SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency : Syndrome de l'immunodéficience sévère combinée). Des tissus différenciés issus des trois feuillets germinaux embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme) ont été observés. *In vitro*, les cellules ES se différencient dès qu'elles sont cultivées sans stroma MEF en présence ou non de LIF. Sur stroma, les cellules ES, dont la confluence est trop importante, se différencient (présence dans le milieu d'hormone gonadotropique chorionique et d'α-fœtoprotéine indiquant une différenciation en trophoblaste et endoderme) (Thomson *et al*. 1998).

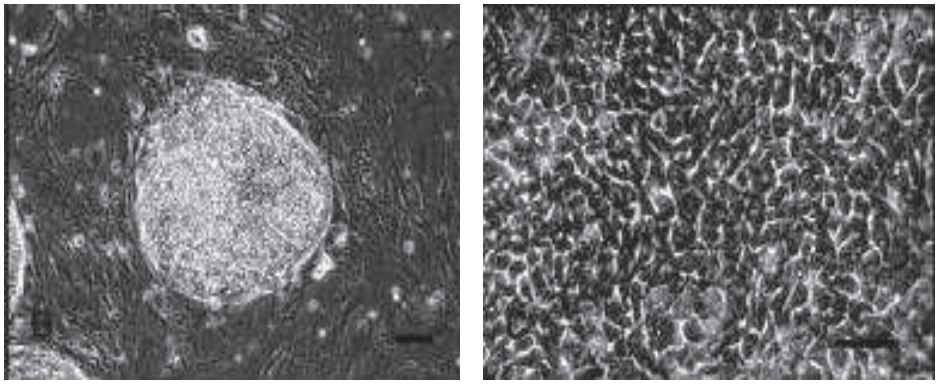


Figure 11. Culture de cellules ES humaines. A) Colonie de la lignée de cellules ES humaines H9 : les cellules poussent en colonies rondes au bord lisse et en monocouche. Echelle 100µm. B) Cellules ES humaines H9. Echelle 50µm. (D'après Thomson *et al*. 1998)

Contrairement aux cellules ES murines, les cellules souches embryonnaires humaines ne nécessitent pas l'adjonction de LIF dans le milieu de culture pour conserver leur état pluripotent. Un stroma de fibroblastes murins embryonnaires est par contre le plus souvent indispensable. En 2005, James et collaborateurs démontrent l'implication de la voie TGFβ/Activine/Nodal dans le maintien de la pluripotence dans les cellules ES humaines (James *et al*. 2005). Cette voie de signalisation est connue pour avoir des fonctions pléïotropiques incluant le contrôle de la prolifération, différenciation, adhésion cellulaire et apoptose (Chng *et al*. 2011). La superfamille du TGFβ comprend de nombreux ligands (~40) dont l'Activine et Nodal, qui se fixent sur un récepteur au TGFβ de type II. Ce dernier phosphoryle et active un récepteur au TGFβ de type I (connu sous le nom de ALK pour Activin receptor-Like Kinase) qui est à l'origine d'une voie de signalisation intracellulaire spécifique. Selon le ligand fixé, il détermine la voie de signalisation intracellulaire activée. La fixation de BMP (Bone Morphogenetic Protein) conduit à la phosphorylation et à l'activation de SMAD1/5/8 via l'activation de ALK1, ALK 2, ALK3 et ALK6. La fixation du TGβ, Activine ou Nodal par ALK4, ALK5 ou ALK7 conduit à la phosphorylation de SMAD2/3. Une fois activées par phosphorylation, les protéines SMAD1/5/8 ou SMAD2/3 s'associent avec SMAD4 pour transloquer dans le noyau et activer la transcription de gènes cibles (Figure 12).

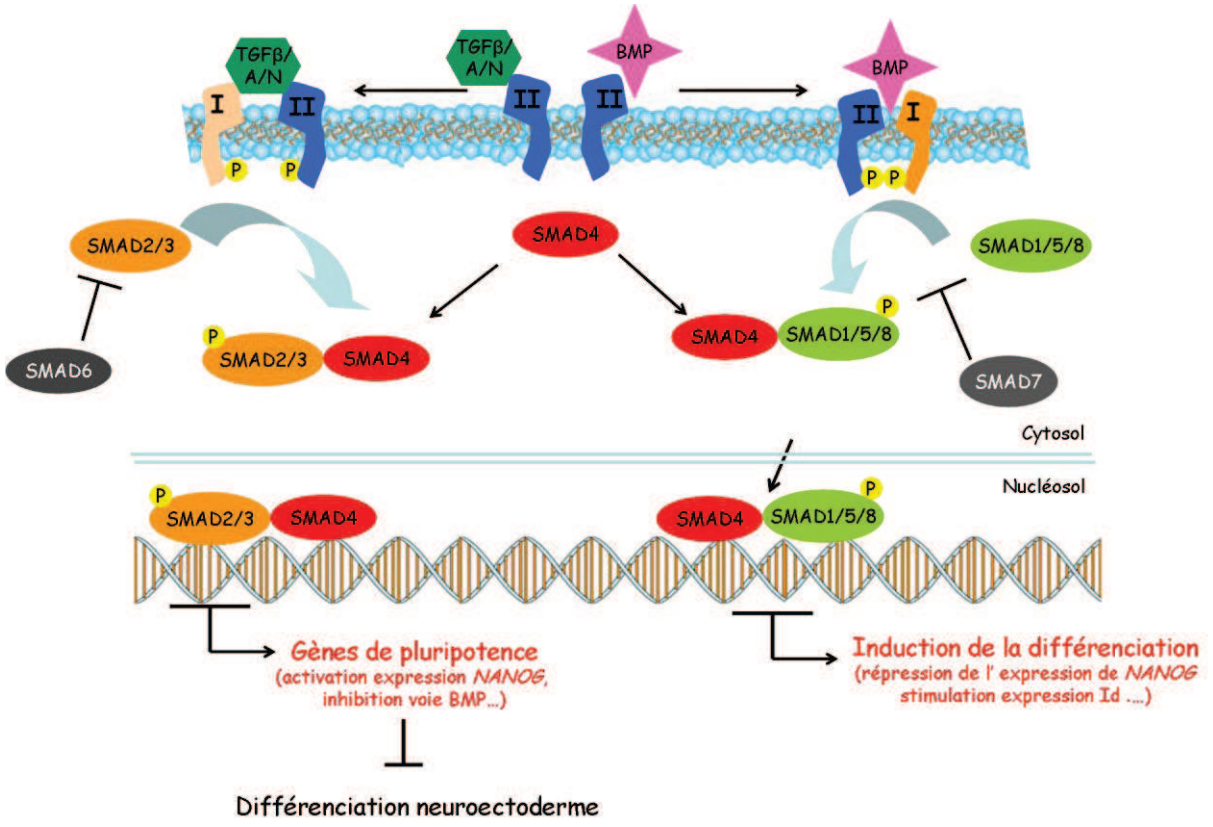


Figure 12. Voies de signalisations intracellulaires contribuant au maintien ou à la répression de la pluripotence dans les cellules ES humaines. La fixation du ligand (TGFβ, Activine A ou Nodal) entraîne la dimérisation des récepteurs au TGFβ et la phosphorylation de SMAD2/3. L'association de SMAD2/3 avec SMAD4 permet le transport du complexe dans le noyau pour induire l'expression des gènes de pluripotence (dont la fixation sur le promoteur de *NANOG* directement) et inhibiteur de la différenciation neuroectodermique. La fixation du BMP entraîne également la dimérisation d'un autre couple de récepteur au TGFβ et stimule la phosphorylation activatrice de SMAD1/5/8. Après liaison avec SMAD4, le complexe est adressé au noyau où il stimule l'expression de gènes de différenciation ou inhibe les gènes responsables du maintien de la pluripotence (dont *NANOG*). Les protéines SMAD6 et SMAD7 inhibent SMAD2/3 et la voies du récepteur au BMP respectivement. A : Activine, N : Nodal. (D'après Chng *et al*. 2011)

L'inhibition de la voie TGFβ/Activine/Nodal entraîne une diminution de la phosphorylation de SMAD2/3 et une perte de l'expression de Oct3/4 et Nanog tout en augmentant la phosphorylation de SMAD1/5. L'Activine A participe au support de la pluripotence des cellules ES humaines via l'activation du complexe SMAD2/3 mais sa phosphorylation seule, sans stroma ou milieu conditionné MEF, n'est pas suffisante pour maintenir une morphologie d'ES typique et l'expression des marqueurs de pluripotence (James *et al*. 2005). Le maintien de la pluripotence des ES humaines sans stroma sur le long terme nécessite une forte stimulation de la voie TGFβ/activine/Nodal : après 10 passages, 100ng/ml de Nodal permettent de maintenir 50% des cellules exprimant des facteurs de pluripotence contrairement au FGF2 (ou bFGF pour basique Fibroblasts Growth Factor, 40ng/ml) ou activine (10ng/ml) seul (3% et 25% respectivement après 5 passages seulement). Les combinaisons FGF2 + activine ou FGF2 + Nodal sont suffisantes pour observer l'expression de marqueurs de pluripotence des cellules souches embryonnaires humaines suggérant une

synergie des voies FGF et TGFβ/activine/Nodal dans le maintien de la pluripotence de ces cellules (Vallier *et al*. 2005). Les voies ERK et PI3K semblent également stimulées par l'activation de la voie du FGF et impliquées dans le maintien de l'autorenouvellement des cellules ES humaines, même si toutes les étapes des voies de signalisation ne sont pas encore connues (Li *et al*. 2007).

Un milieu non conditionné par des MEF entraîne rapidement la différenciation des cellules ES humaines. Xu et collaborateurs démontrent que cette différenciation est causée, au moins partiellement, par la voie de signalisation induite par les ligands BMP contrairement à ses effets sur les cellules ES murines (Xu *et al*. 2006 ; Ying *et al*. 2003). La fixation de BMP2 ou de BMP4 entraîne la phosphorylation de SMAD1 stimulant l'expression des gènes Id favorisant la différenciation. Cette signalisation intracellulaire est inhibée par le bFGF qui permet une expansion clonale de cellules ES humaines sur stroma et même sans stroma quand il est ajouté au milieu à forte concentration (100ng/ml) (Xu *et al*. 2006). Le bFGF entraîne la surexpression de ligands TGFβ par les cellules stromales ainsi que par les ES (Greber *et al*. 2007). L'inhibition de la voie TGFβ par le SU5402 (inhibiteur ATP-compétitif pour l'activité tyrosine kinase du récepteur) cause la différenciation cellulaire. Le TGFb est également impliqué dans le maintien de l'autorenouvellement via l'activation des voies intracellulaires ERK et PI3K (Levenstein *et al*. 2006 ; Li *et al*. 2007 ; Greber *et al*. 2007).

L'activation de la voie Wnt par BIO, un inhibiteur de la GSK3 (Glycogen synthase kinase 3), permet également de maintenir la pluripotence des cellules ES murines et humaines même en absence d'un stroma MEF (Sato *et al*. 2004). Cet inhibiteur agit en stimulant la voie Wnt et la phosphorylation des SMAD2/3 entraînant l'expression de gènes de pluripotence dont Oct3/4 et Nanog. Dans les cellules différenciées, SMAD2/3 n'est plus phosphorylé contrairement à SMAD1/5.

c) Les cellules ES humaines : science, éthique et législation.

La dérivation de lignées de cellules ES humaines représentent une grande avancée dans la compréhension du développement embryonnaire humain mais également dans la perspective de leur utilisation en médecine régénérative (Alzheimer, Parkinson, dystrophies musculaires…). Mais leur grand intérêt n'occulte pas leur origine embryonnaire engendrant un problème éthique important. Avant le mois de Juillet 2004, la législation française interdisait l'utilisation d'embryons surnuméraires issus de FIV y compris pour la recherche. Seul était autorisé, l'établissement de lignées de cellules souches à partir d'embryons issus

d'avortements naturels ou provoqués. En Juillet 2004, la France légiférait sur la question des cellules souches et de l'utilisation d'embryons humains en recherche :

Art. 16-4 (troisième alinéa). - Est interdite toute intervention ayant pour but de faire naître un enfant génétiquement identique à une autre personne vivante ou décédée.

Art. L. 2151-2. - La conception *in vitro* d'embryon ou la constitution par clonage d'embryon humain à des fins de recherche est interdite.

Art. L. 2151-4. - Est également interdite toute constitution par clonage d'un embryon humain à des fins thérapeutiques.

Art. L. 2151-5. - La recherche sur l'embryon humain est interdite. Une recherche ne peut être conduite que sur les embryons conçus *in vitro* dans le cadre d'une assistance médicale à la procréation qui ne font plus l'objet d'un projet parental (http://www.legifrance.gouv.fr).

Cette législation, contestée par beaucoup de scientifiques, est considérée comme un frein aux recherches françaises sur les cellules souches humaines. Ces mêmes recherches étant autorisées dans d'autres pays (Etats-Unis, Japon, Brésil, Suisse, Belgique…). Les dérogations apportées contraignent les chercheurs à justifier d'une activité de recherche à application thérapeutique rapide.

La loi de Bioéthique adoptée en 2011 par le parlement français réaffirme l'interdiction d'études sur l'embryon humain et sur les cellules souches embryonnaires humaines en dehors de dérogations accordées par l'agence de biomédecine si les conditions suivantes sont réunies :

« 1° La pertinence scientifique du projet de recherche est établie.

2° La recherche est susceptible de permettre des progrès médicaux majeurs.

3° Il est expressément établi qu'il est impossible de parvenir au résultat escompté par le biais d'une recherche ne recourant pas à des embryons humains, des cellules souches embryonnaires ou des lignées de cellules souches.

4° Le projet de recherche et les conditions de mise en œuvre du protocole respectent les principes éthiques relatifs à la recherche sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires.

Les recherches alternatives à celles sur l'embryon humain et conformes à l'éthique doivent être favorisées. » Code de la santé publique - Article L2151-5.

L'article R2151-1, modifié par le Décret n°2012-467 du 11 avril 2012 – art. 1, autorise (après accord de l'Agence de biomédecine) les recherches fondamentales sur les cellules souches dans le cas où elles seraient susceptibles de permettre des progrès médicaux majeurs en matière de prévention, de diagnostic ou de soins et que l'utilisation d'autres moyens (y compris d'autres cellules souches) ne permette pas d'obtenir le résultat escompté.

II-2) Les cellules souches pluripotentes induites (iPS)

Les cellules pluripotentes embryonnaires ont permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'embryogenèse notamment humaine et d'espérer faire des avancées de portée thérapeutique grâce à la médecine régénérative et au criblage de médicaments. Mais leur origine a toujours posé un problème éthique. Les cellules iPS contournent cette complication : en effet, ces cellules pluripotentes étant dérivées de cellules somatiques, rien ne s'oppose à leur utilisation en recherche. Elles présentent également l'avantage de ne plus poser de contraintes de compatibilité immunologique dans le cas de leur utilisation en thérapies cellulaire ou génique. En effet, les cellules iPS pouvant être dérivées de cellules somatiques de patients, il est possible de créer des « cellules-médicaments » spécifiques à chaque patient et donc totalement compatible avec lui.

II-2-1) Génération et culture des cellules iPS murines

Takahashi et Yamanaka en 2006 publient dans la revue scientifique Cell la génération de cellules souches pluripotentes induites (iPS pour induced Pluripotent Stem) issues de la reprogrammation de fibroblastes embryonnaires murins (MEF, Takahashi et Yamanaka, 2006). Ses travaux sur l'induction de la pluripotence dans les cellules différenciées ont permis à Yamanaka de recevoir le prix Nobel en Octobre 2012. Etudiant l'expression de nombreux gènes dans les cellules ES murines, Takahashi et Yamanaka clonèrent 24 gènes sensés jouer un rôle central dans le maintien de la pluripotence de ces cellules. L'induction de l'expression de ces gènes dans des fibroblastes (cultivés sur un stroma STO en milieu de culture ES (LIF), s'est faite à l'aide de vecteurs rétroviraux. Afin de détecter les cellules devenues pluripotentes, un gène de résistance au G418 a été placé sous contrôle du promoteur Fbx15 par recombinaison homologue. Ce gène est exprimé spécifiquement par les cellules ES et dans l'embryon même si il n'est pas indispensable au maintien de la pluripotence. Il est régulé par le facteur de transcription Oct3/4. Aucune colonie résistante n'a pu être obtenue par transduction d'un seul facteur, mais 12 colonies apparurent en transduisant les fibroblastes avec les 24 facteurs. Après de nombreuses combinaisons de facteurs, un cocktail de 4 facteurs essentiels a pu être décrit : Oct3/4, Sox2, Klf4 et c-Myc. La transduction de ces 4 facteurs permet la génération de colonies ayant des similitudes morphologiques avec les cellules ES murines : colonies rondes, aux petites cellules avec un grand noyau et un cytoplasme limité. Ces colonies expriment de plus les marqueurs de pluripotence retrouvés dans les cellules ES : Nanog, Oct3/4, Cripto, ERas, phosphatase alcaline, SSEA1 (retrouvé par RT-PCR ou

immunocytochimie), expression forte de l'activité télomérase. L'étude de la méthylation des promoteurs de Nanog et Fbx15 révèle une déméthylation très importante de ces promoteurs dans les lignées iPS formées contrairement aux fibroblastes d'origine. Ces cellules sont également capables de former des tératomes quand elles sont injectées dans des souris immunodéficientes. Ces tératomes sont composés de tissus différenciés ayant pour origine les trois feuillets embryonnaires. La pluripotence de ces cellules a finalement été démontrée par leur participation à tous les tissus de l'embryon dans une expérience de transplantation dans des blastocystes (même si les souris chimériques ne survivent pas jusqu'au terme).

La première reprogrammation a consisté en la transduction de fibroblastes murins par des vecteurs rétroviraux. Plus tard, les cellules iPS ont été générées à partir de multiples cellules différenciées et selon des méthodes de reprogrammation variées (cf. Tableau 7). Le maintien de la pluripotence est assuré par un stroma de fibroblastes embryonnaires (cellules STO ou MEF) et par l'ajout de LIF dans le milieu de culture. Ces cellules peuvent également être cultivées sur de la gélatine évitant ainsi la contamination avec des cellules stromales lors de protocole de thérapie cellulaire ou génique.
L'efficacité de reprogrammation obtenue par cette technique est d'environ 0,02% sachant qu'elle est surestimée étant donné que la sélection sur la base d'une expression de Fbx15 ne permet pas de conclure à l'entière pluripotence de ces cellules. La reprogrammation est un processus long : environ un mois est nécessaire pour la génération de cellules iPS à partir de fibroblastes murins.

En 2007, l'équipe de Yamanaka et celle de Jaenisch réussissent à générer des iPS murines capables de participer au développement de souris chimériques viables (Okita *et al*. 2007 ; Wernig *et al*. 2007). Les mêmes facteurs inducteurs ont été utilisés mais le critère de sélection des clones fut l'expression des protéines Oct3/4 endogène et Nanog et non de Fbx15. Dans ce cas, les lignées iPS sélectionnées possèdent tous les marqueurs de pluripotence précédemment décrits et possèdent de plus un profil de méthylation beaucoup plus proche de celui des cellules ES (promoteurs des gènes Oct3/4 et Nanog majoritairement déméthylés). La production de souris chimériques viables et fertiles capables de transmettre le matériel génétique de la cellule somatique d'origine prouve que la sélection par Nanog et Oct3/4 permet d'obtenir des cellules iPS véritablement pluripotentes. Le test de complémentation tétraploïde, effectué dans l'étude de Wernig et collaborateurs, parvient à montrer la génération d'embryons issus entièrement d'iPS mais ne survivant pas jusqu'au terme (mort la plus tardive des embryons au stade E14,5, Wernig *et al*. 2007). L'entière

pluripotence des cellules iPS a pu être prouvée par Zhao et collaborateurs en 2009 par la génération de souris viables suite à un protocole de complémentation tétraploïde confirmant de ce fait que le potentiel de pluripotence des cellules iPS est véritablement proche de celui des cellules ES (Zhao *et al*. 2009).

II-2-2) Génération et culture des cellules iPS humaines

Les cellules iPS humaines ont été générées pour la première fois par l'équipe déjà responsable de la création des cellules iPS murines (Takahashi *et al*. 2007). Elles ont été obtenues par transduction rétrovirale des quatre facteurs utilisés précédemment : Oct3/4, Sox2, Klf4 et c-Myc. Un mois plus tard, une autre équipe réalise également cette reprogrammation mais par transduction de vecteurs lentiviraux exprimant un cocktail de facteurs différent : Oct3/4, Sox2, Nanog et Lin28 (Yu *et al*. 2007). Dans les deux cas, les cellules reprogrammées sont des fibroblastes humains primaires. L'efficacité de reprogrammation rapportée est faible : environ 0,022%. La reprogrammation, comme dans le cas des cellules iPS murines est longue, entre 20 et 30 jours sont nécessaires avant de pouvoir dériver les colonies apparues vers le 12ème jour. Les cellules reprogrammées poussent en colonies rondes et plates et présentent une morphologie proches des cellules ES humaines. Elles expriment les marqueurs embryonnaires (SSEA3, SSEA4, phosphatase alcaline, Tra-1-60, Tra-1-81, Rex1) ainsi que les gènes Oct3/4, Sox2, Nanog, hTERT connus pour leur implication dans le maintien de la pluripotence et de l'autorenouvellement. L'étude de la méthylation de l'ADN des iPS révèle que les promoteurs des gènes Oct3/4, Sox2 et Rex1 sont déméthylés contrairement aux cellules différenciées de départ et en accord avec le profil de méthylation des ES humaines. Même si il existe quelques variations d'expression sur certains gènes entre les différents clones iPS générés, ces différences ne sont pas plus importantes que celles observées entre différentes lignées de cellules ES humaines (Yu *et al*. 2007). En outre, la luciférase, sous contrôle des promoteurs de Oct3/4 ou de Rex1, montre une activité transcriptionnelle importante dans les cellules iPS humaines mais pas dans les fibroblastes d'origine (Takahashi *et al*. 2007). Les cellules ensemencées sur une boîte non adhérente, sans stroma ni bFGF, forment des corps embryoïdes capables de se différencier en cellules exprimant des marqueurs des trois feuillets germinaux embryonnaires. *In vivo*, l'injection des cellules iPS humaines par voie sous-cutanée dans des souris immunodéficientes entraîne la formation de tératomes composés de tissus différenciés issus des trois feuillets germinaux primaires.

Comme dans le cas des cellules ES humaines, les cellules iPS humaines nécessitent un stroma de fibroblastes embryonnaires murins inactivés et un milieu complété avec du bFGF pour conserver leurs capacités de pluripotence et d'autorenouvellement.

	Marqueurs de pluripotence	Cellules ES		Cellules iPS	
		Murines	Humaines	Murines	Humaines
Facteurs de transcription	Oct3/4	+	+	+	+
	Sox2	+	+	+	+
	Nanog	+	+	+	+
	Rex1	+	+	+	+
Antigènes membranaires	SSEA1	+	-	+	-
	SSEA3	-	+	-	+
	SSEA4	-	+	-	+
	Tra-1-60	-	+	-	+
	Tra-1-81	-	+	-	+
	Activité télomérase	+	+	+	+

Tableau 6. Marqueurs de pluripotence exprimés par les cellules pluripotentes (ES et iPS) murines et humaines. Ces marqueurs sont utilisables pour la caractérisation des cellules iPS lors de leur génération.

II-2-3) Méthodes de reprogrammation et biosécurité des cellules iPS

La reprogrammation de cellules se fait de manière semblable quelque soit l'espèce d'origine des cellules différenciées utilisées : humain (Takahashi *et al*. 2007 ; Yu *et al*. 2007; Lowry *et al*. 2008; Park *et al*. 2008), souris (Takahashi et Yamanaka, 2006 ; Maherali *et al*. 2007 ; Okita *et al*. 2007 ; Wernig *et al*. 2007), rat (Li *et al*. 2009), porc (Wu *et al*. 2009), macaque rhésus (Liu *et al*. 2008). La reprogrammation nécessite les mêmes facteurs inducteurs et il possible de reprogrammer un grand nombre de cellules plus ou moins différenciées (fibroblastes, lymphocytes et autres cellules hématopoïétiques, estomac et cellules hépatiques, progéniteurs neuraux, kératinocytes, mélanocytes, cellules β-pancréatiques, adipocytes… (Aasen *et al*. 2008 ; Aoi *et al*. 2008 ; Hanna *et al*. 2007 ; Stadtfeld *et al*. 2008 ; Kim *et al*. 2008 ; Utikal *et al*. 2009, Sun et al. 2009).

a) Facteurs de reprogrammation

La pluripotence des cellules iPS est induite par l'action de facteurs de transcription exogènes. Ces facteurs sont des gènes maîtres induisant l'expression de nombreux autres gènes conduisant à une cascade d'activation et de répression de gènes permettant le maintien de la pluripotence. Les facteurs de reprogrammation les plus couramment utilisés sont Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog et Lin28. Les séquences des « quatre facteurs de Yamanaka » (OSKM) étant très conservées, il est possible de reprogrammer des cellules murines et humaines avec les séquences murines ou humaines de ces facteurs de transcription (Chang *et al*. 2009). Ces facteurs sont tous exprimés fortement dans les cellules souches embryonnaires pluripotentes et ont chacun un rôle dans le maintien de l'état souche :

- Oct3/4 ou Oct4 (Octamer-binding transcription factor 4 ou POU5F1 : POU domain, class 5, transcription Factor 1) est un facteur de transcription à homéodomaine liant l'ADN (Lui *et al*. 2008). Il est essentiel à la pluripotence des cellules de masse interne du blastocyste : sans son expression, ces cellules se différencient en cellules de lignées extraembryonnaires (trophoblaste) et n'ont plus la capacité de former les feuillets embryonnaires (Nichols *et al*. 1998). Oct4 coopère avec de nombreux facteurs pour établir la pluripotence (dont Nanog et Sox2). Des études protéomiques menées dans des cellules ES murines montrent qu'il peut interagir avec au moins 92 protéines différentes, ce qui implique que le contexte intracellulaire joue un rôle prépondérant dans la reprogrammation (Wang *et al*. 2012). Oct4 forme notamment un hétérodimère avec Sox2 afin de se fixer sur le promoteur de Nanog et stimuler son expression (Rodda *et al*. 2005). La régulation d'Oct4 est essentielle au maintien de la pluripotence. En effet, une expression augmentée d'un facteur 2 dans les cellules ES entraîne la différenciation en endoderme et mésoderme primitifs alors qu'une répression d'un facteur 2 de son expression conduit à une perte de la pluripotence et à une différenciation des cellules vers le trophectoderme (Niwa *et al*. 2000).

- Sox2 (SRY-related HMG box 2) est un facteur de transcription possédant un domaine de liaison à l'ADN. Sox2 joue un rôle important dans la pluripotence et la capacité d'autorenouvellement des cellules embryonnaires. Sox2 forme un hétérodimère avec Oct4 pour réguler l'expression de facteurs clés de la pluripotence (Oct4, Sox2 et Nanog) (Avilion *et al*. 2003 ; Masui *et al*. 2007). Oct4 et Sox2 sont exprimés dans les cellules de la masse interne, dans l'épiblaste et dans la lignée germinale. Sox2 est également exprimée dans les cellules multipotentes de l'ectoderme extraembryonnaire. Sa répression entraîne une

différenciation des cellules. Cependant, son expression n'est pas essentielle au maintien de la pluripotence ou à la reprogrammation cellulaire si une surexpression d'Oct4 ou des inhibiteurs de la voie TGFβ sont utilisés (Masui *et al*. 2007 ; Ichida *et al*. 2009 ; Maherali et Hochedlinger, 2009). Ceci grâce au fait qu'Oct4 est capable de lier d'autres protéines afin de maintenir l'expression des autres facteurs de pluripotence.

- Krüppel-like zinc finger transcription factor 4 (Klf4) est un facteur de transcription à doigts de zinc liant l'ADN entraînant l'activation ou la répression de la transcription. Il fonctionne soit comme une oncoprotéine, soit comme un suppresseur de tumeur selon le contexte cellulaire (Rowland et Peeper, 2006). Il est exprimé dans les cellules ES et iPS humaines et murines. Il est impliqué dans le maintien de l'autorenouvellement et inhibe la différenciation des cellules ES quand il est surexprimé *in vitro* (Li *et al*. 2005). Il régule positivement l'expression de Sox2 et donc celle d'Oct4 et de Nanog (Niwa *et al*. 2009).

- c-Myc est un oncogène exprimé dans les cellules à forte activité prolifération (Cartwright *et al*. 2005). Il n'est pas indispensable à la génération de cellules iPS mais sa surexpression augmente considérablement l'efficacité et la vitesse de reprogrammation (Nakagawa *et al*. 2008 ; Wernig *et al*. 2008). La surexpression prolongée de c-Myc est responsable de la différenciation et de la mort de cellules ES humaines (Sumi *et al*. 2007). Sa réactivation dans les protocoles utilisant des rétrovirus est responsable de la formation de tumeurs chez 20% des souris issues de la reproduction de chimères obtenues par iPS ou 50% des chimères issues de cellules iPS (Okita *et al*. 2007 ; Wernig 2008). c-Myc a donc été retiré ou remplacé par son homologue L-Myc (beaucoup moins oncogénique) dans de nombreux protocoles (Nakagawa *et al*. 2008 et 2010 ; Wernig *et al*. 2008). Pourtant, Araki et collaborateurs montrent en 2011 que c-Myc joue un rôle crucial dans la reprogrammation en cellule iPS. Les cellules iPS générées sans c-Myc ont un potentiel plus réduit dans la participation aux chimères (pourcentage de chimérisme plus faible qu'avec les 4 facteurs) et les chimères présentent une transmission germinale peu efficace (Araki *et al*. 2011). Ces cellules iPS (exprimant la GFP sous contrôle d'un vecteur ubiquitaire) agrégées avec des embryons 8 cellules montrent une repopulation partielle de la masse interne et une diminution de la fluorescence. Les blastocystes anormaux générés ont des difficultés à s'implanter. c-Myc joue un rôle dans la reprogrammation via l'acétylation des histones : en effet, très peu d'histones sont acétylées dans les iPS générées sans c-Myc (contrairement à celles avec les 4 facteurs) et un traitement à la trichostatine A (TSA - inhibiteur des histones déacétylases HDAC) permet d'améliorer

grandement les capacités de ces iPS à générer des blastocystes viables donnant des souris avec un fort chimérisme et une transmission germinale fonctionnelle (Araki *et al*. 2011).

- Nanog (nom venant de 'Tìr na nÒg' dans la mythologie celtique, le pays de l'éternelle jeunesse) est un facteur de transcription impliqué dans le maintien de la pluripotence des cellules de la masse interne de l'embryon et de l'épiblaste mais aussi celle des cellules ES et iPS humaines et murines (Mitsui *et al*. 2003). Son expression est partiellement régulée par Oct4 et Sox2 est également nécessaire au développement de la lignée germinale (Rodda *et al*. 2005 ; Chambers *et al*. 2007). Son expression constitutive dans des cellules ES murines inhibe leur différenciation même en absence de LIF (Chambers *et al*. 2003). Comme le montre les premières expériences de génération d'iPS, sa surexpression n'est pas nécessaire à l'initiation de la pluripotence (Takahashi et Yamanaka, 2006).

- Lin28 est une protéine spécifique des cellules pluripotentes se fixant sur les ARNm pour induire leur dégradation. Sa principale cible est le micro ARN (miRNA) de la famille let-7 (Heo *et al*. 2008). Cette famille de micro ARN est exprimée constitutivement dans les cellules différenciées mais pas dans les cellules pluripotentes du fait de l'inhibition de Lin28. Let-7 cible les gènes clé du cycle cellulaire tels que CDC25A et CyclineD1 pour stopper le cycle cellulaire. Lin28 inhibe cette suppression et favorise la reprogrammation en permettant l'avancée dans le cycle cellulaire (Hanna *et al*. 2009).

- Le rôle de p53 est également prépondérant dans la reprogrammation. Beaucoup d'études ont montré l'inhibition de la reprogrammation cellulaire par p53 et ses gènes cibles. La reprogrammation induit l'expression de p21 (gène suppresseur de tumeur ciblant principalement la kinase cycline-dépendante 1A) via l'expression de p53 (Kawamura *et al*. 2009). La reprogrammation (bouleversements épigénétiques, expression d'oncogènes, dommages à l'ADN, télomères réduits…) est perçue par la cellule comme une transformation ce qui induit la surexpression de p53 bloquant ce processus (Mariòn *et al*. 2009). L'utilisation d'un ARN interférent anti-p53 permet d'améliorer l'efficacité de reprogrammation de cellules humaines (Zhao *et al*. 2008). Hong et collaborateurs montrent que la reprogrammation de fibroblastes murins n'exprimant plus p53 (KO pour p53) atteint 10% des cellules transduites même si c-Myc ne fait pas parti du cocktail inducteur (Hong *et al*. 2009). L'inhibition de p53 améliore l'efficacité de génération de cellules iPS murines même par transfection de plasmide (sans intégration virale). L'inhibition de p53 (siARN, KO, surexpression de MDM2…) permet donc de s'affranchir de son effet suppresseur de tumeur et améliore l'efficacité de

reprogrammation de cellules jusqu'à ne plus utiliser c-Myc et réduire le nombre de facteurs à Oct4 et Sox2 dans des cellules immatures ($CD34^+$ de sang de cordon - Takenaka *et al*. 2009).

Le locus Ink4/Arf codant pour les suppresseurs de tumeurs p16Ink4A, p19Arf et p15Ink4B est totalement éteint dans les cellules pluripotentes contrairement aux cellules différenciées qui l'exprime de manière basale. Tout comme p53, ce locus est exprimé durant la reprogrammation puis est ensuite éteint par les facteurs de reprogrammation au moment même où les premiers marqueurs de pluripotence apparaissent (Li *et al*. 2009). L'inhibition de ce locus par l'antigène grand-T ou par des ARN interférents augmente le nombre de colonies iPS obtenues ainsi que leur vitesse d'apparition (Utikal *et al*. 2009). Dans les cellules murines, Arf est le principal instigateur anti-reprogrammation par activation de p53. Dans les cellules humaines, Ink4a est prédominant (Li *et al*. 2009).

L'hypoxie semble également intervenir favorablement dans le processus de reprogrammation (Yoshida *et al*. 2009). L'utilisation d'agents déméthylants (inhibiteurs de méthyltransférases et d'histones déacétylases - HDAC) contribue également à augmenter le nombre de colonies reprogrammées et la vitesse de leur reprogrammation (Araki *et al*. 2011). L'acide valproïque en particulier (un inhibiteur des HDAC), augmente d'un facteur 100 la génération de cellules GFP où la GFP est sous contrôle d'un promoteur Oct4 dans un protocole utilisant des rétrovirus (Huangfu *et al*. 2008). L'acide valproïque augmente au final le nombre de colonies iPS obtenues d'un facteur 40. La trichostatine A ou le 5'-azacytidine (inhibiteurs d'histones déacétylases et de méthyltransférases respectivement) augmente l'efficacité de reprogrammation mais de manière moins importante (Huangfu *et al*. 2008). Les cellules iPS générées avec ces composés sont pluripotentes (formation de tératomes et de souris chimériques).

Le groupe de microARN miR302, localisé dans la région intronique du gène La ribonucleoprotein domain family member 7 (LARP7/ PIP7S), est également utilisé depuis peu comme inducteur de reprogrammation (Anokye-Danso *et al*. 2011 ; Miyoshi *et al*. 2011). Cet ensemble de 5 microARN est exprimé très fortement dans les cellules ES et iPS mais pas dans les cellules différenciées (Suh *et al*. 2004). Ces microARN sont impliqués dans l'activation de l'expression des facteurs de transcription Oct3/4 et Sox2 et dans une déméthylation massive causée par l'inhibition de HDAC2 (Lin *et al*. 2011).

b) Méthodes de reprogrammation

La surexpression de ces facteurs exogènes permet donc d'induire et de forcer la dédifférenciation mais ils ne sont plus utiles quand le stade pluripotent est atteint. Les gènes endogènes prennent le relai comme observé dans les premières expériences utilisant les rétrovirus s'éteignant au bout de quelque temps, méthylés par la cellule (Wernig *et al*. 2007). L'extinction des vecteurs rétroviraux est plutôt un avantage car cela évite la surexpression d'un oncogène puissant (c-Myc) dans les cellules différenciées postérieurement et potentiellement utiles dans un protocole de thérapie cellulaire ou génique. Mais il a été observé une réactivation de ces promoteurs viraux (par déméthylation). Okita et collaborateurs en 2007 montrent ainsi que 20% des souris issues de chimères obtenues par iPS développent des tumeurs imputables à la réactivation du transgène c-Myc (Okita *et al*. 2007).

Depuis les premières expériences de génération de cellules iPS, de nombreuses autres méthodes pour l'amorçage de la pluripotence ont été développées. Depuis les intégrations virales permanentes et invasives pour le génome (oncorétrovirus et lentivirus), des méthodes transitoires et moins invasives ont en effet vu le jour afin d'améliorer l'efficacité et la sécurité de la reprogrammation (Tableau 7) :

➔ Vecteurs rétroviraux : Ce sont les premiers vecteurs utilisés (Takahashi et Yamanaka, 2006). Ils sont également le plus couramment utilisés dans les protocoles de reprogrammation de cellules murines, humaines, porcines ou de primates non humains malgré une faible efficacité de reprogrammation (Takahashi *et al*. 2007 ; Wernig *et al*. 2007). L'expression des transgènes est parfois réprimée après avoir atteint la pluripotence par méthylation du promoteur rétroviral. Un vecteur par transgène est utilisé même si des vecteurs multiples ont fait leur apparition.

➔ Vecteurs lentiviraux : ils sont capables de transduire tout type de cellules, y compris les cellules quiescentes. Ils améliorent l'efficacité de reprogrammation. Mais tout comme les vecteurs rétroviraux, ils présentent le désavantage de perturber le génome en intégrant stablement les transgènes et peuvent potentiellement transactiver des proto-oncogènes situés près du site d'insertion. Des vecteurs polycistroniques permettent de diminuer le nombre d'intégration dans le génome. Il est également possible d'exciser les transgènes quand ils sont flanqués de séquences LoxP en exprimant de manière transitoire la recombinase CRE (Chang *et al*. 2009). La recombinase CRE est capable de reconnaître une séquence particulière

appelée LoxP composée de 37pb. Lorsque 2 séquences LoxP sont présentes, l'enzyme CRE catalyse la recombinaison entre ces séquences ce qui permet, selon leurs orientations, d'inverser ou d'exciser la séquence centrale. Cette méthode présente l'avantage de ne plus surexprimer les transgènes mais perturbe de manière durable le génome. En effet, même après excision des transgènes, une fraction d'un LTR composé d'une séquence LoxP entière reste dans le génome au cours du phénomène de recombinaison (Figure 13).

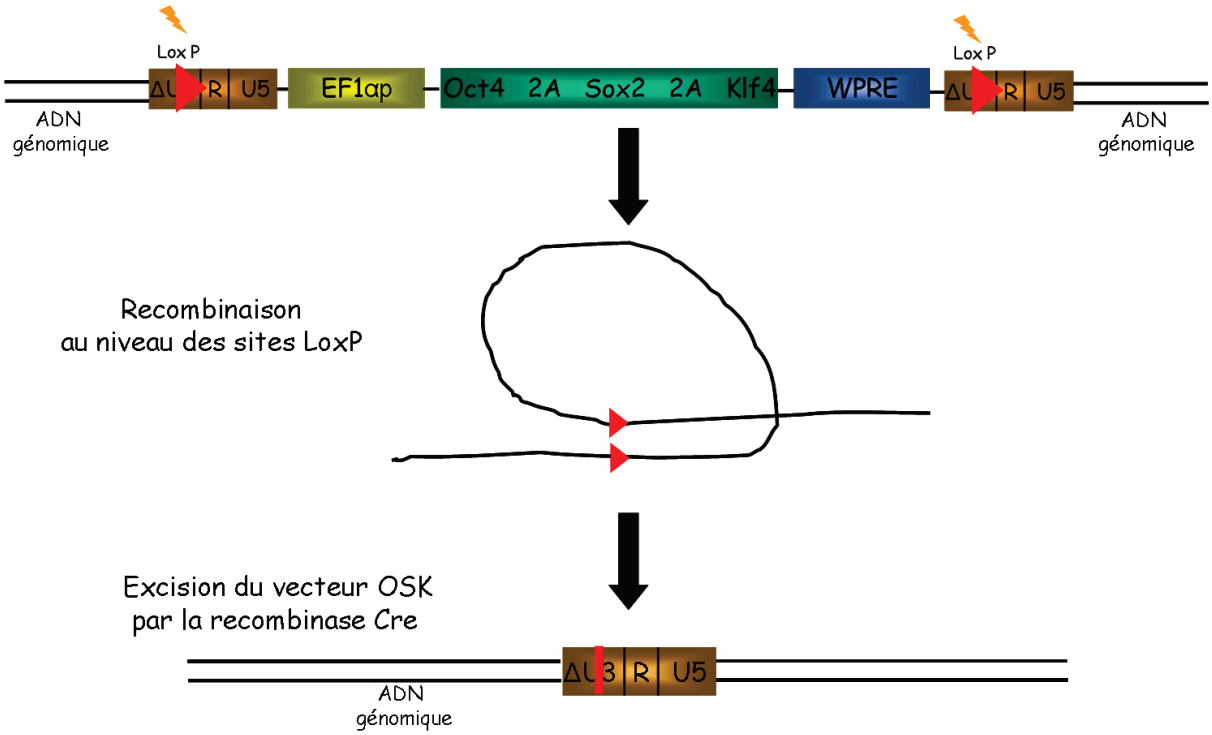


Figure 13. Recombinaison catalysée par la recombinase CRE lors de l'excision du vecteur de reprogrammation. Nous avons employé cette méthode lors de la génération de nos lignées iPS.

➔ Les adénovirus, AAV (Adeno-Associated Viruses) et la transfection de plasmides sont tous d'une efficacité assez faible. Mais ces méthodes présentent l'avantage d'être non invasives (sauf cas rare d'intégration stable).

➔ La transduction protéique a également été utilisée pour reprogrammer des fibroblastes en cellules iPS. Les protéines Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc ont été fusionnées avec un élément CPP (cell penetrating peptide) composé d'acides aminés basiques capables de faire traverser la membrane plasmique aux protéines (peptide de 11 arginines dans le cas de Zhou *et al*. 2009, et 9 arginines pour Kim *et al*. 2009). La faible efficacité et l'augmentation du temps de reprogrammation (2 mois) font que ce type de protocole n'est pas fréquemment utilisé.

➔ Les miRNA ont également été utilisés par reprogrammer des cellules. Partant du principe que certaines familles de micro ARN étaient fortement exprimées dans les cellules ES spécifiquement (Suth *et al*. 2004), plusieurs équipes les inclurent dans leurs protocoles de

reprogrammation. Anokye-Danso et collaborateurs utilisèrent un vecteur lentiviral exprimant le cluster miR302/367 dans des cellules KO pour le HDAC2 (Anokye-Danso *et al*. 2011). Dans une approche non intégrative, Miyoshi et collaborateurs transfectèrent des plasmides contenant les clusters mir-200c, mir-302s et mir-369s (Miyoshi *et al*. 2011). Les cellules iPS obtenues sont capables de former des tératomes et des souris chimériques.

➔ La transfection d'ARNm matures offre à ce jour les meilleures conditions de reprogrammation : une efficacité importante a été rapportée (jusqu'à 4,4% des cellules transduites sont reprogrammées en transfectant OSKML en hypoxie) sans aucun risque d'intégration dans le génome endogène. Une étude comparative entre l'utilisation d'ARNm modifiés (OSKM) et des rétrovirus correspondant révèle une efficacité de reprogrammation de fibroblastes humains 36 fois plus élevée dans le cas des ARNm (1,4% des cellules transduites sont reprogrammées contre 0,04% pour les vecteurs rétroviraux – Warren *et al*. 2010). Les principaux désavantages sont la faible demi-vie des ARNm dans la cellule (2 à 3 jours) nécessitant une transduction quotidienne et la production d'interféron de type I en réponse à la présence d'ARNm étrangers dans la cellule. Il est donc nécessaire d'utiliser des ARNm stabilisés (ribonucléotides modifiés) ainsi qu'un inhibiteur de la réponse interféron (B18R : récepteur d'interféron de type I provenant du *Vaccinia virus*). Très récemment, un nouvel article montre la génération de cellules iPS grâce à l'utilisation d'ARNm et sans stroma nourricier (Warren *et al*. 2012).

➔ D'autres méthodes ont été utilisées pour la reprogrammation de cellules à l'aide de transposon (piggyBac, Woltjen *et al*. 2009), de transfection de plasmide (Okita *et al*. 2008) avec une efficacité égale ou inférieure à celle obtenue avec les « facteurs de Yamanaka ».

Type de vecteurs		Types cellulaires	Facteurs *	Efficicacité (%)	Avantages	Inconvénients	Références
Intégratif	Rétroviral	Fibroblastes, kératinocytes, cellules souches neurales, cellules stomacales, hépatiques, amniotiques, sanguines, adipeuses.	OSKM, OSK, OSK + AV, OS + AV	0,001-1	Raisonnablement efficace	Intégration génomique, silencing des provirus incomplet, cinétique lente	Takahashi et Yamanaka, 2006 ; Takahashi et Yamanaka, 2007 ; Huangfu *et al.* 2008
	Lentiviral	Fibroblastes, kératinocytes	OSKM, cluster miR302/ 367 + AV	0,1-1,1	Raisonnablement efficace et permet de transduire cellules même quiescentes	Intégration génomique et silencing des provirus incomplet	Yu *et al.* 2007 ; Stadtfeld *et al.* 2008 ; Sommer *et al.* 2009
	Lentiviral inductible	Fibroblastes, cellules β, kératinocytes, cellules sanguines et mélanocytes	OSKM, OSKMN	~0,1-2	Raisonnablement efficace et permet contrôle de l'expression des facteurs	Intégration génomique et nécessité de l'expression d'un transactivateur	Maherali *et al.* 2008 ; Stadtfeld *et al.* 2008
Excisable	Transposon	Fibroblastes	OSKM	~0,1	Raisonnablement efficace et sans intégration génomique	Sélection des cclones excisés laborieuse	Woltjen *et al.* 2009
	Lentiviral flanqués de séquences LoxP	Fibroblastes	OSKM	~0,1-1	Raisonnablement efficace et sans intégration génomique	Sélection des cclones excisés laborieuse et séquences LoxP dans le génome résiduelles	Somers *et al.* 2010
Non intégratif	Adénoviral	Fibroblastes et cellules hépatiques	OSKM	~0,001	Sans intégration génomique	Faible efficacité	Zhou *et al.* 2009 ; Stadtfeld *et al.* 2008
	Plasmide	Fibroblastes	OSNL	~0,001	Intégration génomiques occasionnelles	Faible efficacité et intégration génomique occasionnelle	Okita *et al.* 2008 ; Si-Tayeb *et al.* 2010
Sans ADN	Virus Sendaï	Fibroblastes	OSKM	~1	Sans intégration génomique	Réplicase sensible aux séquences ARN, difficultés de se débarrasser des cellules contenant des virus réplicatifs	Fusaki *et al.* 2009
	Protéines	Fibroblastes	OSKM	~0,001	Sans intégration génomique, délivrance directe de facteurs de transcription et sans complications liées ADN	Faible efficacité, courte demi-vie, nécessité d'une grande quantité de protéines pures	Kim *et al.* 2009 ; Zhou *et al.* 2009
	ARNm modifiés	Fibroblastes	OSKM, OSKML + AV	~1-4,4	Sans intégration génomique, contourne la réponse antivirale innée, cinétique de reprogrammation plus rapide, contrôlable et haute efficacité	Nécessité de plusieurs transfections répétées	Warren *et al.* 2010
	microARN	Cellules stromales adipeuses et fibroblastes dermiques	miR-200c, mi-302s, miR-369s	~0,1	Efficace, cinétique de reprogrammation plus rapide, pas de facteur de transcription exogène et sans risque d'intégration	Faible efficacité par rapport aux autres méthodes conventionnelles	Miyoshi *et al.* 2011

O : Oct3/4, S : Sox2, K : Klf4, M : c-Myc, L : Lin28, N : Nanog et AV : acide valproïque

Tableau 7. Méthodes de reprogrammation de cellules somatiques en cellules iPS (d'après Robinton et Daley, 2012).

II-2-4) Biosécurité des cellules iPS

a) Cellules iPS : dark side of stem cells

Les cellules iPS ont un potentiel important dans les domaines de la médecine régénérative, de la modélisation de maladies, de la recherche et elles sont une source de cellules pour des transplantations grâce à la possibilité de former des cellules/tissus

spécifiques pour chaque patient. Mais ces cellules présentent également de graves défauts génétiques qu'il convient d'étudier avant toute application clinique.

Même s'il est maintenant possible de générer des cellules iPS sans intégration virale et donc sans changer la séquence nucléotidique du génome, ce dernier n'en est pas moins perturbé. La reprogrammation est une étape induisant un stress réplicatif important pour la cellule qui en réponse, surexprime des protéines pour conserver une intégrité génomique et transcriptionnelle (expression de p53, p21, Ink4A/Arf…). Malgré cela, plusieurs études démontrent la présence d'anormalités chromosomiques, de mutations ponctuelles, de variations épigénétiques et du nombre de copies de gène (Copie Number variations CNV) dans des cellules humaines reprogrammées. Des variations du nombre de chromosomes sont observées au cours de la culture des cellules ES sur le long terme (Baker *et al*. 2007). Ce type d'aberrations chromosomiques est également détecté dans le cas de cellules iPS (Mayshar *et al*. 2010). Les anormalités chromosomiques sont souvent détectées (20% des lignées étudiées) et la trisomie, notamment du chromosome 12, est fréquente dans ces lignées humaines iPS (environ 9% des lignées) (Mayshar *et al*. 2010). L'acquisition d'une trisomie peut se faire au fil des passages par sélection : le nombre de gènes impliqués dans le cycle cellulaire localisés sur le chromosome 12 est très important ce qui signifie qu'en cas de trisomie accidentelle, le clone trisomique présentera une prolifération plus importante que les cellules normales et envahira, passage après passage, la lignée.

Laurent et collaborateurs montrent que les cellules iPS présentent significativement plus d'anormalités génétiques et épigénétiques que des cellules ES ou les fibroblastes dont elles sont dérivées. La reprogrammation semble sélectionner les clones cellulaires ayant perdu les gènes suppresseurs de tumeurs (capables de ralentir ou stopper la reprogrammation) et la culture sur le long terme semble favoriser les clones cellulaires possédant une surexpression ou duplication d'oncogènes (Laurent *et al*. 2011). Les cellules iPS présentent dix fois plus de mutations que les fibroblastes d'origine (Gore *et al*. 2011) et significativement plus de variations de CNV dans les cellules iPS à faibles passages qu'après une longue période en culture ou comparé à des fibroblastes ou des cellules ES humaines. Les CNV, tout comme certaines mutations somatiques, s'établissent au moment de la reprogrammation et permettent de différencier les différents clones. Cela entraîne une sélection par avantages ou désavantages de prolifération, d'apoptose (etc.) selon les gènes dupliqués ou délétés. La ou les populations sortant de cette sélection présentent une homogénéité de génotype les rapprochant de ce qui est observé dans les cellules ES (Hussein *et al*. 2011).

Mais la reprogrammation affecte également le statut épigénétique des cellules. Lors de ce processus, une déméthylation des promoteurs des gènes de pluripotence a été observée (Oct4,

Nanog…), les promoteurs des gènes exprimés par la cellule d'origine restant également parfois déméthylés. Les cellules iPS portent alors une signature épigénétique correspondant à la cellule dont elles sont issues. Ces gènes, selon le contexte de facteurs de transcription, peuvent donc s'exprimer dans des cellules pluripotentes où ils ne le devraient pas, démontrant ainsi que la reprogrammation n'est pas toujours « complète » malgré la pluripotence des cellules (Lister *et al*. 2011). Cette « mémoire épigénétique » somatique favorise la différenciation des cellules iPS vers la lignée d'origine (Kim *et al*. 2010 ; Hu *et al*. 2010 ; Bar-Nur *et al*. 2011).

Ces défauts génétiques (aneuploïdies, réarrangements chromosomiques, mutations ponctuelles…) peuvent engendrer d'une part une diminution du potentiel de différenciation et d'autre part une transformation de la lignée (tumorigénicité accrue). Mais des études montrent également que les lignées générées ne présentent pas toujours d'anormalités chromosomiques ce qui est vérifié par Mayshar et collaborateurs (Yu *et al*. 2009 ; Chin *et al*. 2009 ; Mayshar *et al*. 2010). Les incidences de ces défauts génétiques ne sont donc pas excessivement élevées mais il convient de veiller à diminuer les stress cellulaires et de vérifier le plus strictement possible les lignées utilisées dans une vue thérapeutique.

b) Cellules iPS et thérapie génique

L'utilisation de cellules iPS dans des protocoles de thérapies géniques présentent plusieurs avantages pouvant améliorer la sécurité des protocoles actuels. En effet, la capacité d'autorenouvellement des cellules iPS permet d'utiliser une approche clonale afin de sélectionner une population caractérisée pour son intégration du vecteur thérapeutique. Dans les protocoles classiques, une population cellulaire est transduite avec un vecteur thérapeutique et réinjectée au patient sans connaître les sites d'intégrations génomiques. C'est ainsi que plusieurs patients ont déclaré une leucémie dans le protocole de thérapie génique du syndrome de l'immunodéficience sévère combinée liée à l'X (Hacein-Bey-Abina *et al*. 2003). La transactivation d'un proto-oncogène (LMO2) par le promoteur rétroviral a entraîné une prolifération d'un clone de lymphocyte T.

L'approche clonale, rendue possible par l'utilisation de cellules iPS, peut permettre de diminuer les risques d'oncogenèse insertionnelle. En effet, une analyse par LAM-PCR (Linear Amplification Mediated Polymerase-Chain-Reaction) permet de localiser les sites d'intégrations du vecteur thérapeutique. Ceci permet donc de sélectionner les clones iPS n'ayant aucune intégration proche d'un oncogène ou dans une région du génome dense en gènes afin d'éviter de perturber leur expression. Un séquençage à haut débit des lignées iPS

permet de détecter les insertions du vecteur thérapeutique aussi efficacement qu'une LAM-PCR mais présentent l'avantage de détecter les autres anomalies (insertion, délétions, mutations ponctuelles…).

De nouvelles méthodes de correction génique sont maintenant disponibles : la correction génique ciblée via l'utilisation de protéines nucléases à doigt de zinc (ZFN pour Zinc Finger Nucleases) ou de TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases). Ce sont des protéines artificielles possédant un site de liaison à l'ADN modifiable à façon afin de pouvoir cibler la séquence d'intérêt. L'activité nucléase de ces protéines permet de générer une cassure double brin de l'ADN génomique. L'apport d'un ADN exogène (vecteur thérapeutique) possédant des extrémités homologues aux séquences flanquant le site de cassure, permet par recombinaison homologue une intégration de cette séquence dans le génome (Figure 14 et Carroll, 2011).

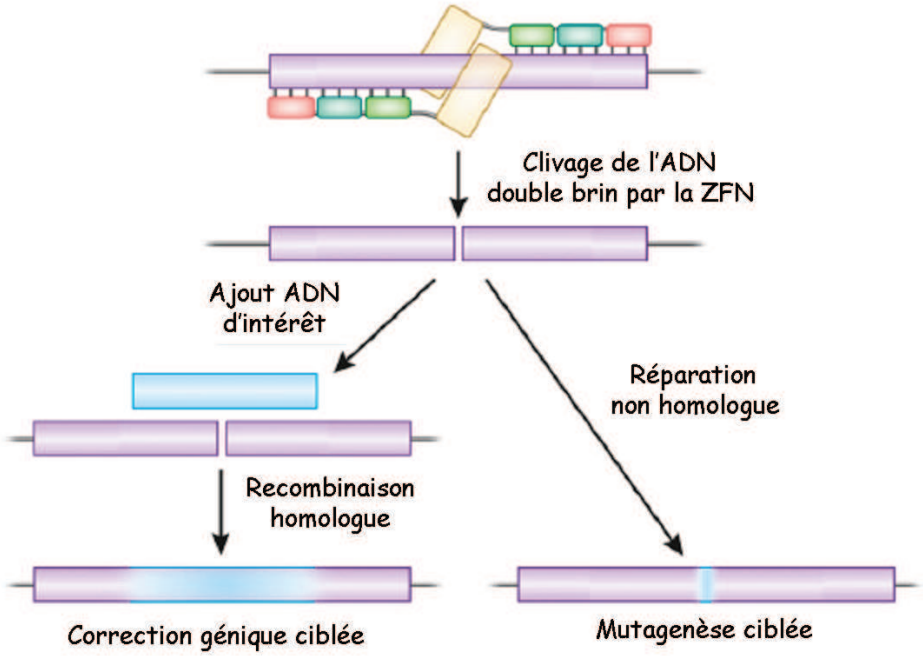


Figure 14. Mécanisme d'action des ZFN. Le couple de ZFN reconnaît une séquence spécifique de 18pb. Les sous-unités Fok1 clivent l'ADN double brin. Si un ADN avec des extrémités homologues est ajouté aux cellules, la réparation intègre par recombinaison homologue cet ADN. Sans ADN exogène, une réparation non homologue a lieu générant une mutation pouvant invalider le gène ciblé. (D'après Carroll, 2011)

Le site humain d'intégration des adénovirus (AAVS1 pour adeno associated virus site-1) est souvent utilisé comme locus pour l'intégration ciblé. Il est localisé sur le chromosome 19 en position 19q13, entre l'exon 1 et l'intron 1 du gène de la sous-unité régulatrice de la protéine phosphatase 1 (*PPP1R12C*). Les études de thérapie génique dont les intégrations sont pratiquées dans ce locus n'ont pas montré de dérégulations des gènes alentours (Lombardo *et al*. 2011). Cependant, de part la présence de nombreux gènes dans cette région, d'autres

études devront confirmer l'innocuité de l'insertion d'une séquence promotrice dans ce site (Sadelain *et al*. 2012).

II-3) Différenciation des cellules souches pluripotentes

II-3-1) Différenciation des cellules ES

Les cellules ES murines ou humaines sont par définition pluripotentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent se différencier en n'importe quelle cellule mature avec sa morphologie, son expression génique et ses fonctions propres. Dans les deux cas, cellules ES murines et humaines, leur différenciation peut être évaluée *in vitro* et *in vivo* de manière simple. *In vitro*, les cellules ES ensemencées sans stroma, sur boîte non traitées pour la culture cellulaire (donc ne permettant pas l'adhésion des cellules au plastique) et surtout dans un milieu non complémenté en LIF (dans le cas des cellules murines) forment des structures tridimensionnelles appelées corps embryoïdes (Figure 15A). Ces structures miment les premiers jours du développement de l'embryon, lors des premières étapes de différenciation. Il est ensuite possible de caractériser l'expression de marqueurs des différents feuillets embryonnaires par immunocytochimie, RT-PCR ou analyse par cytométrie en flux de marqueurs membranaires. Le réensemencement de ces corps embryoïdes sur une boîte gélatinée permet l'étalement de ceux-ci et une poursuite de la différenciation spontanée vers des cellules contractiles (type myocytes, Rohwedel *et al*. 1994).

In vivo, les cellules ES implantées par voie sous-cutanée chez la souris immunodéficiente prolifèrent en une masse tumorale non invasive appelée tératome. Ces tumeurs sont constituées de tissus différenciés issus des trois types de feuillets embryonnaires (Figure 15 B et C). Dans le cas des cellules ES murines, d'autres tests permettent de prouver la pluripotence des cellules d'intérêt. Elles participent activement à la constitution d'un nouvel individu quand elles sont injectées dans la masse interne d'un blastocyste (génération de souris chimériques). Mais cette expérience ne prouve pas l'entière capacité de ces cellules à former un individu complet. Seule une expérience de complémentation d'embryon tétraploïde permet de l'affirmer. Cette technique consiste à implanter un agrégat de cellules pluripotentes à tester et d'embryons tétraploïdes obtenus par électrofusion d'embryons au stade deux cellules. Il est également possible d'implanter les cellules ES dans un blastocyste

formé par un embryon tétraploïde et cultivé *in vitro*. Ces cellules embryonnaires tétraploïdes sont incapables de former un embryon et se différencient simplement en annexe embryonnaires (Figure 15 D). L'embryon formé dans ce type d'expérience est donc entièrement constitué des cellules diploïdes pluripotentes d'intérêt (Nagy *et al*. 1990 ; Nagy *et al*. 1993 ; Coulombel, 2009). Dans le cas des cellules humaines, les tests de pluripotence s'arrêtent où commence l'éthique : aucune injection de cellules ES humaines ne s'est faite en blastocyste et la formation de tératomes chez la souris immunodéficiente est le test majeur pour ces cellules (Tableau 8).

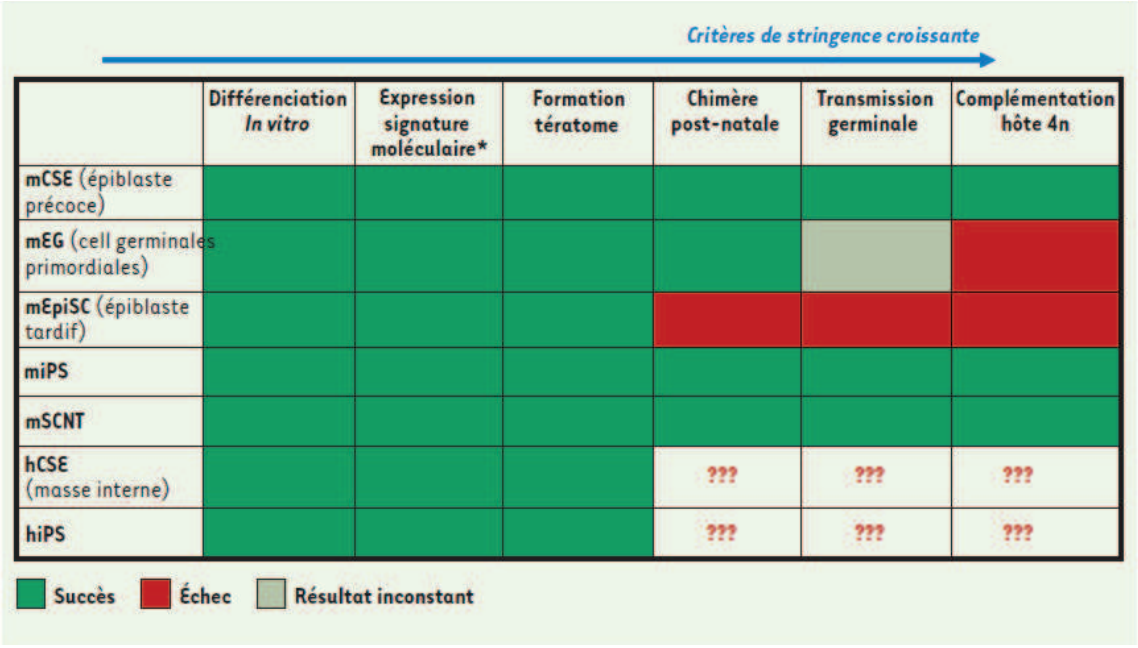


Tableau 8. Différents critères pour juger de la pluripotence d'une cellule classés par stringence croissante. L'expression de la signature moléculaire (*) comprend l'expression des gènes Oct4, Sox2, Nanog, Ronin et Tbx3. mSCNT : Transfert de noyau de cellule somatique murine. (D'après Coulombel, 2009).

II-3-2) Différenciation des cellules iPS

Tout comme les cellules souches embryonnaires, les cellules souches pluripotentes induites se définissent par leurs capacités d'autorenouvellement et de pluripotence. La caractérisation de ces cellules, nécessaire pour affirmer l'établissement de lignées pluripotentes, passe par une différenciation *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, elles forment spontanément des corps embryoïdes quand elles sont ensemencées sans stroma sur boîte non traitée et sans LIF (dans le cas de cellules murines). Ces corps embryoïdes expriment des marqueurs des trois feuillets embryonnaires. *In vivo*, l'injection de ces cellules dans une souris immunodéficientes entraîne la formation en un mois de tératomes. Ces tumeurs sont composées de tissus différenciés issus des trois feuillets embryonnaires.

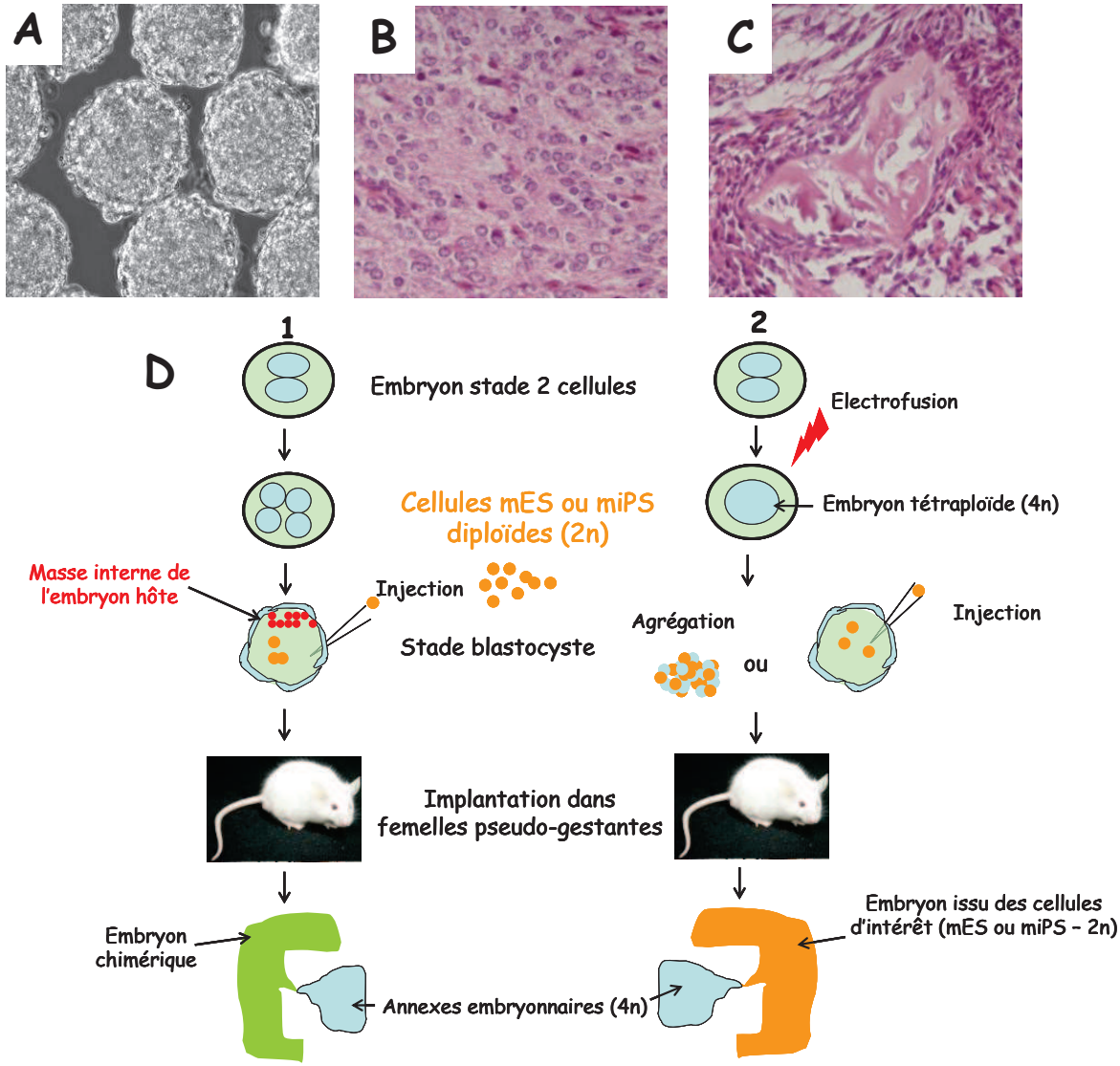


Figure 15. Différenciation de cellules pluripotentes *in vitro* (A) et *in vivo* (B, C et D). A) Corps embryoïdes, obtenus au laboratoire, formés 24h après ensemencement de cellules pluripotentes murines en plaque AggreWell®. Un corps embryoïde est composé d'environ 500 cellules (20x). B et C) Coupes de tératomes formés après injection par voie sous-cutanée de cellules iPS murines : la différenciation en ectoderme (B) et en mésoderme (C) est observable. D) Tests de pluripotence réalisables sur cellules murines : test de génération de souris chimériques (1) et test de complémentation d'embryons tétraploïdes (2) (modifié d'après Coulombel, 2009).

Les tests visant à déterminer l'étendue de la pluripotence des cellules iPS sont les mêmes que ceux utilisés pour les cellules ES. Elles participent également activement à la formation de souris chimériques viables (depuis la modification du protocole de sélection des iPS générées – sélection par l'expression du gène endogène Nanog-) (Okita *et al*. 2007 ; Wernig *et al*. 2007). Ces cellules ont également passé le test ultime de pluripotence en formant des embryons totaux par une expérience de complémentation d'embryons tétraploïdes (Zhao *et al*. 2009) prouvant ainsi l'entière capacité de pluripotence des cellules iPS.

II-3-3) Cas particulier de la différenciation hématopoïétique

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont les cellules souches somatiques les plus étudiées et les mieux caractérisées. Elles sont utilisées en thérapie cellulaire depuis les années 1950 pour recoloniser la moelle osseuse de patients traités par chimiothérapie (Thomas *et al*. 1957). Les CSH sont multipotentes : elles sont à l'origine d'un nombre important de cellules hématopoïétiques matures dont la durée de vie varie selon le type cellulaire (en moyenne : érythrocytes 120 jours, plaquettes 7 jours, polynucléaires 24h). La cellule souche hématopoïétique donne naissance à des progéniteurs hématopoïétiques se spécialisant en précurseurs qui finalement permettront le renouvellement de toutes les cellules matures. L'ontogenèse hématopoïétique commence par la différenciation de la CSH en deux grands compartiments : la lignée myéloïde (donnant naissance aux érythrocytes, plaquettes, monocytes, polynucléaires…) et la lignée lymphoïde (composée des lymphocytes T et B, NK, helper, mémoire…) (Figure 16). Le système hématopoïétique se met progressivement en place au cours de l'embryogenèse. Les cellules hématopoïétiques primitives apparaissent dans le sac vitellin, puis migrent dans la région aorto-gonado-mésonéphrotique (AGM), colonisent les sites de l'hématopoïèse fœtale (placenta et foie fœtal) via la circulation sanguine, avant de s'installer dans la moelle osseuse (Thèse de Kévin Rouault-Pierre, 2010 et Yoder, 2001).

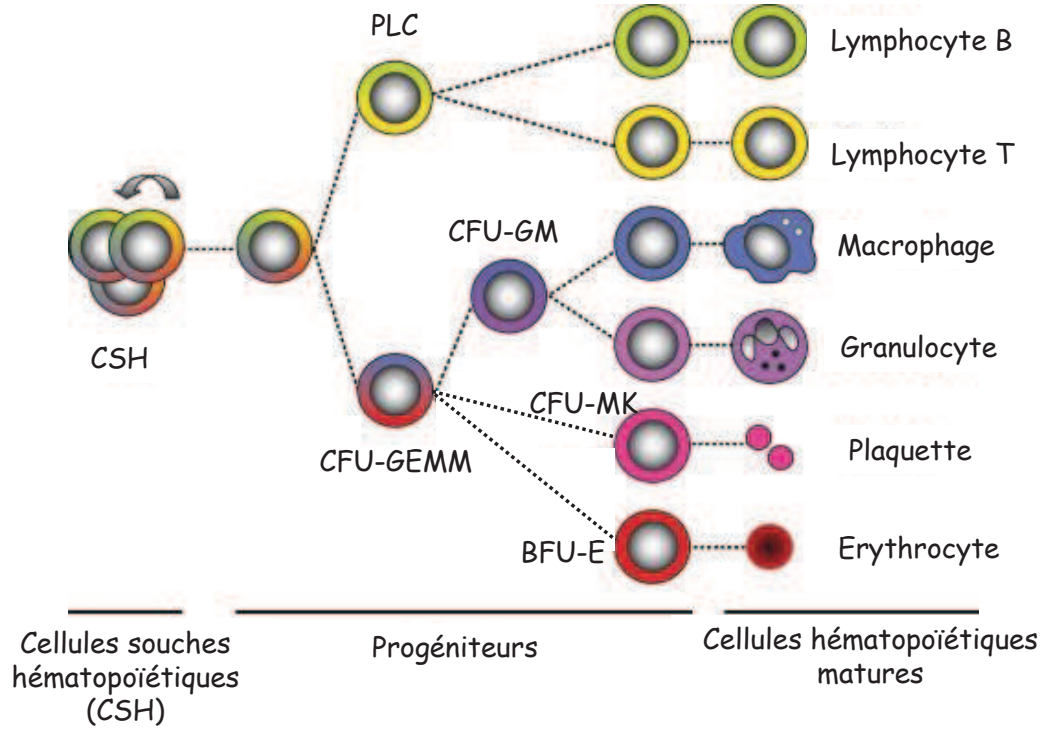


Figure 16. Hématopoïèse schématique. Les CSH, dotées d'une capacité d'autorenouvellement, se différencient en progéniteurs hématopoïétiques spécialisés et engagés dans une voie de différenciation. La spécialisation se poursuit au cours des divisions cellulaires conduisant aux multiples types cellulaires observés dans la moelle osseuse et le sang. CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques, PLC : Progéniteur Lymphoïde Commun, CFU-GEMM : progéniteur commun myéloïde, CFU-GM : Colony Forming Unit-Granulo-Monocytaire, CFU-MK : CFU-Mégacaryocytaire, BFU-E : Burst Forming Unit-Erythrocytaire. (Modifié d'après Gerrits *et al*. 2008).

Jusqu'à l'âge de cinq ans, tous les os participent à l'hématopoïèse. Après cet âge, elle n'est plus assurée que dans les os plats (sternum, côtes, os iliaque…) et dans l'épiphyse des os longs. De nombreux travaux ont consisté à caractériser chaque type de cellules matures mais l'attention des chercheurs s'est surtout focalisée sur les CSH. En effet, il a été montré qu'une seule cellule souche hématopoïétique peut renouveler un système hématopoïétique complet chez un individu (Jordan et Lemischka, 1990). Un clone ayant un avantage sélectif (survie ou prolifération) peut donc s'étendre rapidement et devenir majoritaire dans un organisme. La compréhension des mécanismes d'autorenouvellement et de différenciation de ces cellules est donc primordiale afin d'envisager des thérapies aux nombreuses pathologies associées aux CSH ou à toutes les cellules en aval de celles-ci. Bien que n'ayant pu être caractérisées totalement, les cellules souches hématopoïétiques sont décrites comme possédant certains critères : chez l'homme, elles sont souvent caractérisées par les antigènes de surface Lin^- /$CD34^+$/$CD38^-$ et ne sont pas en cycle (G0) (Li et Bhatia, 2011). La quiescence de ces cellules permet de les protéger d'une oxydation de leur ADN par les ROS (Reactive Oxygen Species) produits dans toute cellule active, de l'apparition d'une instabilité génétique dont l'apparition dépend de la fréquence de division de la cellule et accessoirement de protéger la cellule contre tous les traitements chimio-thérapeutiques affectant préférentiellement les cellules en division. La différenciation des CSH *in vivo* répond à des mécanismes complexes d'interactions entre ces cellules et leur microenvironnement (niche hématopoïétique). Des cytokines, telles que l'interleukine 3, ont un effet sur la survie et la prolifération de ces cellules. Il apparaît également que la concentration en oxygène joue un rôle sur la multipotence et l'autorenouvellement des CSH notamment via l'action des facteurs de transcription de la famille HIF (Hypoxia-Inductible Factor). Une concentration faible en oxygène (0,1 à 5% - hypoxie correspondant au taux en oxygène relevé *in vivo* dans les niches hématopoïétiques) permet de maintenir la quiescence des CSH (Ivanovic *et al*. 2000).

De nombreuses pathologies sont donc associées à un défaut de ces CSH (leucémies, déficience de l'immunité, maladies auto-immune comme le diabète de type I, déficits métaboliques comme les porphyries érythropoïétiques…). L'étude de la différenciation des cellules souches pluripotentes en cellules souches de la moelle osseuse permet d'aborder trois thématiques différentes avec un même objectif final : (i) comprendre l'ontogenèse hématopoïétique normale, (ii) identifier les différentes origines des maladies affectant ce système et (iii) permettre sur le long terme la greffe de cellules souches de moelle osseuse issues de cellules pluripotentes plutôt que de cellules souches hématopoïétiques dont les

donneurs sont rares, pour au final adopter des thérapies cellulaire ou génique pour ces maladies.

a) Cellules souches pluripotentes murines et différenciation hématopoïétique

Les études sur la différenciation des cellules ES donnent rapidement des résultats avec l'apparition de cellules formant un analogue du sac vitellin de l'embryon à partir de corps embryoïdes *in vitro* (Doetschman *et al*. 1985). La repopulation de la moelle par des cellules hématopoïétiques dérivées de cellules ES murines s'est révélée complexe et non totale dans certains cas. Ainsi, Müller et collaborateurs décrivent la transplantation de cellules ES différenciées (par la formation de corps embryoïdes) par voie intraveineuse : après plusieurs mois de greffe, les cellules ES ont peu contribué à la reconstitution du système hématopoïétique et seulement dans la lignée lymphoïde. Aucune cellule myéloïde n'a pu être détectée *in vivo* contrairement aux expériences *in vitro* (Müller et Dzierzak, 1993). La caractérisation de ces cellules et l'amélioration des conditions de culture, notamment par l'utilisation d'un stroma OP9 n'exprimant pas de M-CSF actif (Macrophage Colony-Stimulating Factor inhibant les différenciations hématopoïétiques autres que celle vers la lignée des macrophages), ont permis la différenciation de cellules ES murines puis humaines en toutes les lignées hématopoïétiques (Nakano *et al*. 1994 ; Hole *et al*. 1996). Récemment, deux facteurs ont permis de potentialiser la différenciation des cellules souches embryonnaires murines en cellules souches/progénitrices hématopoïétiques. Le facteur de transcription HOXB4 et le gène cdx4 qui stimule l'expression de gènes de la famille Hox, ont permis d'augmenter la prolifération de cellules souches hématopoïétiques, de les différencier en toutes les lignées hématopoïétiques *in vitro* comme dans des souris irradiées de manière létale et d'améliorer les pourcentages de chimérisme hématopoïétique dans les souris greffées (Kyba *et al*. 2002).

Le gène HoxB4 (homeobox B4, chromosome 17) est un gène codant pour le facteur de transcription HOXB4. Ce facteur de transcription possède un domaine de liaison à l'ADN appelé homeobox permettant de fixer spécifiquement certaines séquences régulatrices de gènes impliqués dans le développement (Gutman *et al*. 1994). L'expression ectopique de ce facteur dans des cellules souches hématopoïétiques permet une prolifération *in vitro* et *in vivo* de ces cellules (Sauvageau *et al*. 1995). Il potentialise la différenciation hématopoïétique des cellules ES murines et permet de repeupler la moelle osseuse de souris irradiées de manière létale. Les cellules générées sont capables de recréer une hématopoïèse complète, y compris

dans des souris secondaires, attestant de leur caractère souche hématopoïétique (Kyba *et al*. 2002). Le rôle de la cytokine BMP-4 (Bone Morphogenetic protein-4) a également été mis en évidence dans la survie et l'autorenouvellement des progéniteurs hématopoïétiques dérivés de cellules ES humaines (Chadwick *et al*. 2003).

L'étude de la différenciation hématopoïétique des cellules iPS a bénéficié de toutes les recherches effectuées au préalable sur les cellules ES. Les premiers protocoles de différenciation de cellules murines ont montré l'importance de l'expression du facteur HoxB4 et d'un stroma OP9 (Hanna *et al*. 2007). Tashiro et collaborateurs montrent que même une expression transitoire de HOXB4 (via un adénovirus) dans les cellules iPS suffit pour différencier efficacement les lignées iPS murines (Tashiro *et al*. 2012). Très peu de protocoles ont été décrits pour la différenciation hématopoïétique des cellules iPS murines (Hanna *et al*. 2007 ; Seiler *et al*. 2011 ; Tashiro *et al*. 2012), les recherches se concentrant surtout sur la différenciation des cellules iPS humaines. Trois protocoles sont essentiellement utilisés : la formation/dissociation de corps embryoïdes (1) et la co-culture des cellules iPS avec un stroma OP9 (2) ou une combinaison des deux (3) (Figure 17). De plus, les données montrent que la différenciation hématopoïétique à partir d'iPS murines n'est pas aussi efficace que celle des cellules ES (Kulkeaw *et al*. 2010). Elle est notamment sensible et inversement corrélée au niveau d'expression de Sox2, facteur surexprimé dans de très nombreux protocoles de reprogrammation de cellules somatiques en cellules iPS (Seiler *et al*. 2011a).

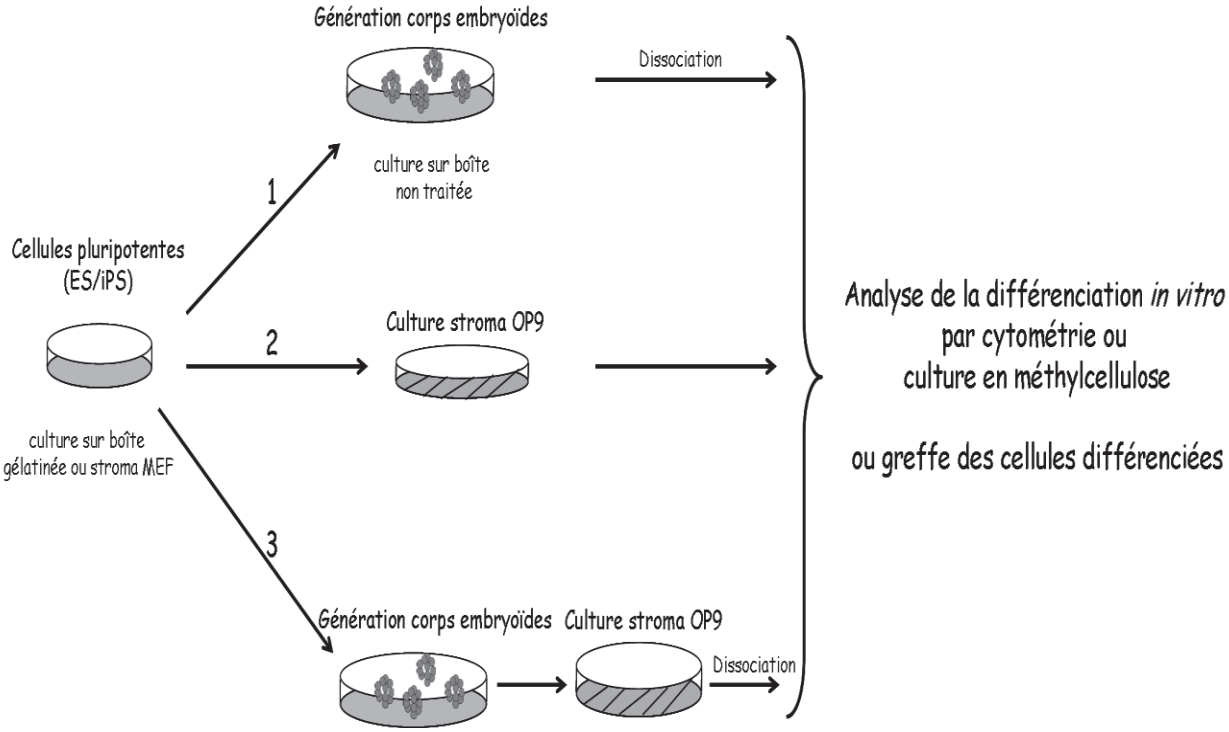


Figure 17. Protocoles de différenciation hématopoïétique à partir de cellules souches pluripotentes embryonnaires (ES) ou induites (iPS). La différence majeure consiste à mimer le développement embryonnaire par la génération de corps embryoïdes (1) ou de différencier directement les cellules par une co-culture avec une lignée stromale OP9 soutenant la différenciation hématopoïétique (2). Une combinaison des deux protocoles est également décrite (Bedel *et al*. 2012).

Dans une étude comparative, la variation de potentiel de différenciation hématopoïétique selon la lignée iPS utilisée est soulignée (Kulkeaw *et al*. 2010). Le potentiel des iPS à se différencier en cellules souches hématopoïétiques varie énormément selon la cellule d'origine, la méthode de reprogrammation et de différenciation. En effet de manière surprenante, malgré une potentielle « mémoire épigénétique » des cellules iPS, Seiler et collaborateurs génèrent plus de colonies hématopoïétiques à partir d'iPS issues de fibroblastes murins embryonnaires que de lignées issues de moelle osseuse (Seiler *et al*. 2011a) contrairement aux résultats de Pfaff et collaborateurs qui différencient plus efficacement des lignées iPS dérivant de cellules de moelle osseuse primitives (Lin^-) que de celles dérivant de fibroblastes ou de cellules hématopoïétiques plus tardives (Lin^+ - Pfaff *et al*. 2012). Les cellules obtenues sont sélectionnées sur la base de marqueurs hématopoïétiques précoces (Lin^-, Sca^+, $CD41^+$) et commun à presque toute la lignée hématopoïétique ($CD45^+$). Hanna et collaborateurs mettent en évidence le potentiel thérapeutique des cellules iPS différenciées en cellules souches hématopoïétiques (correction par thérapie génique d'un modèle de souris humanisée drépanocytaire) (Hanna *et al*. 2007). Dans leur protocole, ils ont utilisent un vecteur HOXB4 exprimant également la GFP et sélectionnent les cellules à greffer (« hématopoïétiques ») par deux marqueurs : la présence de GFP et l'absence d'un marqueur de pluripotence membranaire, le SSEA1. Malgré la pluripotence avérée des cellules iPS murines (capables de complémentation d'embryons tétraploïdes), aucun autre protocole n'a pu réaliser une hématopoïèse complète *in vivo* à partir de cellules iPS murines.

b) Cellules souches pluripotentes humaines et différenciation hématopoïétique

Les cellules iPS humaines bénéficient d'une étude plus importante mettant en évidence la nécessité d'un stroma OP9 et de cytokines (Stem Cell factor -SCF-, Fms-related tyrosine kinase 3 ligand -Flt3-L-, Thrombopoïétine -TPO- et BMP4). Tous les protocoles décrivent la formation de corps embryoïdes pour une durée variable, puis leur dissociation et le passage sur un stroma OP9. Des études de cytométrie en flux et de méthylcellulose sont ensuite réalisées pour déterminer le nombre et la nature des progéniteurs hématopoïétiques formés. Lengerke et collaborateurs montrent une différenciation efficace en cellules primitives ($CD34^+$, ~29%), en cellules hématopoïétiques non caractérisées ($CD45^+$ ~27%) et une population doublement marquée ($CD34^+CD45^+$ ~16%). (Lengerke *et al*. 2009). Une

évolution de l'expression des gènes des cellules iPS en cours de différenciation est démontrée par RT-PCR. Les cellules expriment BRACHYURY (marqueur de mésoderme) dès le deuxième jour de différenciation. Son expression est réprimée au-delà du neuvième jour où l'expression de SCL débute (marqueur de progéniteurs hématopoïétiques). La présence de BMP-4 dans le milieu permet une meilleure différenciation des cellules iPS vers l'état mésodermique par activation de SMAD 1/5/8 (Lengerke *et al*. 2009 ; Park *et al*. 2010 et Figure 12). Park et collaborateurs rapportent qu'une inhibition de la voie des MEK/ERK (MAPK Extracellular signal-regulated protein Kinase/ Extracellulare signal-Regulated Kinase) agit de manière synergique sur l'activation de la voie du BMP4 (Park *et al*. 2010). Les marqueurs de pluripotence (Oct4, pERK1/2) sont réprimés en même temps qu'une augmentation de l'expression des marqueurs mésodermiques (GATA2). La différenciation des iPS humaines, bien que moins efficace que celle des cellules ES, permet la génération de $CD34^+$ capables de se différencier en cellules endothéliales fonctionnelles *in vitro* et *in vivo* capable d'améliorer la perfusion dans un modèle artificiel d'ischémie chez la souris (Park *et al*. 2010). Dans tous ces protocoles, les cellules en cours de différenciation expriment très précocement le récepteur au VEGF (Vascular Endothelium Growth Factor) Flk-1 ou VEGFR-2 (Niwa *et al*. 2009). Ainsi, l'équipe de Verma montre que le dosage du VEGF est très important dans la différenciation mésodermique précoce. Les corps embryoïdes mis en présence d'une faible concentration de VEGF (0,5-1ng/ml) avec les cytokines hématopoïétiques habituelles (SCF, Flt3-L, TPO, BMP-4) permet une différenciation en cellules hématopoïétiques ($CD45^+$) et endothéliaux ($CD31^+$) très efficace (environ 43% des cellules) contrairement à une forte concentration (20ng/ml) mettant en évidence la présence d'un progéniteur commun pour ces deux lignées cellulaires (Woods *et al*. 2011). Une adaptation de ce dernier protocole a été utilisée pour différencier les cellules iPS corrigées issues de fibroblastes de patients porphyriques PEC (Bedel *et al*. 2012). La différenciation de cellules ES et iPS humaines en progéniteurs hématopoïétiques est également possible sans stroma mais avec une efficacité moindre (Park *et al*. 2012).

II-3-4) La transdifférenciation : la fin des cellules souches ?

La transdifférenciation est la conversion directe d'une cellule différenciée (ayant des fonctions, morphologie et expression génique propres) en une autre cellule différenciée (par exemple, reprogrammation d'un fibroblaste en neurone). Pendant longtemps, le dogme consistant à penser qu'une cellule ne pouvait évoluer qu'en se spécialisant a persisté. Ce n'est que dans les années 1960 que celui-ci fut ébranlé lorsque Gurdon (Prix Nobel de Médecine

2012) et collaborateurs montrent en 1966 qu'une cellule somatique peut être dédifférenciée par la technique de transfert de noyau (SNCT pour Somatic-Cell Nuclear Transfert – Gurdon et Uehlinger, 1966). Ces travaux montraient ainsi qu'une cellule somatique, même totalement différenciée, contenait toute l'information génétique nécessaire pour la création d'un nouvel individu (ouvrant la porte aux clonages thérapeutique et reproductif) et donc que son état différencié n'était pas aussi figé que ce que l'on pensait.

Vers la fin des années 1990, plusieurs études tendent à montrer qu'une cellule différenciée peut également se « transdifférencier » spontanément en une autre cellule mature, sans passage par un état souche. Pour cela, de simples expériences de greffe de moelle osseuse ont été effectuées et le chimérisme de certains organes a été étudié. Les conclusions de ces études font donc part de transdifférenciation de cellules hématopoïétiques en cellules hépatiques, musculaires, neurales… (Lagasse *et al*. 2000 ; Jackson *et al* 1999 ; Mezey *et al*. 2000). Des études plus approfondies révèleront que de très nombreuses observations de « transdifférenciation » n'étaient en fait que des évènements de fusion cellulaires (Wagers et Weissman, 2004). Un exemple de transdifférenciation *in vivo* a été observé dans le pancréas de souris où une grande majorité des cellules β-pancréatiques ont été détruites artificiellement : cellules α-pancréatiques en β-pancréatiques (Thorel *et al*. 2010). Mais la transdifférenciation est un phénomène rare *in vivo*.

La preuve de la transdifférenciation induite est apportée en 1987 quand le facteur de transcription MyoD, exprimé spécifiquement dans les cellules musculaires, est transfecté dans des fibroblastes, entraînant ainsi la transdifférenciation de ces derniers en myoblastes (Davis *et al*. 1987). Récemment, la génération d'iPS a relancé la recherche sur la conversion directe d'un type cellulaire vers un autre. En utilisant le même protocole que lors de la génération des premières cellules iPS murines, Zhou et collaborateurs ont surexprimé dans des cellules pancréatiques exocrine des facteurs de transcription spécifique des cellules β-pancréatiques (Ngn3, Pdx1 et Mafa) conduisant à la génération de nouvelles cellules β-pancréatiques capables de secréter de l'insuline (Zhou *et al*. 2008). Vierbuchen et collaborateurs montrent par la même technique la transdifférenciation de fibroblastes en neurones, montrant ainsi pour la première fois la conversion d'une cellule d'un feuillet embryonnaire (fibroblastes provenant du mésoderme) vers une cellule issue d'un autre feuillet (neurones provenant de l'ectoderme) (Vierbuchen *et al*. 2010). Par la suite, des études de reprogrammation directe de plusieurs types cellulaires ont été publiées : hépatocytes en neurones (Marro *et al*. 2011), fibroblastes en cellules hématopoïétiques (Szabo *et al*. 2010), fibroblastes en hépatocytes (Huang *et al*. 2011), fibroblastes en cardiomyocytes (Ieda *et al*. 2010), fibroblastes humains en neurones (Pang *et al*. 2011) (Figure 18). Les cellules induites à la transdifférenciation (iT cells)

possèdent les caractéristiques des cellules d'intérêt (morphologie, expression de gènes, fonctions) mêmes si, tout comme les cellules iPS, elles conservent parfois le profil épigénétique de la cellule de départ (Marro *et al*. 2011).

La conversion directe d'un type cellulaire vers un autre présente d'un point de vue, recherche et thérapeutique, de nombreux avantages par rapport aux iPS. Le temps de génération est en général plus court, l'efficacité est plus importante (jusqu'à 20% de cellules transdifférenciées chez Ieda *et al*. 2010) et les cellules désirées sont obtenues en une étape (sans passer par un état souche). De plus, le potentiel tumorigénique est faible comparé à celui des iPS (Vierbuchen et Wernig, 2011).

Mais, contrairement aux cellules iPS, leur application thérapeutique est handicapée par leur nature même de cellule différenciée. Ces cellules n'ont pas de capacité d'autorenouvellement ce qui limite leur nombre de division. Il est également impossible de sélectionner les clones possédant une intégration stable du transgène thérapeutique par une approche clonale dans le cadre d'une thérapie génique. Les cellules souches pluripotentes présentent donc, en plus de leurs apports à la compréhension du développement embryonnaire, des propriétés essentielles à l'amélioration de protocoles de thérapie génique (efficacité et sécurité).

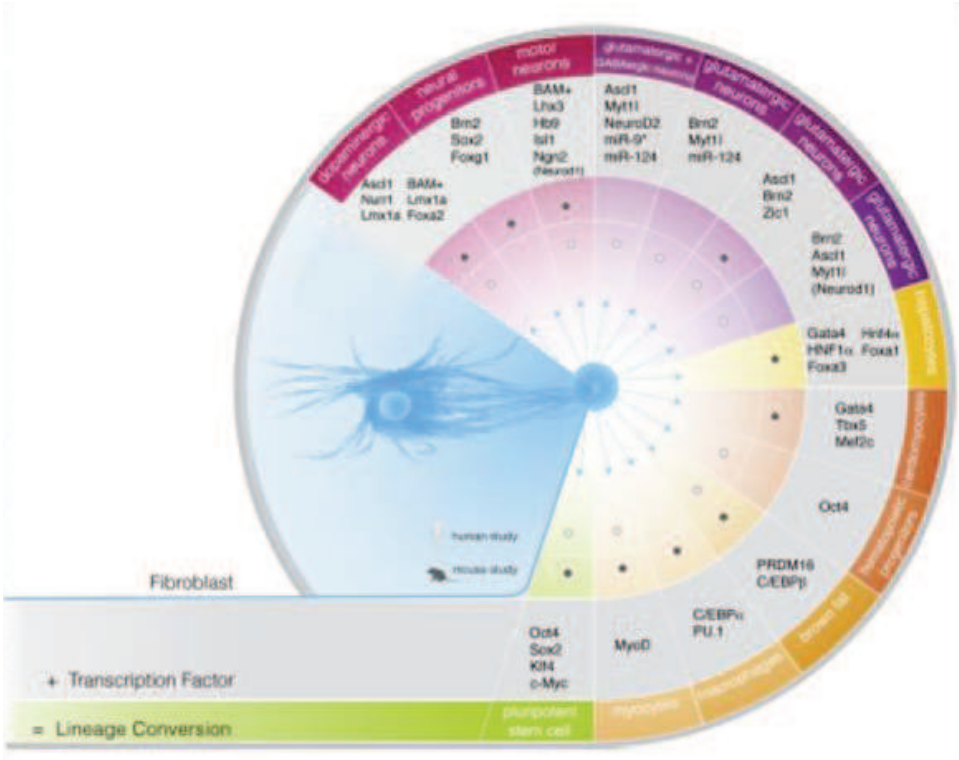


Figure 18. Différents potentiels de transdifférenciation d'un fibroblaste. (D'après Vierbuchen et Wernig, 2011).

II-4) Intérêts et potentiel thérapeutique des cellules souches pluripotentes

L'entretien et la fonction de nombreux tissus (moelle osseuse, peau, système digestif…) dépendent d'un pool de cellules souches adultes (multipotentes). Un défaut génétique ou un épuisement de ce pool de cellules souches est souvent à l'origine de maladies graves. La découverte puis la génération de cellules souches pluripotentes (ES et iPS) représentent un espoir dans les domaines des thérapies cellulaire et génique. Ces cellules aux capacités d'autorenouvellement et de pluripotence vont probablement permettre des avancées uniques dans le traitement de maladies dégénératives, génétiques, inflammatoires… Mais elles sont également un outil indéniable dans la compréhension des processus du développement embryonnaire, dans la modélisation de maladies et dans des études de pharmacologie.

II-4-1) Potentiels thérapeutiques des cellules souches pluripotentes

La capacité des cellules ES à coloniser la lignée germinale permet de manipuler le génome murin en les utilisant comme vecteur. Il est en effet possible de générer des mutations ou au contraire de restaurer un phénotype dans le génome des ES murines et de créer des souches de souris modélisant une pathologie (Greaves *et al*. 1990 ; Shehee *et al*. 1993 ; Ged *et al*. 2006).

Les cellules pluripotentes et notamment les cellules ES, permettent d'étudier les facteurs contrôlant la prolifération et la différenciation lors du développement de l'embryon, notamment lors de surexpression ou de répression de gènes sans avoir à se soucier du devenir de l'embryon.

Grâce à leur potentiel de différenciation, les cellules pluripotentes sont impliquées dans de nombreuses études à visée thérapeutique. Ainsi les cellules ES murines ont pu être différenciées en une grande variété de cellules matures voire même en structures tissulaires (neurones, adipocytes, myocytes squelettiques et cellules hématopoïétiques, cardiomyocytes, structures vasculaires complètes… Bain *et al*. 1995 ; Dani *et al*. 1997 ; Wiles et Keller, 1991 ; Wobus *et al*. 1991 ; Yamashita *et al*. 2000). Des études de transplantations de ces cellules ont montré une fonctionnalité de ces cellules *in vivo* dans des modèles murins de scléroses multiples, de lésions de la moelle épinière ou d'infarctus du myocarde, pouvant

potentiellement améliorer la pathologie (Brustle *et al*. 1999 ; Liu *et al*. 2000 ; Klug *et al*. 1996).

Les recherches sur les cellules ES humaines s'inscrivent dans la lignée de leurs homologues murines. De nombreuses protocoles de différenciation ont été mis au point soit en modulant le milieu de culture (stroma et cytokines variables selon la différenciation cellulaire désirée) soit en surexprimant un ou plusieurs facteurs de différenciation connus pour engendrer la différenciation souhaitée. Les cellules embryonnaires humaines ont pour le moment été différenciées avec succès en beaucoup de cellules différenciées issues des trois feuillets germinaux embryonnaires : tissu neural (Zhang *et al*. 2001 ; Schuldiner *et al*. 2001 ; Reubinoff *et al*. 2001), cellules sécrétrices d'insuline (Assady *et al*. 2001), cardiomyocytes (He *et al*. 2003 ; Kehat *et al*. 2003 ; Boheler *et al*. 2002 ; Mummery *et al*. 2003), cellules hématopoïétiques (Chadwick *et al*. 2003 ; Kaufman *et al*. 2001 ; Itskovitz-Eldor *et al*. 2000), cellules endothéliales (Levenberg *et al*. 2002), ostéoblastes (Sottile *et al*. 2003), hépatocytes (Rambhatla *et al*. 2003)… Une population différenciée et fonctionnelle peut ensuite être sélectionnée par immunomarquage en cytométrie de flux ou par sélection en culture *in vitro* avec un gène de sélection sous contrôle d'un promoteur tissu-spécifique. Aubry et collaborateurs ont ainsi montré qu'il était possible de différencier les cellules ES humaines en neurones du striatum dans l'optique d'une greffe chez les patients atteints par la maladie de Huntington (Aubry *et al*. 2008 ; Aubry *et al*. 2009). Ces cellules pourraient ainsi remplacer les neurones fœtaux utilisés jusque-là dans le cadre de la thérapie cellulaire de cette maladie. Ces neurones provenant d'embryons étant issus d'IVG (Interruption Volontaire de Grossesse), la quantité et le « contrôle-qualité » des neurones sont difficiles à assurer. La différenciation de neurones à partir de cellules ES pourraient grandement améliorer ces paramètres, même si les études menées jusqu'à présent ont mis à jour d'autres problèmes. En effet, une prolifération excessive des neurones issus de cellules ES greffées dans des cerveaux de rats modèles pour la maladie entraîne la formation d'une masse importante dans l'hémisphère greffé et comprime les autres aires neurales (Aubry *et al*. 2008). Les cellules ES humaines pourraient donc servir à remplacer des cellules souches adultes multipotentes (cellules souches de la moelle osseuse) ou unipotentes (cellules β-pancréatiques) épuisées ou ayant acquis un défaut génétique les rendant inopérantes ou à l'origine d'une pathologie. Elles pourraient également remplacer les greffes d'organes (comme dans le cas d'une cirrhose du foie) par une thérapie cellulaire diminuant ainsi la demande d'organes (le manque de donneurs étant un problème récurrent). Le problème de compatibilité donneur-receveur ne serait pour autant pas résolu et

nécessiterait un co-traitement à base d'immunosuppresseur pour éviter un rejet de greffe ou dans le cas de la moelle osseuse la maladie du greffon contre l'hôte.

Une réponse à ce problème a été trouvée grâce à la génération de cellules iPS. Ces cellules souches pluripotentes étant dérivées de cellules somatiques du patient, aucun rejet n'est en théorie à envisager en cas de greffe. Grâce à leur potentiel de différenciation équivalent à celui des cellules ES, elles présentent un grand intérêt en médecine régénérative ou thérapie génique. Plusieurs protocoles ont déjà été publiés sur leurs potentielles applications. Wernig et collaborateurs ont ainsi dérivé des précurseurs neuraux issus de cellules iPS de souris capables d'avoir une activité dopaminergique. Ces cellules, greffées dans le cerveau de fœtus de souris (E13,5-E14,5), migrent dans différentes zones du cerveau et se différencient en plusieurs types cellulaires matures et fonctionnels (neurones GABAergique, dopaminergique, cellules gliales...). La greffe de ces cellules différenciées vers la lignée neuronale dopaminergique permet une amélioration de l'état des rats modèles de la maladie de Parkinson (Wernig *et al*. 2008). Un deuxième protocole a montré le potentiel des cellules iPS dans des protocoles de thérapie génique. Des cellules iPS ont été dérivées de fibroblastes d'une souris modèle de la drépanocytose. Une fois corrigées par recombinaison homologue, les cellules iPS sont différenciées en progéniteurs hématopoïétiques et greffées aux souris malades après myélosuppression par irradiation (Hanna *et al*. 2007). Les souris greffées sont corrigées : restauration d'hémoglobine fonctionnelle, de l'hématocrite, de l'anémie… Ces deux études sont des preuves de principe de l'utilité des cellules iPS et de leur grand potentiel dans le traitement des maladies neurodégénératives et des maladies génétiques.

De nombreux groupes ont commencé à appliquer ces protocoles aux cellules humaines. Des iPS de patients de différentes maladies ont été dérivées dans différents buts. Park et collaborateurs dérivent ainsi des lignées de cellules iPS issues de cellules primaires de patients atteints de déficience en adénosine déaminase (adenosine deaminase deficiency-related severe combined immunodeficiency ADA-SCID), syndrome de Shwachman-Bodian-Diamond (SBDS), maladie de Gaucher type III (GD), Dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) and de Becker (BMD), maladie de Parkinson (PD), maladie de Huntington (HD), diabète de type I juvénile (JDM), syndrome de Down (DS)/trisomie 21 et du syndrome de Lesch-Nyhan (Park *et al*. 2008). De nombreuses lignées ont également été dérivées de cellules de patients atteints de maladies neurodégénératives : sclérose amyotrophique latérale (ALS – Dimos *et al*. 2008), Parkinson avec des vecteurs excisables permettant d'obtenir des lignées iPS et des cellules différenciées non perturbées par l'expression de facteurs de transcription

oncogéniques (Soldner *et al*. 2009), amyotrophie spinale (SMA – Ebert *et al*. 2009). Ces lignées vont permettre de tester des thérapies sur les différentes pathologies (tests de substance, thérapie génique…) et de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans une pathologie où les cellules primaires sont difficiles à acquérir (modélisation de la pathologie) (Figure 19). Raya et collaborateurs ont ainsi dérivé des lignées de cellules iPS provenant de patients atteints d'anémie de Fanconi. Après transduction de vecteurs lentiviraux thérapeutiques exprimant le gène FANCA ou FANCD2 (2 des gènes impliqués dans l'anémie de Fanconi), les cellules iPS corrigées sont différenciées en progéniteurs hématopoïétiques présentant un phénotype normal (Raya *et al*. 2009). Egawa et collaborateurs montrent également une restauration partielle de phénotype dans des motoneurones issus de cellules iPS de patients ALS traitées avec un des quatre composés testés (Egawa *et al*. 2012). Comme décrit précédemment, il sera nécessaire lors de l'utilisation de cellules iPS dans une vue thérapeutique, de séquencer le génome et de vérifier le statut épigénétique global de la lignée d'intérêt. Dans le cas d'une thérapie génique, la correction génique ciblée (utilisation de protéines à doigts de zinc ou de TALEN) est à privilégier à un vecteur lentiviral classique nécessitant la recherche de l'intégration ou des intégrations du vecteur par des techniques de séquençage ou de LAM-PCR.

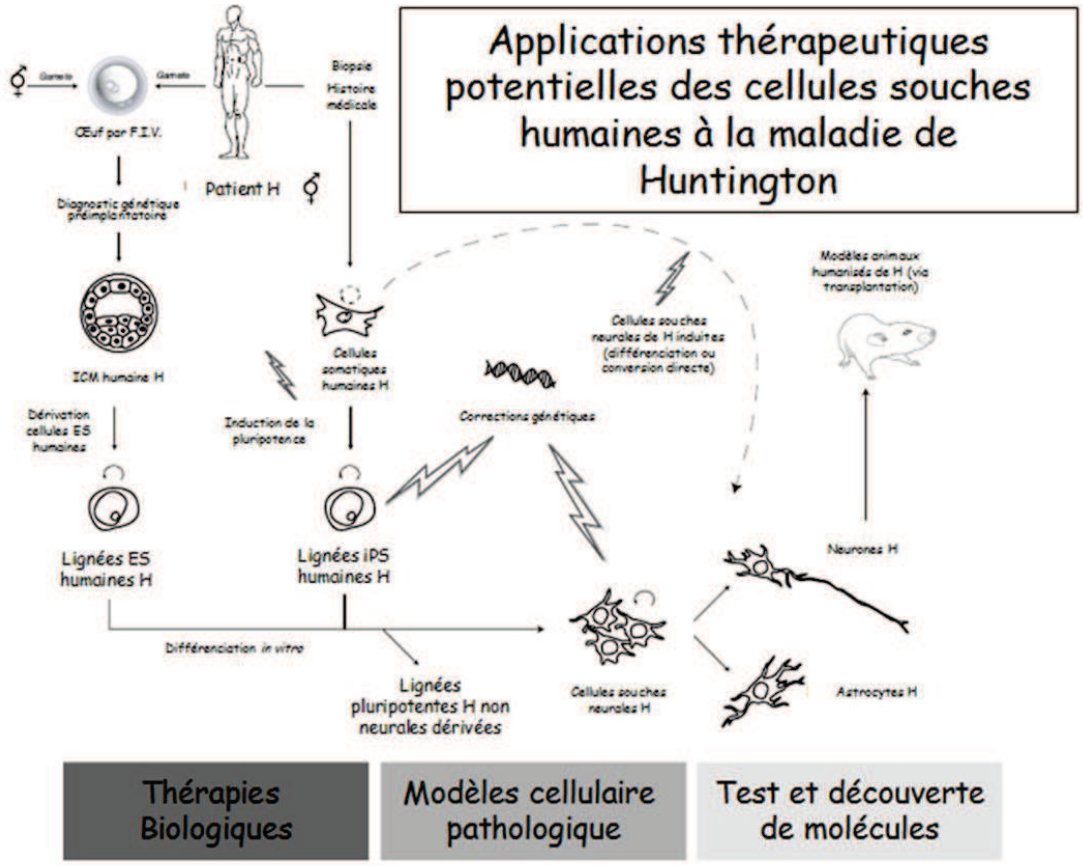


Figure 19. Applications potentielles de cellules iPS humaines dérivées de patients en thérapie ou recherche. Les cellules iPS (ici atteints de la maladie de Huntington) après différenciation permettent de développer des modèles pathologiques, de tester des thérapies ou de tester / découvrir de nouvelles molécules thérapeutiques. (Modifié d'après Perrier et Peschanski, 2012)

Les cellules iPS pourraient donc bientôt être utilisées dans des protocoles de thérapie cellulaire comme c'est déjà le cas pour les cellules ES.

En effet, Keirstead et collaborateurs démontrent en 2005 la restauration partielle de la locomotion par thérapie cellulaire chez des rats artificiellement lésés au niveau de la moelle épinière. Des progéniteurs d'oligodendrocytes, issus de cellules ES humaines différenciées, ont été injectés au niveau de la lésion. Après différenciation en oligodendrocytes, les cellules se sont distribuées autour du dommage de la moelle épinière et ont permis une remyélinisation des fibres nerveuses et parfois une amélioration de la locomotion chez les rats traités peu de temps après la lésion (sept jours) contrairement à ceux traités longtemps après (dix mois) malgré une survie des cellules injectées dans les deux cas (Keirstead *et al*. 2005).

Un essai clinique de phase I a été autorisé par la FDA en 2009 à l'entreprise américaine Geron et a permis de traiter quatre patients (ayant reçu deux millions de cellules) mais a été stoppé en 2011 pour des raisons économiques (Alper, 2009). Dix patients devaient être recrutés lors de cette phase.

Un autre essai clinique a été lancé en Angleterre en 2011 par la compagnie américaine ACT (Advanced Cell Technology) sur la thérapie cellulaire de la maladie de Stargardt, une dystrophie maculaire juvénile et sur la dégénérescence maculaire liée à l'âge. Douze patients participent à cet essai qui fait suite à une publication de 2009 où des cellules épithéliales rétiniennes pigmentaires, issues de cellules ES humaines, ont été greffées à des souris modèles de la maladie de Stargardt et à des rats modèles de dégénérescence rétinienne (Lu *et al*. 2009). Dans cette étude, la thérapie cellulaire a permis de générer une quantité suffisante de photorécepteurs pour améliorer la vue de ces rats de manière dose-dépendante. Les patients de l'essai recevront entre donc des doses différentes de cellules (comprises entre 50 000 et 200 000 cellules) (http://www.advancedcell.com/clinical-trials/stargardts-Macular-Dystrophy.aspx).

Enfin, un essai clinique est préparé en France sur la thérapie cellulaire de l'insuffisance cardiaque. Des résultats encourageants ont été obtenus par différenciation de cellules ES humaines (traitées par un facteur cardiogénique BMP2) en progéniteurs cardiaques dans des modèles d'infarctus du myocarde chez le rat et chez *Macaca Mulatta* (macaque rhésus) (Tomescot *et al*. 2007 ; Blin *et al*. 2010). Les cellules implantées se différencient et recolonisent partiellement la lésion cardiaque chez le rat (environ 3% de la lésion) et de manière plus importante chez le macaque (environ 20% de la lésion cardiaque) suite à une amélioration de protocole consistant à isoler une sous-population de cellules exprimant l'antigène SSEA1.

La thérapie cellulaire et bientôt génique utilisant des cellules pluripotentes humaines forment donc de nouveaux espoirs de médecine régénérative.

Partie III

Approche pharmacologie de la porphyrie érythropoïétique congénitale

Les porphyries sont des maladies provoquées par le déficit d'une des enzymes de la voie de biosynthèse de l'hème. Les mutations à l'origine de ces déficits peuvent être localisées au niveau du promoteur et entraîner une diminution de l'expression du gène. Mais nombre d'entre elles affectent directement la séquence protéique notamment dans le cas de la PEC (Ged *et al*. 2009). Si une mutation apparaît dans ou proche du site catalytique de l'enzyme, celle-ci peut voir son activité diminuée ou supprimée. Mais une mutation, même éloignée du site catalytique, peut bouleverser les interactions inter acides aminés et engendrer une perturbation de la structure tertiaire de la protéine. L'enzyme, mal conformée, crée un stress au niveau du réticulum endoplasmique. La réponse UPR (Unfolded Protein Respons) entraîne la diminution de la synthèse protéique et la dégradation des protéines dont la structure tertiaire est altérée, par le protéasome (Bernales *et al*. 2006). Ce phénomène peut réduire de manière importante la demi-vie de certaines protéines. Cette dégradation cause parfois un déficit non compensé, à l'origine d'une pathologie.

Récemment, Fortian et collaborateurs ont démontré que la mutation la plus fréquente dans la PEC (C73R retrouvée chez un tiers des patients) entraînait un mauvais repliement de l'URO III synthase qui la vouait à une dégradation précoce. L'inhibition du protéasome dans des cellules murines transfectées avec l'ADNc de l'URO III synthase portant cette mutation permet de restaurer partiellement la stabilité de la protéine. Au vu de ces résultats, nous avons étudié le comportement de l'URO III synthase dans des cellules humaines transfectées avec l'URO III synthase mutée (C73R ou P248Q) couplée à la GFP et dans un modèle de souris PEC (porteur de la mutation P248Q) afin d'évaluer le potentiel thérapeutique d'une inhibition du protéasome sur le phénotype engendré par la mutation P248Q *in vitro* et *in vivo*. Dans ce chapitre, nous traiterons donc du fonctionnement des systèmes de dégradation protéique intracellulaire et de l'intérêt de leur ciblage dans le traitement des porphyries érythropoïétiques.

III-1) Les systèmes de dégradation protéique

La cellule, pour le maintien de son homéostasie, nécessite d'éliminer des protéines : pour renouveler un stock de protéines trop vieilles, éliminer les protéines mal conformées et/ou non fonctionnelles, protéines en excès… Pour cela, elle utilise différents systèmes de dégradations.

III-1-1) Le système ubiquitine-protéasome

Ce système fonctionne en deux étapes : l'adressage des protéines à dégrader via la fixation d'une protéine (l'ubiquitine, une petite protéine de 9kDa) et leur dégradation par différentes protéases regroupées dans le complexe multiprotéique appelé protéasome.

La première étape de ce processus consiste en l'activation de la molécule d'ubiquitine par l'enzyme d'activation E1 (ubiquitin-activating enzyme) de manière ATP-dépendante (carboxylation terminale de l'ubiquitine par E1). Cette enzyme fixe par une liaison thioester l'ubiquitine et la transfère sur la protéine E2 (ubiquitine-conjugating enzyme) par une liaison thioester également. Cette protéine activée peut alors interagir avec un troisième intervenant : le complexe protéique E3. E3 est parfois composé de plusieurs protéines et offre ainsi, de part des combinaisons différentes, une spécificité de la protéine-substrat à dégrader (Li *et al*. 2008). L'association E2/ubiquitine/E3 se lie à la protéine cible et y fixe l'ubiquitine via une de ses lysines (Figure 20). Il existe plusieurs formes d'ubiquitinylation entraînant des conséquences différentes pour la protéine ciblée :

- la monoubiquitinylation est la fixation d'une seule molécule d'ubiquitine. Elle n'entraîne pas la destruction de la protéine mais l'ubiquitine fixée peut perturber sa localisation et/ou sa fonction comme dans le cas des protéines Ras (Jura *et al*. 2006).
- La multiubiquitinylation est la fixation d'une ubiquitine par lysine de la protéine cible. Ce signal permet l'endocytose des protéines ciblées (Miranda et Sorkin, 2007).
- La polyubiquitinylation est la fixation de plusieurs ubiquitines sur une seule lysine (Chau *et al*. 1989). Il faut au moins quatre ubiquitines formant une chaîne pour obtenir un signal d'adressage au protéasome.

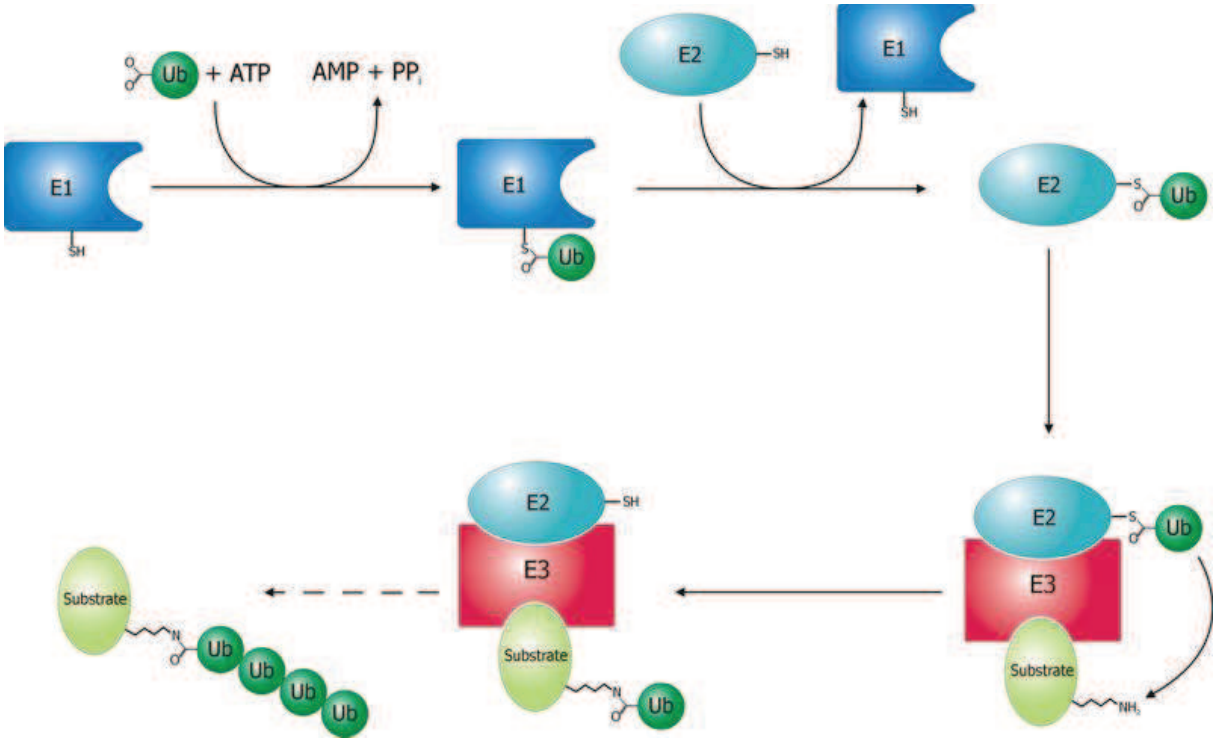


Figure 20. Polyubiquitinylation d'une protéine cible (substrat). La protéine E1 permet l'activation de la protéine ubiquitine (Ub) via la consommation d'une molécule d'ATP. E1 transfère ensuite l'ubiquitine sur la protéine E2. Celle-ci lie la protéine E3 elle-même fixée au substrat. Un transfert de l'ubiquitine de E2 vers le substrat est alors possible. Une chaîne d'au moins quatre ubiquitines est nécessaire pour la dégradation d'une protéine. (D'après Wikipédia : http://en.wikipedia.org/wiki/Ubiquitin_ligase).

La deuxième étape est la reconnaissance de la chaîne d'ubiquitine par le protéasome 26S permettant ainsi la destruction de la protéine. Le protéasome est un complexe multiprotéique composé de plusieurs sous-unités aux fonctions propres en forme de tonneau (Krüger *et al*. 2001).

Le complexe 20S (S pour Svedberg) est composé de 28 sous-unités distribuées en 4 anneaux de sept sous-unités formant un cylindre creux (« baril ») où sont dégradées les protéines. Les deux anneaux internes contiennent les sous-unités β différentes (1 à 7) qui possèdent une activité catalytique (au moins 5 activités peptidasiques différentes ont été caractérisées par l'utilisation de substrats et inhibiteurs différents mais seules 3 ont été localisées physiquement : chymotrypsine-like, trypsine-like et peptidylglutamyl-peptide hydrolase ou caspase-like) (Thèse de Amandine Berthet, 2010). Les deux anneaux externes sont composés de sept sous-unités α différentes (1 à 7) qui contrôlent l'entrée de la protéine à dégrader dans les anneaux internes. Ce contrôle s'effectue via la fixation de sous-unités régulatrices (19S et 11S).

Les sous-unités 19S servent à reconnaître l'ubiquitine liée à la protéine (Lam *et al*. 2002). Le 19S dirige la protéine vers le cœur catalytique du protéasome, assure une partie de la dénaturation de la protéine et possède une isopeptidase permettant la libération des ubiquitines pour leur recyclage. Elle permet également l'activation de la partie 20S grâce à ses

sous-unités ATPases qui génèrent l'énergie nécessaire au dépliement de la protéine à dégrader et à l'ouverture de l'extrémité du complexe 20S (Braun *et al*. 1999).
La sous-unité 11S est composée elle aussi de deux sous-unités hexa ou heptamériques activant la partie 20S en maintenant ouvert le canal mais de façon ATP-indépendante (Förster *et al*. 2005). La partie 11S serait impliquée dans la dégradation de protéines exogènes (virus…) et génèrerait des peptides servant d'antigènes pour le CMH (Goldberg *et al*. 2002).

III-1-2) Le système lysosomal

Un autre système de dégradation des protéines intracellulaires concernent les lysosomes. Ce sont des organites pratiquant une dégradation non sélective des protéines mais aussi des lipides, des sucres et des acides nucléiques grâce aux trois types d'enzymes qu'ils contiennent (protéase, lipases et glycosidases). Le contenu du lysosome est très acide ce qui permet l'action des enzymes hydrolases. Ce pH (variant entre 3,5 et 5) est généré et maintenu par des canaux ioniques (pompes à protons et canaux chlorure) présents dans la membrane de ces organelles. Si un lysosome est dégradé, les enzymes s'en échappant sont inactivées par le pH neutre du cytosol (pH de 7,2).
Les lysosomes servent d' « estomac cellulaire » et digèrent les macromolécules issues d'endocytose (comme le recyclage de récepteur membranaire), de phagocytose (d'une cellule morte ou d'une bactérie) ou encore d'autophagie (recyclage d'une organelle inutile ou vieillissante) (Campbell et Reece, Biologie, 2004). Ils sont indispensables au maintien d'une homéostasie cellulaire comme le prouve les pathologies associées à leur déficience. Ces pathologies rares mais sévères sont toutes dues à une déficience en enzymes lysosomales : maladie de Pompe (alpha-1,4-glucosidase acide), maladie de Tay-Sachs (hexosaminase A), maladie de Gaucher (acide β-glucosidase)… Ceci entraîne l'accumulation de molécules non métabolisées dans les cellules (défaut de génération de glucose à partir du glycogène dans la maladie de Pompe, d'élimination de glucocérébroside dans la maladie de Gaucher…) entraînant des manifestations graves, irréversibles et variées selon la maladie et le patient. Des thérapies sont à l'étude ou déjà utilisées pour certaines de ces maladies allant de l'enzymothérapie, à la greffe de moelle osseuse et la thérapie génique (Bruni *et al*. 2007 ; Ponder *et al*. 2007).

III-2) Approche pharmacologique de la porphyrie érythropoïétique congénitale

Les protéines sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique et parfois maturées dans l'appareil de Golgi (modifications post-traductionnelles comme les glycosylations pour les protéines transmembranaires). Mais elles ne deviennent fonctionnelles qu'après avoir adopté une conformation adéquate. Cette structure tertiaire est guidée par la séquence des acides aminés composant la protéine (structure primaire). Mais certaines protéines nécessitent le concours d'autres protéines appelées chaperonnes qui vont les aider à acquérir une structure tertiaire fonctionnelle. Les chaperonnes, conservées au cours de l'évolution, permettent d'interagir avec un polypeptide nouvellement formé ou une protéine dénaturée afin de l'aider à retrouver sa conformation. Il existe de très nombreuses protéines chaperonnes, conservées dans l'évolution (des bactéries aux mammifères Figure 21). Elles sont de tailles variées (1 million de Daltons (Da) à quelques kDa) dont les plus connues sont les « protéines de choc thermique » (Heat shock proteins, Hsp). Elles fonctionnent généralement de manière ATP-dépendante. La protéine Hsp70 (~70kDa) est la plus étudiée des Hsp. Lorsqu'elle lie l'ATP, son affinité pour les substrats est faible. L'hydrolyse de l'ATP est stimulée par la présence des substrats en forte concentration et par l'action de cofacteurs (protéines co-chaperonnes comme Hsp40). L'hydrolyse de l'ATP entraîne un changement de conformation de l'HSP70 qui fixe un de ses substrats par des liaisons hydrophobes. Sous l'action des cofacteurs et du bouleversement de ses liaisons avec l'Hsp70, la protéine substrat va se replier. Lorsqu'elle atteint sa configuration opérationnelle, Hsp70 libère son ADP, fixe une molécule d'ATP et perd son affinité pour la protéine substrat qui est libérée (Mayer et Bukau, 2005).

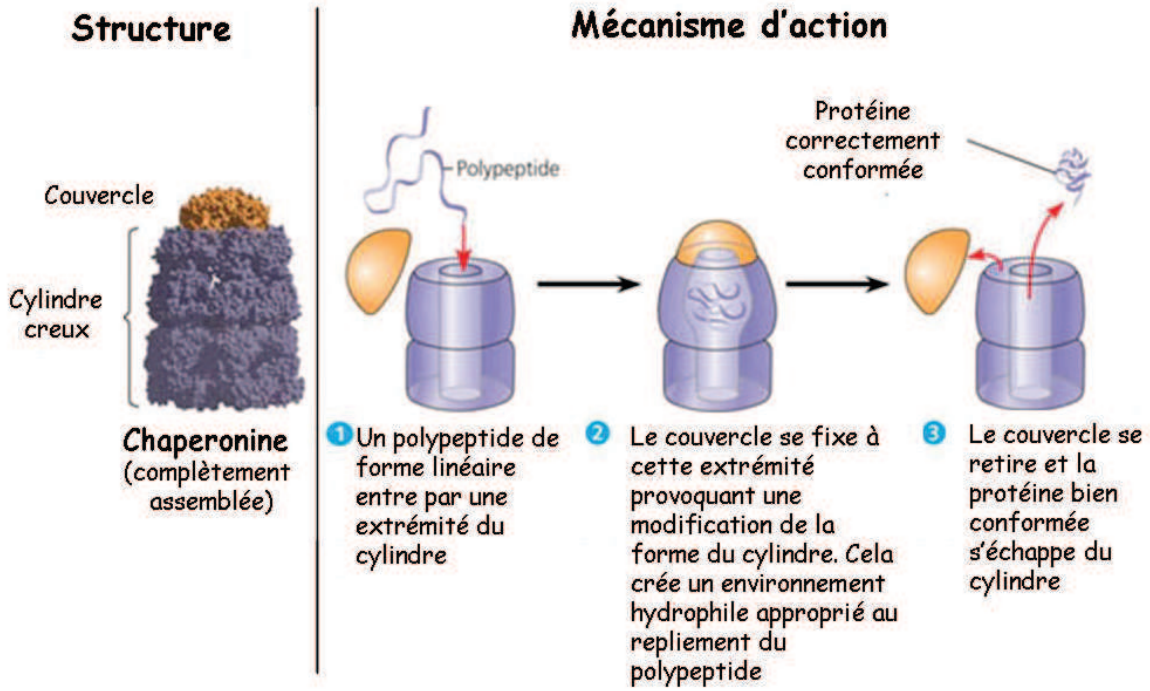


Figure 21. Structure et mode d'action de la chaperonine d'*Escherichia coli*. La chaperonine est formée de 2 sous-ensembles : le couvercle et un cylindre creux. Un peptide nouvellement généré peut entrer dans le cylindre. Le couvercle se referme alors, changeant la configuration du cylindre ce qui apporte des conditions propices pour le repliement du polypeptide. Lorsqu'il est correctement conformé, le couvercle se désengage et la protéine sort, active et fonctionnelle. Modifié d'après Campbell et Reece, Biologie, 2004.

Les chaperonnes sont essentielles à la fonction de nombreuses protéines. En effet, des protéines mal conformées sont à l'origine de pathologies sévères notamment neurologiques comme la maladie d'Alzheimer où la protéine Tau hyperphosphorylée, change de conformation et s'agrège, n'assurant plus le maintien de la stabilité des microtubules et dégradant ainsi le transport intracellulaire de vésicules neuronales (Hernandez et Avila, 2007). Dans le cas de la maladie de Huntington, la protéine huntingtine mutée est clivée libérant un fragment côté N-terminal. Ces fragments s'agrègent dans les cellules et causent, par un mécanisme encore mal compris, le phénotype (Zheng et Diamond, 2012).

Récemment, Fortian et collaborateurs, à la recherche de la cause moléculaire du déficit en UROS dans la porphyrie érythropoïétique congénitale, ont démontré que la PEC pouvait être causée par une mauvaise conformation de cette protéine (Fortian *et al*. 2009). En effet, à partir de mutations faux sens retrouvées chez les patients, les auteurs ont exprimé et purifié *in vitro* ces protéines. Chaque protéine mutée conserve une activité catalytique intrinsèque (Tableau 9). Certaines mutations diminuent l'activité enzymatique (<30% C73R, p248Q). D'autres, au contraire, n'entraînent que peu voire aucune perte d'activité quand la protéine est exprimée dans *Escherichia coli* contrairement à ce qui est observé chez les patients (S47P, Ged *et al*. 2004) suggérant un mécanisme différent qu'une perte de fonction conduisant au phénotype porphyrique.

Mutant	Fréquence[a]	Taux de purification[b]	Taux de rESA[c] (%)	E^d_a(kcal/mol)
V3F	2	18.7	19.3 ± 2.8	113.0 ± 9.2
L4F	4	3.2	20.2 ± 1.2	100.3 ± 6.0
Y19C	1	16.2	13.1 ± 2.2	63.4 ± 8.2
S47P	6	1.7	100.0 ± 1.1	96.0 ± 4.3
P53L	3	0.0	na	na
T62A	1	27.7	1.2 ± 0.1	27.7 ± 0.8
A66V	1	54.8	95.6 ± 0.2	32.0 ± 2.6
A69T	5	13.6	24.4 ± 1.3	42.1 ± 6.8
C73R	31	4.4	14.5 ± 1.2	22.0 ± 9.5
E81D	1	39.4	100.0 ± 3.0	87.0 ± 4.4
V82F	1	26.3	93.8 ± 1.8	87.0 ± 0.6
V99A	4	9.4	88.2 ± 5.1	103.4 ± 6.0
A104V	1	23.0	60.6 ± 3.7	91.5 ± 2.3
I129T	2	1.9	20.0 ± 4.0	67.8 ± 1.4
H173Y	2	4.0	72.6 ± 1.4	33.0 ± 0.9
Q187P	1	1.2	15.0 ± 1.9	71.1 ± 2.5
G188R	2	2.2	41.4 ± 7.6	78.9 ± 7.8
G188W	1	2.3	31.6 ± 4.3	78.7 ± 3.2
S212P	3	8.3	20.0 ± 4.1	33.6 ± 2.4
I219S	2	3.0	85.0 ± 5.0	40.0 ± 1.1
G225S	5	26.6	32.4 ± 10.2	92.0 ± 4.8
T228M	3	54.8	97.5 ± 2.5	95.7 ± 3.4
G236V	1	5.8	34.0 ± 3.9	44.2 ± 1.8
L237P	2	2.8	57.9 ± 2.2	46.7 ± 9.0
P248Q	8	2.5	29.2 ± 3.2	86.2 ± 5.5

[a]Compilées à partir de tous les cas reportés dans la littérature [b]Rendement de purification de protéine recombinante par rapport à l'URO III synthase WT [c]Rapportée à l'activité enzymatique de l'URO III synthase WT. Les erreurs ont été estimées à partir de 2 mesures. [d]Valeurs pour WT : 101,5 kcal/mol. Les erreurs ont été estimées à partir de la courbe linéaire cinétique/température.

Tableau 9. Valeurs de l'activité spécifique et de stabilité des mutants de l'URO III synthase retrouvées chez les patients. Modifié d'après Fortian *et al*. 2009

Du fait du caractère labile de l'UROS (Omata *et al*. 2004), les auteurs étudièrent la stabilité des différents mutants à la recherche de conformations inopérantes pour l'enzyme. Le résultat de leur étude met en évidence une région formant une hélice indispensable à la stabilité de la protéine. Cette région est formée par des acides aminés qui sont retrouvés mutés dans des cas de PEC dont la cystéine en position 73. La mutation C73R (remplacement d'une cystéine par une arginine en position 73) bouleverse les interactions au niveau de cette région et affecte la structure tertiaire de l'UROS. Mais la présence de cette cystéine n'est pourtant pas obligatoire car la mutation C73D n'engendre pas de diminution de la stabilité de l'enzyme. L'ajout d'un acide aminé chargé positivement (arginine) perturbe la conformation de la protéine quand une charge négative permet de la stabiliser et de faire perdurer son action (Fortian *et al*. 2011). La protéine mutée en C73R conserve une partie de son activité enzymatique mais la mutation accélère son changement de conformation vers une structure tertiaire inadéquate et son agrégation. La protéine mal repliée est reconnue par le système de

dégradation du protéasome et détruite très rapidement expliquant la déficience à l'origine de la pathologie (demi-vie de 15min contre 2,5 jours pour l'UROS-WT à 37°C) (Fortian *et al*. 2011 et Figure 22). L'expression du gène muté, analysée par qRT-PCR, ne montre aucune répression transcriptionnelle confirmant la théorie d'une dégradation protéique.

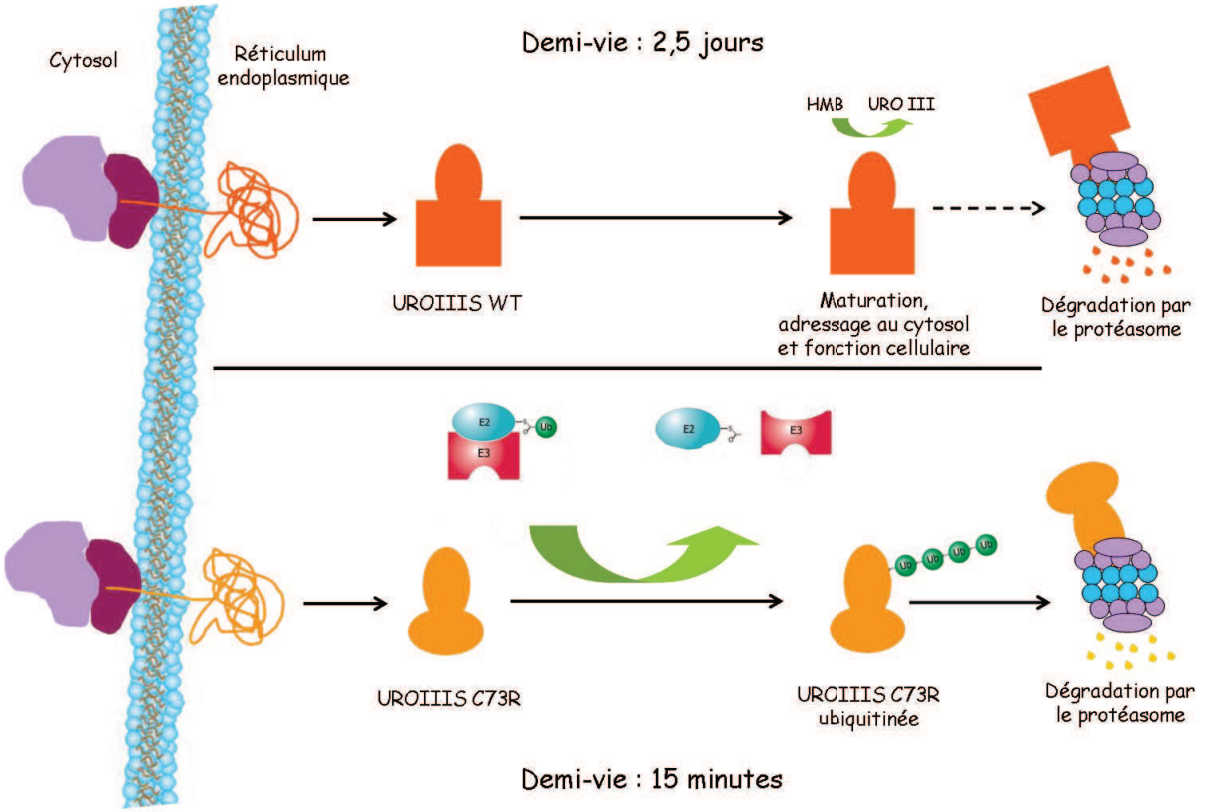


Figure 22. Synthèse et dégradation de l'URO III synthase WT ou mutée (C73R). La protéine mutée est très vite déstabilisée et prend une mauvaise conformation : celle-ci est reconnue par les ubiquitines ligases l'adressant au protéasome pour dégradation réduisant sa demi-vie et causant une perturbation de la voie de biosynthèse de l'hème.

L'inhibiteur du protéasome utilisé (MG132) conduit à l'accumulation de l'UROS-C73R dans les cellules exprimant une protéine de fusion UROS-GFP (Fortian *et al*. 2011). L'inhibition des lysosomes ne permet pas de réduire la dégradation protéique confirmant que celle-ci est opérée par le protéasome majoritairement. La même accumulation protéique est observée pour la protéine WT et les protéines ubiquitinylées lors de l'ajout de MG132 dans le milieu. Les protéines mutées, contrairement, aux protéines WT, s'agrègent et forment des amas intracellulaires mais conservent tout de même leur activité enzymatique (~50% de l'activité enzymatique de la protéine normale – Fortian *et al*. 2011). Une activité enzymatique de cette importance serait suffisante chez un patient pour ne plus causer de troubles, supportant l'hypothèse qu'un traitement au niveau moléculaire par inhibition de la dégradation de la protéine serait thérapeutique. Ce type de traitement serait potentiellement

moins risqué que les traitements curatifs conventionnels (greffe de moelle osseuse) ou qu'une thérapie génique (plus de risque de mutagenèse insertionnelle).

La mutation P248Q (touchant ~5% des patients) fait également partie des mutations réduisant l'activité enzymatique bien que la proline en position 248 n'intervienne pas structurellement dans le site catalytique de l'UROS. Au vue des résultats obtenus par Fortian et collaborateurs, nous avons étudié les conséquences d'une inhibition du protéasome sur le phénotype porphyrique causé par les mutations C73R et P248Q *in vitro* sur des cellules transfectées avec des protéines de fusion UROS mutée-GFP et *in vivo* dans le modèle de souris exprimant la mutation P248Q que nous possédons au laboratoire (Ged *et al*. 2006). Ces résultats sont présentés dans la 4ème partie du chapitre Résultats.

Résultats

Présentation générale

L'hème est un composé impliqué dans le transport de l'oxygène dans les érythrocytes mais il participe également à la synthèse de nombreuses protéines en tant que groupe prosthétique (cytochromes principalement). L'hème est produit dans tous les tissus mais la moelle osseuse (compartiment érythroïde) et le foie sont majoritairement impliqués dans sa synthèse. Les porphyries érythropoïétiques sont des pathologies liées à un déficit d'une des enzymes de la voie de biosynthèse de l'hème et sont caractérisées par une accumulation de molécules précurseurs de l'hème (porphyrines) dans les cellules de la moelle osseuse et leurs dérivés particulièrement dans le compartiment érythroïde. On distingue 3 types de porphyries érythropoïétiques : la porphyrie hépatoérythrocytaire (PHE), la porphyrie érythropoïétique congénitale (PEC) et la protoporphyrie érythropoïétique (PPE).

Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressé à la PEC et à la PPE. La PEC est caractérisée par une photosensibilité et une anémie hémolytique de sévérité variable. Le seul traitement curatif pour les formes sévères de ces deux pathologies est la greffe de moelle osseuse allogénique qui nécessite la disponibilité d'un donneur HLA-compatible. Vingt-deux cas de thérapie cellulaire de la PEC ont été rapportés dans la littérature (Handbook of porphyria, sous presse, 2013). Ce traitement a permis une réversion complète du phénotype pathologique pour la majorité des patients (4 échecs, notamment liés à des complications infectieuses) (cf. Tableau 4). La PPE, généralement bénigne, est essentiellement caractérisée par une photosensibilité cutanée. La gravité de cette maladie réside dans l'atteinte hépatique pouvant conduire à une insuffisance hépatocellulaire (affectant environ 1 à 10% des malades).

La notion de bénéfice/risque est donc à évaluer en fonction de l'atteinte hépatique (seules 4 transplantations de moelle osseuse ont été réalisées depuis 2002, cf. Tableau 5). Au plan physiopathologique, des dépôts de protoporphyrine IX dans les hépatocytes et les canalicules biliaires sont à l'origine d'une cholestase et d'une cirrhose susceptible de décompenser en insuffisance hépatique nécessitant une greffe de foie orthotopique. Une quarantaine de cas de greffes hépatiques ont été décrits dans la littérature pour la PPE (Anstey et Hift, 2007). En l'absence de correction du déficit enzymatique dans la moelle osseuse, l'accumulation endogène massive de protoporphyrine dans la lignée érythroïde conduit à une récidive élevée de la maladie hépatique. La correction du déficit en ferrochélatase (FECH) hépatique ne suffit

donc pas à enrayer l'atteinte hépatique de la PPE. Sur le plan expérimental, des études de thérapie cellulaire dans un modèle murin de PPE (*Fech*^{m1Pas}/*Fech*^{m1Pas}) montrent qu'une greffe de cellules souches hématopoïétiques permet de corriger la photosensibilité cutanée sans amélioration des paramètres hépatiques. Des études ont montré une amélioration partielle de ces paramètres par une greffe de moelle osseuse pratiquée sur de jeunes adultes murins (Fontanellas *et al*. 2000 ; Garcia-Bravo *et al*. 2009). La greffe semble avoir été pratiquée trop tardivement pour corriger la fibrose hépatique qui était déjà installée.

Dans la 1ère partie de ma thèse, nous avons cherché à déterminer la cinétique d'apparition de l'atteinte hépatique dans un modèle murin de PPE. Les premiers dépôts de protoporphyrines IX (PPIX), responsables de la dégradation progressive des paramètres hépatiques, apparaissent de manière précoce (2ème semaine de vie). Puis nous avons cherché à déterminer si une greffe précoce de moelle osseuse pouvait empêcher ces dépôts. Pour cela, nous avons développé un nouveau protocole de conditionnement chez les nouveau-nés. Nous avons greffé les souris à J2-3 et nous avons observé une forte amélioration des paramètres hépatiques. Nous démontrons ainsi que l'atteinte hépatique est essentiellement due à un déficit enzymatique dans le compartiment érythroïde de la moelle osseuse (et non au seul déficit enzymatique hépatique). La thérapie cellulaire précoce permet donc de prévenir tous les signes de la pathologie (Résultats 1).

Dans la 2ème partie de ma thèse, nous nous sommes intéressés à la thérapie génique des porphyries érythropoïétiques et à l'intégration des cellules iPS dans ces protocoles thérapeutiques. Les cellules iPS sont des cellules souches pluripotentes provenant de cellules matures et ayant la capacité de se différencier à façon et notamment en progéniteurs hématopoïétiques. Elles pourraient ainsi devenir une source alternative de cellules souches hématopoïétiques autologues corrigées. De plus, il est possible de caractériser des lignées iPS corrigées à l'état clonal afin de déterminer les sites d'insertion du vecteur thérapeutique (par LAM-PCR ou séquençage) et de réduire les risques d'oncogenèse insertionnelle.

Pour tester la faisabilité d'un tel protocole de thérapie génique des porphyries érythropoïétiques nous avons d'une part, généré des cellules iPS à partir de cellules épidermiques d'un patient PEC. Les cellules iPS humaines ont été transduites avec un vecteur thérapeutique, caractérisées et différenciées en progéniteurs hématopoïétiques puis en cellules érythroïdes. Les clones iPS présentant un site d'intégration du vecteur thérapeutique suffisamment éloigné d'oncogènes ont été sélectionnés par LAM-PCR. La correction du

phénotype porphyrique a été observée par un dosage de l'activité de l'UROS et de la quantité de porphyrines dans les cellules érythroïdes générées (Résultats 2).

D'autre part, des cellules iPS ont été générées à partir de fibroblastes dérivés d'un modèle murin de PEC ou PPE. Les cellules iPS murines ont été corrigées par transduction d'un vecteur lentiviral thérapeutique et leur pluripotence a été caractérisée *in vitro* et *in vivo*. La différenciation hématopoïétique n'a pour le moment pas pu être finalisée. Cette étape est un prérequis avant la transplantation dans les modèles murins (Résultats 3). Ici nous démontrons qu'un protocole de thérapie génique des porphyries érythropoïétiques utilisant les cellules iPS peut être efficace pour la correction de cellules humaines. Les études sur les modèles murins permettront de vérifier cette efficacité *in vivo*.

Dans une 3ème partie, nous nous sommes intéressés à une approche thérapeutique pharmacologique de la PEC basée sur l'inhibition du protéasome. En effet, une étude fonctionnelle récente des différents mutants de l'UROS a permis de révéler que certaines mutations faux sens de l'UROS n'affectaient pas le site actif de l'enzyme. *In vitro*, l'étude s'est focalisée sur la mutation C73R retrouvée dans un tiers des cas de PEC. Dernièrement, Fortian et collaborateurs ont démontré que le déficit en UROS causée par la mutation C73R entraînait un changement de conformation rendant la protéine thermodynamiquement instable et sa dégradation prématurée (Fortian *et al*. 2011). En effet, dans la cellule, les protéines mal conformées et leur accumulation génèrent un stress dans le réticulum endoplasmique conduisant à un adressage des protéines au protéasome (réponse UPR : Unfolded Protein Response, Bernales *et al*. 2006). L'inhibition du protéasome par un inhibiteur spécifique entraîne l'accumulation de l'UROS-C73R qui montre une activité enzymatique résiduelle équivalente à 50% de l'activité normale. Ainsi, le défaut de conformation induit par la mutation C73R entraîne son adressage et sa dégradation prématurée par le protéasome.
L'étude fonctionnelle révèle également une similitude dans les stabilités des protéines mutées UROS-C73R et UROS-P248Q (Fortian *et al*. 2009). Comme nous disposons au laboratoire du modèle murin de PEC porteur de la mutation P248Q (*Uros*$^{P248Q/P248Q}$), nous avons voulu déterminer si cette autre mutation faux sens entraînait également une dégradation prématurée de la protéine (Ged *et al*. 2006). Pour cela, nous avons transfecté de manière stable une lignée cellulaire érythroïde humaine (K562) avec des plasmides exprimant la protéine de fusion UROS WT-GFP ou portant la mutation C73R ou P248Q. Les protéines mutées, non détectable en condition contrôle, sont accumulées dans les cellules et détectables par cytométrie après un traitement des cellules avec les inhibiteurs du protéasome. *In vivo*, le traitement du modèle murin avec un inhibiteur du protéasome entraîne une diminution du taux

de fluorocytes circulants dès la première semaine de traitement. Cette diminution se poursuit au cours des semaines jusqu'à atteindre 50% du taux observé chez les souris PEC contrôles. Ceci permet une amélioration significative de la photosensibilité cutanée chez les souris traitées. Ces travaux préliminaires sont une preuve de concept montrant qu'une inhibition du protéasome permet de corriger partiellement le déficit enzymatique en UROS dans les cas des mutations faux sens C73R et P248Q. Ces résultats ouvrent des perspectives sur de nouvelles thérapies basées sur traitement pharmacologique de la PEC (Résultats 4).

Résultats 1 :

Article 1
Neonatal bone marrow transplantation prevents liver disease in a murine model of erythropoietic protoporphyria

Duchartre, Y., Petit, N., Moya, C., Lalanne, M., Dubus, P., Verneuil, H., Moreau-Gaudry, F., and Richard, E. (2011). Neonatal bone marrow transplantation prevents liver disease in a murine model of erythropoietic protoporphyria. Journal of hepatology *55*, 162-170.

Résultats 1 :

Thérapie cellulaire de la protoporphyrie érythropoïétique

La protoporphyrie érythropoïétique (PPE) est une maladie causée par un déficit en ferrochélatase, la dernière enzyme de la voie de biosynthèse de l'hème. Une mutation gain de fonction sur le gène codant pour l'ALAS2 entraine les mêmes symptômes qu'une PPE (Protoporphyrie Erythropoïétique Dominante Liée à l'X - XLDPP). Le déficit enzymatique en FECH aboutit à l'accumulation de protoporphyrine IX (PPIX) dans tous les tissus et plus particulièrement dans la moelle osseuse, les érythrocytes, le plasma et le foie. Le principal symptôme de cette pathologie est une photosensibilité cutanée responsable d'érythèmes apparaissant rapidement après l'exposition solaire mais généralement sans cicatrice ou mutilation. La PPIX plasmatique est filtrée par le foie et, tout comme la PPIX hépatique, s'accumule et précipite dans les cellules hépatiques et dans les canaux biliaires. Les occlusions générées (lithiase biliaire) entraînent une cholestase suivie d'une fibrose débouchant parfois sur une insuffisante hépatique nécessitant une greffe de foie.

Les traitements symptomatiques consistent à éviter toute exposition solaire pour la photosensibilité cutanée associée (protections solaires et prise de β-carotène). La transplantation hépatique est le seul traitement efficace dans les cas d'atteinte hépatique sévère (1 à 10% des cas de PPE) bien qu'elle ne corrige pas le défaut enzymatique présent dans la moelle osseuse, principal organe responsable de la production de PPIX. De ce fait, une nouvelle progression de l'atteinte hépatique quelques temps après la greffe est souvent constatée (Anstey et Hift, 2007). Le seul traitement curatif est une greffe de moelle osseuse provenant d'un donneur HLA-compatible. Des protocoles de thérapies cellulaires dans un modèle murin de PPE (souris *Fech*^{m1Pas}/*Fech*^{m1Pas}) ont permis de démontrer l'efficacité de cette thérapie. Ce modèle murin reproduit fidèlement les symptômes la maladie humaine : anémie hypochrome, photosensibilité cutanée et atteinte hépatique sévère systématique (dépôts de PPIX et cholestase - Tutois *et al*. 1991). La correction de ce modèle a été obtenue par greffe de moelle osseuse : l'activité enzymatique de la ferrochélatase est alors restaurée dans la moelle osseuse et corrigeant ainsi la photosensibilité cutanée (Fontanellas *et al*. 2000). Fontanellas et collaborateurs démontrent également une réversion partielle des lésions hépatiques lors du traitement de jeunes animaux déficients. Cependant, aucun traitement ne parvient à inverser complètement les lésions hépatiques, la transplantation de moelle osseuse étant peut-être pratiquée trop tardivement. Notre hypothèse de travail était qu'une greffe de moelle osseuse, antérieure aux dépôts de PPIX dans le foie, permettrait peut-être de corriger

le déficit enzymatique assez précocement pour ne pas altérer le foie des souris PPE, tout en corrigeant leur photosensibilité.

Or, la cinétique d'apparition des lésions hépatiques n'était pas connue. Nous avons donc dans un premier temps, déterminé à quel moment du développement, les premiers dépôts de PPIX apparaissaient dans le foie. Pour cela, nous avons sacrifié des souris à des temps différents. Nous avons observés les premiers dépôts vers le 12ème jour de vie, s'accumulant progressivement avec l'âge. La fibrose hépatique étant irréversible une fois installée, nous nous sommes demandé s'il était possible de prévenir ces lésions par une greffe précoce (avant le 12 ème jour). Pour cela, nous avons mis au point un protocole de myélosuppression chez le nouveau-né. Contrairement aux protocoles précédents entraînant une mortalité élevée et un prise de greffe inégale (irradiation totale des nouveau-nés ou traitement de la mère au busulfan), nous avons choisi de traiter directement les nouveau-nés par une à deux doses de busulfan, injectées par voie intrapéritonéale à J1 et 2 puis par une greffe de cellules souches hématopoïétiques par voie intraveineuse (par la veine faciale visible les premiers jours de vie). La dose de 10mg/kg, injectée à 24h d'intervalle, engendre une faible mortalité, aucune toxicité et un bon chimérisme. Finalement, les nouveau-nés traités de manière précoce ont été complètement corrigés : ils ne présentaient plus de photosensibilité et aucune lésion hépatique, démontrant ainsi l'efficacité d'une thérapie cellulaire précoce dans ce modèle murin (Article 1).

Research Article

EASL EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER | JOURNAL OF HEPATOLOGY

Neonatal bone marrow transplantation prevents liver disease in a murine model of erythropoietic protoporphyria

Yann Duchartre[1,2,#], Nicolas Petit[1,2,#], Corrine Moya[1,2], Magalie Lalanne[1,2], Pierre Dubus[3], Hubert de Verneuil[1,2], François Moreau-Gaudry[1,2], Emmanuel Richard[1,2,*]

[1]*Univ. de Bordeaux Biothérapies des maladies génétiques et cancers, U1035, F-33000 Bordeaux, France;* [2]*INSERM, Biothérapies des maladies génétiques et cancers, U1035, F-33000 Bordeaux, France;* [3]*EA 2406 Histology and Molecular Pathology of Tumors, Univ. Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux F33076, France*

Background & Aims: Erythropoietic protoporphyria (EPP) is an inherited disorder of heme biosynthesis caused by partial ferrochelatase deficiency, resulting in protoporphyrin IX (PPIX) accumulation in erythrocytes, responsible for skin photosensitivity. In some EPP patients, the development of cholestatic liver injury due to PPIX accumulation can lead to hepatic failure. In adult EPP mice, bone marrow transplantation (BMT) leads to skin photosensitivity correction but fails to reverse liver damages, probably because of the irreversible nature of liver fibrosis. Our aim was to determine the time course of liver disease progression in EPP mice and to evaluate the protective effect of BMT into neonates.
Methods: We studied the development of liver disease from birth in EPP mice, in relation with erythroid and hepatic PPIX accumulation.

To prevent the development of liver disease, BMT was performed into newborn mice using a novel busulfan-mediated preconditioning assay.
Results: We showed that hepatic PPIX accumulates during the first 2 weeks and correlates with the onset of a progressive liver fibrosis in 12-day-old EPP mice. Transplantation of normal congenic hematopoietic stem cells into EPP neonates led to long-term donor hematopoiesis recovery. A full correction of erythroid PPIX accumulation and skin photosensitivity was obtained. Furthermore, five months after neonatal BMT, liver damage was almost completely prevented.
Conclusions: We demonstrated for the first time that BMT could be successfully used to prevent liver disease in EPP mice and suggested that BMT would be an attractive therapeutic option to prevent severe liver dysfunction in EPP patients.

Keywords: Porphyria; Liver fibrosis; Cirrhosis; Cellular therapy; Newborn transplantation.
Received 26 July 2010; received in revised form 2 September 2010; accepted 19 September 2010; available online 23 October 2010
* Corresponding author. Address: INSERM U1035, Université Segalen Bordeaux, Bordeaux F-33000, France. Tel.: +33 5 57 57 13 73; fax: +33 1 44 41 24 46.
E-mail address: Emmanuel.Richard@u-bordeaux2.fr (E. Richard).
[#] These authors contributed equally to this work.
Abbreviations: BMNC, bone marrow nucleated cells; BMT, bone marrow transplantation; BM, bone marrow; BU, busulfan; EPP, erythropoietic protoporphyria; FECH, ferrochelatase; HSC, hematopoietic stem cells; MFI, mean fluorescence intensity; PPIX, protoporphyrin IX; RBCs, Red blood cells.

© 2010 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

EPP is an inborn error of heme biosynthesis, inherited with both recessive and dominant patterns, caused by a partial deficiency of the mitochondrial enzyme ferrochelatase (FECH, EC 4.99.1.1), which catalyzes the insertion of ferrous iron into protoporphyrin IX (PPIX) [1]. Reduced FECH enzymatic activity results in the accumulation of PPIX in erythrocytes, plasma, feces, and the liver. PPIX is highly toxic and induces tissue damages through reactions with free radicals, especially in the skin after light exposure [1]. EPP is characterized clinically by the childhood onset of lifelong cutaneous photosensitivity and is commonly associated with mild microcytic and hypochromic anemia [1,2]. Ferrochelatase is highly active in cells that produce heme including erythroid precursors in the bone marrow (BM) and hepatocytes. However, in EPP patients, the majority of PPIX (80% or more) originates from the BM and especially the erythroid lineage, with most of the remainder generated by the liver [3]. PPIX is excreted by the liver and is insoluble in the bile where it exerts cholestatic effects leading to architectural changes in the hepatobiliary system, ranging from mild inflammation to fibrosis and cirrhosis. There is a wide variation in the severity of liver disease in EPP patients, but PPIX deposition, liver damage, as well as abnormal biochemical parameters of liver function are relatively common. Severe PPIX-induced hepatotoxicity is a rare complication occurring in 1–16% of patients for whom liver transplantation is often required [3,4]. However, liver transplantation fails to correct the underlying metabolic deficiency, and PPIX damage to the transplanted liver is likely.

A mouse model of EPP was obtained by chemical mutagenesis using ethylnitrosourea [5]. The $Fech^{m1Pas}/Fech^{m1Pas}$ mouse accumulates massive amounts of PPIX in the BM, erythrocytes, and the liver and displays features of normocytic and hypochromic hemolytic anemia, photosensitivity, and severe hepatobiliary disease. The obstruction and damage of large and small bile ducts by PPIX deposits cause PPIX accumulation in the parenchyma and cytotoxic damage of hepatocytes [6,7]. The $Fech^{m1Pas}$ mutation has been introduced into three different congenic mouse strains:

the originally described BALB/cByJCrl, C57BL/6JCrl, and SJL/JOrlCrl [8]. These three strains present with different BM and liver PPIX accumulation patterns, liver disease severity, and biliary PPIX excretion. This demonstrates that the EPP phenotype in mice is modulated by the genetic background, suggesting that one or several modifying genes are involved.

Since most of the accumulated-PPIX originates from the BM, hematopoietic stem cell (HSC) replacement therapy could be viewed as a therapeutic option for EPP [9,10]. BM transplantation (BMT) was successfully used in conjunction with liver transplantation to prevent recurrent liver failure [11,12]. We and others demonstrated a dramatic decrease in plasma and erythrocyte PPIX content, associated with the complete cure of skin photosensitivity after BMT in EPP mice [13–17]. These experiments highlight the absence of natural selective advantage of normal hematopoietic cells in this model and demonstrate the need for efficient HSC gene delivery to cure EPP in mice. However, the liver damage that is invariably present in EPP mice was not or only moderately improved by this treatment, especially if BMT was performed in adult mice (>2 months) with already developed severe hepatitis [13–17]. These results suggest that, when severe liver damage is installed (fibrosis and cirrhosis), a metabolic correction limited to the hematopoietic compartment is insufficient to reverse the liver pathology in EPP mice.

In this paper, we determined the time course of liver disease progression in EPP mice. We demonstrated that, in 2-day-old EPP mice, most of the erythrocytes accumulate excessive amounts of PPIX whereas the liver contains normal PPIX concentration. We showed that PPIX content increases during the first 2 weeks in both erythrocytes and the liver, which correlates with the onset of liver fibrosis in 12-day-old EPP mice. Furthermore, we demonstrated that early BMT into EPP neonates could totally prevent liver disease as compared with a late-onset treatment in EPP adult mice. These results demonstrate for the first time that a complete hepatic, erythropoietic, and skin photosensitivity correction could be obtained in EPP mice by early BMT into neonates. These data highlighted the potential benefit of BMT in preventing liver disease in EPP patients.

Materials and methods

Mice colonies

B6.SJL-Ptprca Pep3/BoyJ mice (Ly5.1) were obtained from Charles River laboratory and were maintained in the conventional animal facility core of the University Bordeaux 2 under pathogen free conditions. C57BL/6JCrl (Ly5.2) congenic EPP mice ($Fech^{m1Pas}/Fech^{m1Pas}$) were previously described [8]. All procedures were performed in compliance with the local ethical committee of the University Bordeaux 2.

Bone marrow transplantation

BM was harvested from Ly5.1 adult (6–10 weeks old mice) donor mice and bone marrow nucleated cells (BMNC) were separated from RBCs using a Ficoll gradient. Lineage-negative cells (lin neg) were depleted by incubation with a cocktail of rat anti-mouse antibodies against CD5, CD11b, CD45R, Ly-6G (Gr-1), TER119, 7–4, as described by the manufacturer (Mouse Hematopoietic Progenitor Enrichment kit, Stemcell Technologies, Grenoble, France).

For BMT into adult EPP mice, lineage-negative cells ($1.7–5 \times 10^5$ Lin^- cells) were transplanted by retro-orbital injection into adult recipients (8–10 weeks old mice) that were previously irradiated with two splits of 6 Grays, 24 h apart, as described previously [13,15].

For BMT into newborn mice, 1- to 2-day-old Ly5.2 pups were given single (10, 15, 20 mg/kg) or double (2×10 mg/kg, 24 h apart) i.p. injection of busulfan (BU) (Busilvex®, Pierre Fabre, Boulogne, France). BU (6 mg/ml) was diluted in PBS prior to injection and pups were injected with 25–30 μl of the diluted solution. Newborn mice were transplanted 24 h after the last BU injection by intravenous (via temporal vein) injection of 1×10^6 BMNCs ±$4.5–5 \times 10^5$ Lin^- cells (lin neg).

Engraftment and lineage analysis of peripheral blood, BM, spleen, and thymus

Peripheral blood (PB) was collected via retro-orbital puncture in heparinized capillaries. For analysis of hematopoietic engraftment, CD45.1 positive cells from blood and BM were assessed by flow cytometry using standard protocols. Briefly, cells were incubated with antibodies directed against Ly5.1-fluorescein isothiocyanate (FITC), and granulocytes, monocytes, and lymphocytes were gated by forward and side scatter. BM cells were incubated with antibodies against Ly5.1-FITC and either B220-phycoerythrin (PE) or Gr1-PE for BM engraftment analysis of B lymphoid or myeloid cells (granulocytes/monocytes), respectively. The spleen and the thymus were harvested from transplanted mice, and nucleated cells were extracted by dissection and incubated with antibodies directed against Ly5.1-FITC and either B220-PE (spleen) or CD3-PE (thymus) for engraftment analysis of B lymphoid cells and T lymphoid cells in the spleen and thymus, respectively. Flow cytometric analysis was performed using the FACScalibur™ and CellQuest Pro software (Becton Dickinson, San José, CA, USA).

Biochemical parameters, ferrochelatase assay, and porphyrin level

Total serum bilirubin (TBil), serum alkaline phosphatase (ALP), and serum transaminase (aspartate and alanine aminotransferase, ASAT and ALAT) were determined by standard methods using clinical grade instrumentation (Beckman Coulter Olympus, AU5400). FECH activity and PPIX levels in RBCs, plasma, BM, and the liver were measured as described [13,15].

Liver histology

Histological analysis of the liver was carried out on 4-μm paraffin-embedded sections. Hematoxylin–eosin and Sirius Red coloration were used to determine structure and fibrosis, respectively. Liver sections were digitalized using a Mirax Scan (Zeiss) virtual slides imaging system and analyzed by a trained pathologist, who was blind to the origin of the sections, to evaluate lesions following criteria described elsewhere [8]. Briefly, cholestasis was defined by bile duct retention and canaliculi bile ducts proliferation. Intra-hepatic PPIX deposits were identified as macroscopic brown deposits in hepatocytes, bile canaliculi, and Küpffer cells. Chronic hepatitis consisted of fibrosis and inflammatory infiltrates in portal tracts.

Skin photosensitivity assay

Reversal of skin photosensitivity was assayed 5 months after transplantation using an irradiation protocol as previously described [15]. Skin pictures were taken 5 days after irradiation.

Statistical analysis

Data are presented as the mean ± SEM or median as indicated. The non parametric Mann–Whitney test was used for comparison between two groups. The level of significance was set at p less than 0.05.

Results

Liver pathology develops during the first month in EPP mice

We analyzed the time course of liver injury development and the relationship with erythrocyte and hepatic PPIX accumulation in EPP and WT mice at 2, 6, and 12 days, 4 weeks, and 4 months after birth. We found that EPP neonates accumulated PPIX in most erythrocytes, as determined by flow cytometry analysis of fluorescing RBCs (named hereafter fluorocytes), (Fig. 1A) and that the intracellular PPIX content progressively increased during the first month (Fig. 1B). Surprisingly, we observed near normal PPIX values in the liver of 2- or 6- day-old EPP mice. Hepatic PPIX

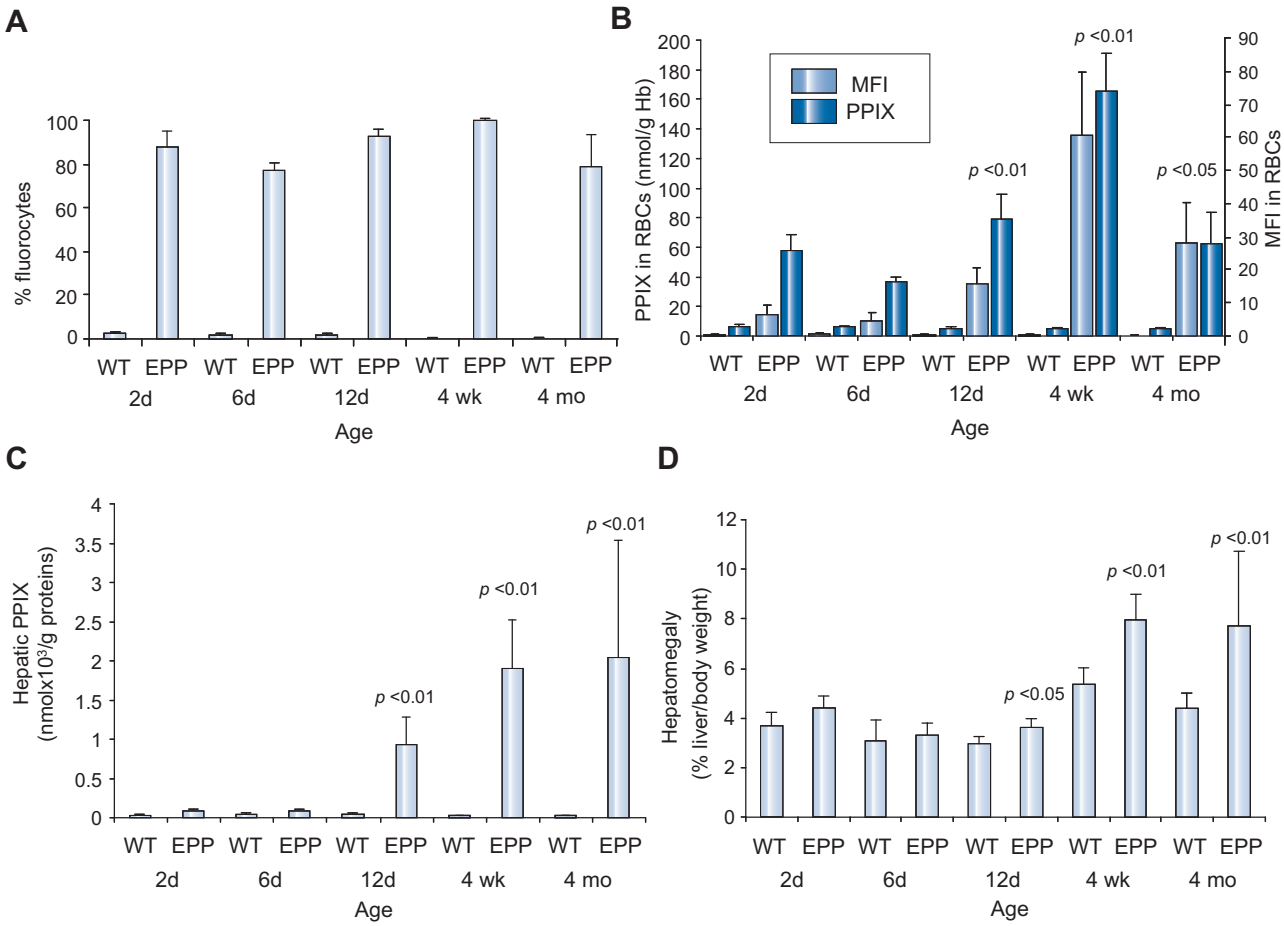


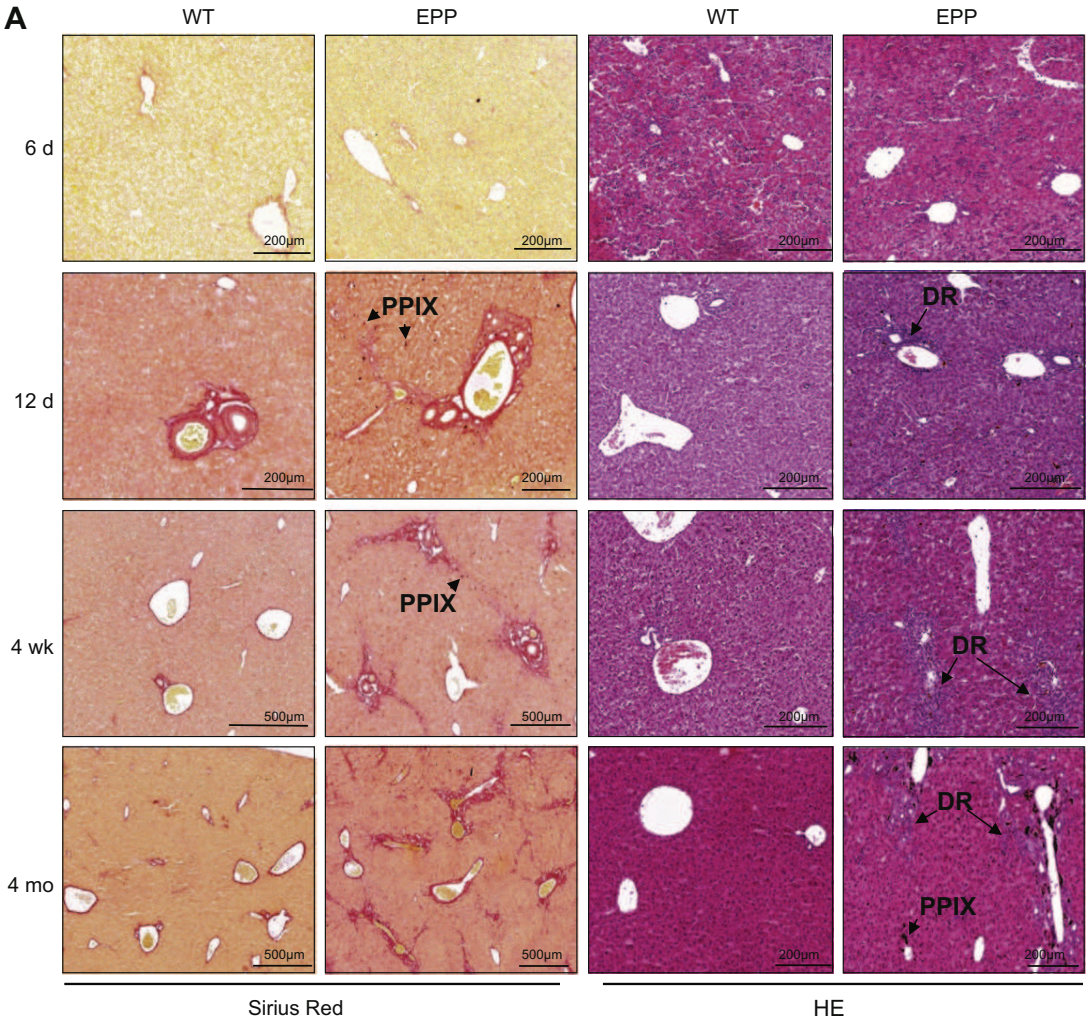
Fig. 1. Time course of PPIX accumulation in RBCs and the liver from 2-, 6-, 12-day, 4-week and 4-month-old mice. (A) Percentage of PPIX containing RBCs in peripheral blood, named fluorocytes. (B) Concentration of PPIX in erythrocytes. Mean fluorescence intensity (MFI) was determined by flow cytometry analysis. (C) Hepatic PPIX concentration. (D) Hepatomegaly. *p* Values vs WT.

accumulation became significant in 12-day-old EPP mice and increased over time (Supplementary Figs. 1C and 2). These results suggested that a significant amount of circulating PPIX could be cleared by the mother until birth. While a significant hepatomegaly was observed in adult EPP mice, no significant differences in liver size were observed until day 12 after birth (Fig. 1D). Structural alteration of the hepatic parenchyma could not be detected in 6-day-old EPP pups as compared with WT (Fig. 2). In 12-day-old EPP mice, Sirius Red staining indicated a moderate periportal fibrosis that, with age, tended to expand within the parenchyma. In 4-month-old EPP mice, a bridging fibrosis with porto-portal septa was present. The cholestasis induced by PPIX retention and precipitation in biliary ducts led to a ductular reaction and proliferation that was detectable in 12-day-old mice (Fig. 2). As observed with fibrosis, the ductular reaction was enforced with age, due to massive and continued PPIX hepatocellular deposition.

In conclusion, we demonstrate that the liver damages developed during the second week of life in EPP mice and correlated with a significant increase of PPIX accumulation in the erythroid compartment as well as deposition in the liver.

Low-dose busulfan conditioning allows long-term engraftment of HSC in newborn mice

Based on these results, we hypothesized that BMT into neonates would prevent PPIX accumulation in both erythroid and hepatic compartments and the subsequent liver damage. However, myeloablative conditioning methods are well described for adult mice but protocols for myelosuppression in newborn mice are not as well-established. In this study, we report an improved BMT assay after direct injection of low-dose busulfan into newborn mice. One to 2-day-old pups, obtained by inter-crossing heterozygote Fech$^{m1Pas/+}$ mice, were conditioned by BU injection (0–25 mg/kg) and transplanted with bone marrow nucleated cells (BMNC) from CD45.1^{+} mice. Six weeks after BMT, hematopoietic engraftment was assessed in the peripheral blood (Fig. 3A). A low hematopoietic engraftment level (<1%) was observed in mice that had received no preconditioning, while the administration of busulfan increased the level of donor chimerism in a dose-dependent manner in both lymphoid and myeloid lineages. A significant acute toxicity was noticed in neonates



B

Lesion type	2-6 d	12 d	4 wk	4 mo
PPIX deposits	0-1	1	3	2
Cholestasis	0	1	1-2	2
Chronic hepatitis	0-1	1	2	3

0, none; 1, mild; 2, moderate; 3 severe; PPIX, protoporphyrin IX

Fig. 2. Histological characterization of liver damage in EPP mice. (A) Representative liver sections from WT and EPP mice sacrificed at 6 days, 12 days, 4 weeks, and 4 months after birth. Sections were stained with hematoxylin/eosin for structural analysis or Sirius Red for fibrosis analysis. DR, ductular reaction, and proliferation; PPIX, protoporphyrin IX deposits. (B) Liver injury was estimated on histological sections and quantified in EPP mice as described in Materials and methods. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

injected with the highest dose (25 mg/kg BU), with up to 50% pups dying during the following 48 h (not shown), while intermediate doses were well tolerated, independently of the mice genotypes. In some injected mice, a minor to moderate growth retardation (8–10% reduction in body mass) was noted 12 weeks after BMT but was not further observed at 20 weeks (not shown).

In order to increase the engraftment level and to evaluate the long-term hematopoietic reconstitution, we injected lineage-negative cells, enriched with hematopoietic stem/progenitor cells (HSPC), into neonates. As expected, the donor chimerism was low in mice receiving no cytoreduction (Fig. 3B and C). The injection of purified HSPC led to homogeneous engraftment in a dose-dependent manner and increased the donor chimerism that remained stable during 21 weeks (Fig. 3D). A high engraftment level was observed in all hematopoietic organs at 21 weeks after BMT, demonstrating the long-term repopulation with HPSC after direct busulfan injection into neonates (Fig. 3E). These results indicate that a preconditioning regimen based on dual BU injection (2×10 mg/kg) is well tolerated by neonates, leading to long-term and efficient engraftment of all hematopoietic lineages.

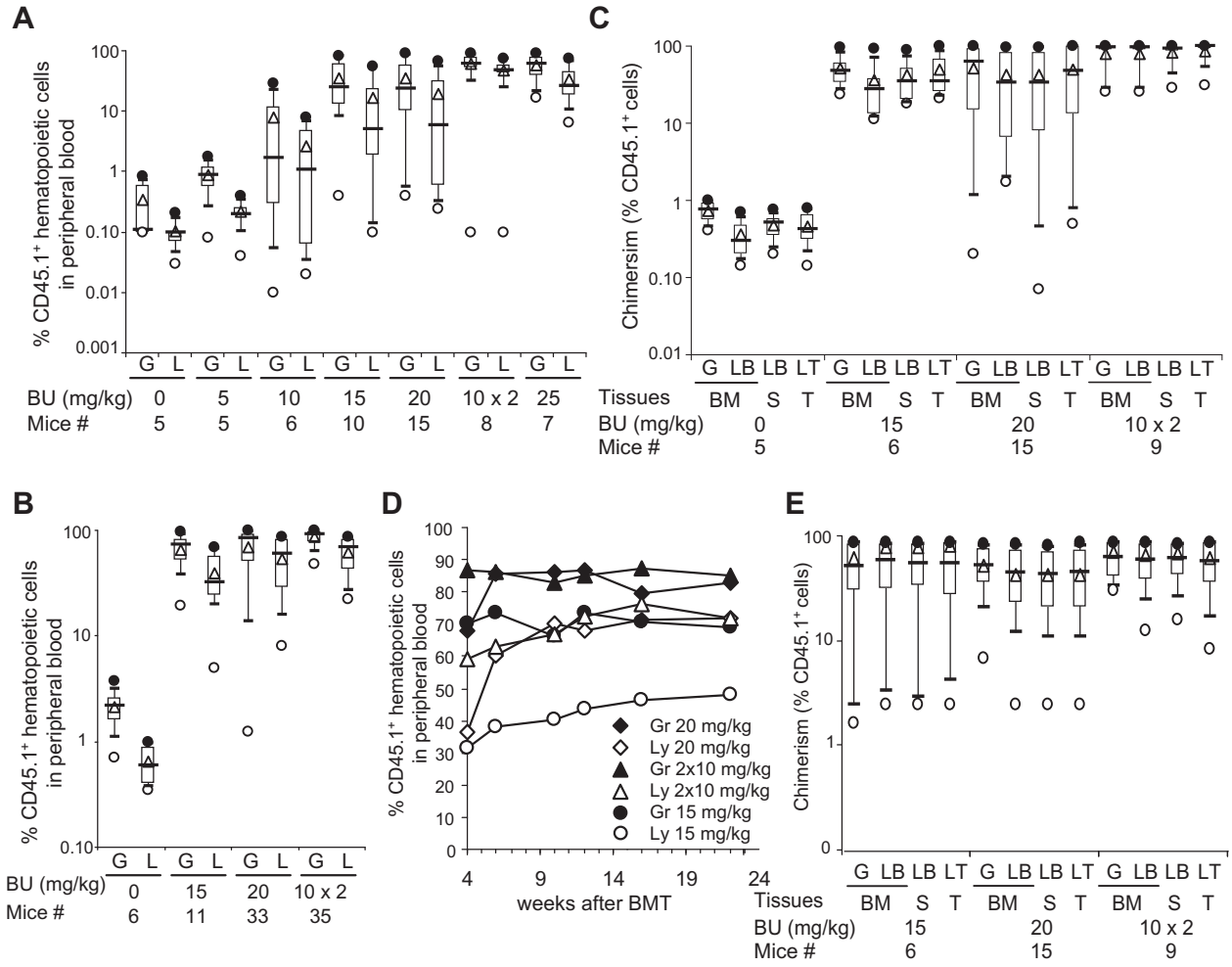


Fig. 3. Long-term and multilineage donor hematopoietic engraftment into newborn mice after direct busulfan-mediated conditioning. (A) Neonates were conditioned with busulfan and transplanted with 1.5×10^6 bone marrow nucleated cells (BMNC). Donor engraftment ($CD45.1^+$ cells) was analyzed in circulating granulocytes (G) and lymphocytes (L) 6 weeks after BMT. (B–E) Neonates were transplanted with 10^6 BMNC + 5×10^5 lineage-negative cells. (B) Donor engraftment ($CD45.1^+$ cells) was analyzed in peripheral blood granulocytes (G) and lymphocytes (L) of recipients, 6 weeks after BMT. (C) Donor engraftment was analyzed in the bone marrow (BM) (myeloid and lymphoid cells), the spleen (B lymphoid cells), and the thymus (T lymphoid cells) of recipients, 6 weeks after BMT. (D) Follow-up of donor hematopoietic engraftment in peripheral blood granulocytes and lymphocytes. (E) Donor engraftment ($CD45.1^+$ cells) was analyzed in peripheral blood granulocytes (G) and lymphocytes (L), the bone marrow (BM) (myeloid and lymphoid cells), the spleen (B lymphoid cells), and the thymus (T lymphoid cells) of recipients, 21 weeks after BMT. Legends for A–E: ○, lowest value; ●, highest value; △, mean; –, median.

Neonatal BMT prevents liver disease in 6-week-old EPP mice

A total of 19 engrafted EPP pups presented a significant donor chimerism at 6 weeks after BMT (Table 1). Nine of them presented less than 80% $CD45.1^+$ peripheral blood cells (range from 0.1 to 45% and 0.05% to 24% $CD45.1^+$ granulocytes and lymphocytes respectively, Table 1) according to the BU dose received (group 3). Ten animals, presenting a high hematopoietic chimerism (range from 82% to 98% and 37% to 67% $CD45.1^+$ into PB granulocytes and lymphocytes respectively, Table 1), were split into two groups sacrificed at 6 weeks (group 4) or 5 months (group 5) after BMT, respectively. Group 3 showed low BM FECH activity, close to that of untransplanted EPP mice, while highly engrafted mice (group 4) presented normal BM FECH activity (Table 1). As expected, a high proportion of fluorocytes was observed in untransplanted 6-week-old EPP mice (group 2) as compared with WT (group 1) (Table 1). The percentage of fluorocytes was slightly reduced in group 3 mice (82.3% versus 90.2% in EPP mice) while a dramatic decrease was obtained in group 4 (10.5%). A similar reduction of PPIX was observed in RBCs and plasma (Table 1). A ten-fold reduction of hepatic PPIX was observed in group 4 mice as compared with group 3 and group 2 untransplanted EPP mice. Interestingly, we did not observe a significant increase of hepatic FECH activity in group 4, demonstrating the major contribution of the erythroid compartment to hepatic PPIX deposits. This metabolic correction of the erythropoietic compartment was associated with an impressive modification of liver structure and hepatic parameters in group 4. EPP mice showed a dark liver (not shown) with marked hepatomegaly (8% liver/body weight vs 5.1% respectively) as compared with normal mice (Table 2). A complete normalization of the liver size was obtained in group 4 mice, while minor engraftment did not

Table 1. Engraftment, metabolic parameters, and skin photosensitivity in cellular therapy groups at sacrifice.

								Protoporphyrin IX level			FECH activity nmoles Mézo-Zn/H/mg prot	
Group	Age at graft	Age at sacrifice	Donor	Recipient (mice #)	Donor chimerism	Skin photo sensitivity	Fluorocytes (%)	RBC (nmoles/g Hb)	Plasma (nM)	Liver (nmoles/g prot)	Bone marrow	Liver
1			none	WT (4)	ND	ND	0.5 ± 0.3	0.5 ± 0.3	89 ± 59	1.3 ± 1	5.5 ± 2.8	12.9 ± 2.7
2			none	EPP (6)	ND	ND	90.2 ± 5	31 ± 12	3662 ± 4259	5238 ± 3500	0.9 ± 0.2	0.42 ± 0.01
							p <0.01 2 vs 1	*p* <0.01 2 vs 1	*p* <0.01 2 vs 1	*p* <0.01 2 vs 1	*p* <0.01 2 vs 1	*p* <0.01 2 vs 1
3	2-3	6 weeks	WT	EPP * (9)	15.5 ± 17	ND	82.3 ± 12	30 ± 11	1630 ± 2882	5060 ± 3535	1.9 ± 1.4	0.38 ± 0.1
	days	after BMT					NS 3 vs 2	NS 3 vs 2	NS 3 vs 2	NS 3 vs 2	*p* <0.05 3 vs 2	NS 3 vs 2
4			WT	EPP # (5)	86.5 ± 6	ND	10.5 ± 6	2.6 ± 1.2	177 ± 54	552 ± 412	7.2 ± 1.1	1.1 ± 0.7
							p <0.01 4 vs 2	*p* <0.01 4 vs 2	*p* <0.01 4 vs 2	*p* <0.01 4 vs 2	*p* <0.01 4 vs 2	NS 4 vs 2
5		5 months	WT	EPP # (5)	92 ± 9	N / M	4.9 ± 5	1.2 ± 0.9	52 ± 16	1385 ± 792	3.4 ± 0.7	0.7 ± 0.2
		after BMT					*p* <0.01 5 vs 7	*p* <0.01 5 vs 7	*p* <0.01 5 vs 7	*p* <0.01 5 vs 7	*p* <0.01 5 vs 7	NS 5 vs 7
6			none	WT (9)	ND	N	0.7 ± 0.5	0.3 ± 0.2	19 ± 13	2.4 ± 1.2	3.4 ± 0.4	12.2 ± 1.2
7			none	EPP (9)	ND	P / S	84.5 ± 18	43 ± 36	1462 ± 1380	3939 ± 3675	0.46 ± 0.1	0.42 ± 0.2
							p <0.01 7 vs 6	*p* <0.01 7 vs 6	*p* <0.01 7 vs 6	*p* <0.01 7 vs 6	*p* <0.01 7 vs 6	*p* <0.01 7 vs 6
8	6-8	4 months	WT	WT (6)	95 ± 8	ND	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.2	9 ± 9	0.8 ± 0.2	3.5 ± 0.4	9.4 ± 1.1
	weeks	after BMT					NS 8 vs 6	NS 8 vs 6	NS 8 vs 6	NS 8 vs 6	NS 8 vs 6	NS 8 vs 6
9			WT	EPP (5)	94 ± 9	ND	8.4 ± 5.6	3.2 ± 2	64 ± 17	1888 ± 1087	4.2 ± 0.3	0.6 ± 0.1
							p <0.01 9 vs 7	*p* <0.01 9 vs 7	*p* <0.01 9 vs 7	NS 9 vs 7	*p* <0.01 9 vs 7	NS 9 vs 7

N, negative; M, mild; P, positive; S, severe. Donor chimerism (% $CD45.1^+/Gr1^+$ bone marrow cells), #chimerism <80%; ND, not determined; NS, not significant. *p* Value refers to group mouse numbers.

prevent hepatomegaly (Table 2). The severity of hepatic damage was evaluated on histological sections and quantified as described in Materials and methods. In 6-week-old EPP mice, a massive portal fibrosis and biliary duct proliferation indicated severe cholestasis and hepatitis. Poorly engrafted EPP mice (group 3) presented severe and diffuse liver fibrosis, whereas highly engrafted EPP mice (group 4) showed near absent or mild periportal fibrosis, without cholestatis-induced ductular reaction (Fig. 4). The concentration of plasmatic enzymes, reflecting hepatocyte (ALAT and ASAT) or biliary duct cell damages and cholestasis (bilirubin and ALP), was elevated in EPP mice despite inter-individual heterogeneity (Table 2). Normal values of these biochemical hepatic parameters were observed in fully engrafted mice (group 4), while a slight improvement was observed in group 3 mice (Table 2). We analyzed the relationship between donor chimerism, fluorocyte accumulation, and hepatomegaly in EPP mice transplanted at neonatal stages. As previously described for skin photosensitivity correction following BMT in

Table 2. Hepatic parameters in cellular therapy groups at sacrifice.

										Lesions Type [&]		
Group	Age at graft	Age at sacrifice	Donor	Recipient (mice #)	Liver/Body weight (%)	Total Bilirubin (μmole/L)	ASAT (UI/L)	ALAT (UI/L)	ALP (UI/L)	PPIX deposits	Cholestasis	Chronic hepatitis
1			none	WT (4)	5.1 ± 0.8	4 ± 0.1	291 ± 157	117 ± 77	123 ± 57	0	0	0
2			none	EPP (6)	8 ± 0.7	45 ± 70	1300 ± 1022	999 ± 604	309 ± 269	3	2	2
					p <0.01 2 vs 1	*p* <0.01 2 vs 1	*p* <0.01 2 vs 1	*p* <0.01 2 vs 1	*p* <0.01 2 vs 1			
3	2-3	6 weeks	WT	EPP * (9)	7.7 ± 1.5	22 ± 47	924 ± 1440	645 ± 806	170 ± 80	3	2	2
	days	after BMT			NS 3 vs 2	NS 3 vs 2	NS 3 vs 2	NS 3 vs 2	NS 3 vs 2			
4			WT	EPP # (5)	5 ± 0.8	3.5 ± 1	206 ± 92	114 ± 68	92 ± 10	1	0	1
					p <0.01 4 vs 2	*p* <0.01 4 vs 2	*p* <0.01 4 vs 2	*p* <0.01 4 vs 2	*p* <0.01 4 vs 2			
5		5 months	WT	EPP # (5)	6 ± 0.1	3 ± 1	105 ± 41	40 ± 12	32 ± 9	1	0-1	1
		after BMT			*p* <0.05 5 vs 7	*p* <0.01 5 vs 7	*p* <0.05 5 vs 7	*p* <0.01 5 vs 7	*p* <0.05 5 vs 7			
6			none	WT (9)	4.2 ± 0.8	2 ± 0.5	96 ± 35	43 ± 18	20 ± 10	0	0	0
7			none	EPP (9)	8.2 ± 4	10 ± 7	335 ± 140	284 ± 234	87 ± 40	2	2	3
					p <0.01 7 vs 6	*p* <0.01 7 vs 6	*p* <0.01 7 vs 6	*p* <0.01 7 vs 6	*p* <0.01 7 vs 6			
8	6-8	4 months	WT	WT (6)	4.6 ± 0.4	1.5 ± 0.5	98 ± 48	37 ± 26	28 ± 12	0	0	0
	weeks	after BMT			NS 8 vs 7	NS 8 vs 7	NS 8 vs 7	NS 8 vs 7	NS 8 vs 7			
9			WT	EPP (5)	5.1 ± 1	1.3 ± 0.5	114 ± 47	42 ± 17	35 ± 8	2	0-1	2-3
					p <0.01 9 vs 7	*p* <0.01 9 vs 7	*p* <0.01 9 vs 7	*p* <0.01 9 vs 7	*p* <0.01 9 vs 7			

#Chimerism >80%; *chimerism <80%; [&]histological liver damage: 0, none; 1, mild; 2, moderate; 3, severe. *p* Value referred to group mice number.

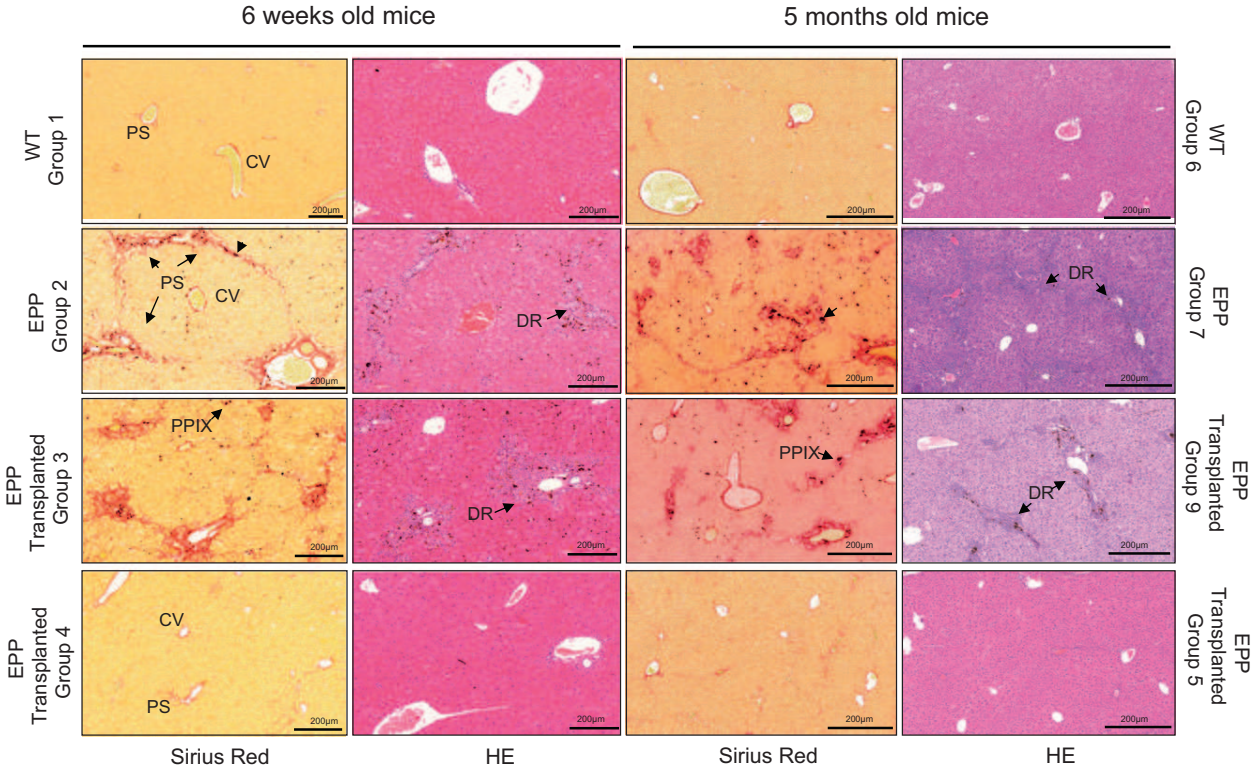


Fig. 4. Long-term correction of liver damage by BMT in EPP neonates. Histological sections of the liver were analyzed in 6 week- or 5 month-old mice. Arrows show protoporphyrin IX (PPIX) deposits in the hepatic parenchyma, macrophages, and bile ducts. CV, centro-lobular vein; PS, periportal space; DR, ductular reaction with proliferation of biliary ducts. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

adult EPP mice, a high hematopoietic chimerism is required to achieve full hepatic correction after neonatal BMT (not shown).

Long-term metabolic and complete phenotypic correction of EPP mice after neonatal BMT

Previously described gene and cellular therapy experiments were performed in adult EPP mice with BalbC/J genetic background and reported moderate or near absent liver disease correction [15–19]. We performed a BMT assay with normal CD45.1^{+} HSC in adult C57BL/6J EPP mice to evaluate a potential reversion of liver disease. Four months after transplantation, engrafted WT (group 8) and EPP (group 9) mice presented a high hematopoietic chimerism in peripheral blood (Table 1). Transplanted WT mice presented metabolic and biochemical values similar to untransplanted WT mice, indicating that the irradiation procedure had no incidence on the experiments (Tables 1 and 2). We observed that FECH activity was restored in transplanted EPP mice, correlating with a dramatic decrease of PPIX accumulation in RBCs as compared with untransplanted EPP mice (Table 1). As expected, a

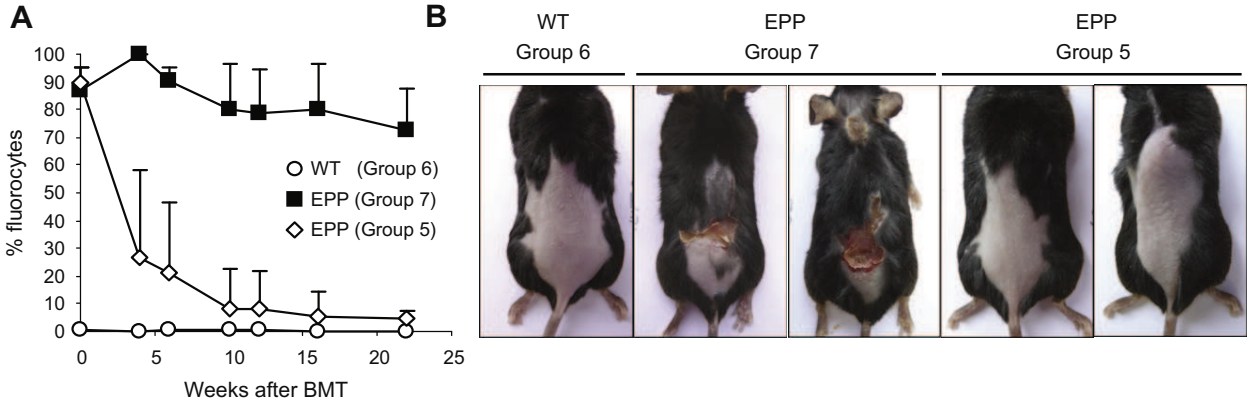


Fig. 5. Long-term metabolic correction prevents skin photosensitivity in transplanted EPP neonates. (A) PPIX accumulation in RBCs in normal, EPP, and transplanted EPP mice (group 4). (B) Skin photosensitivity assay was performed 21 weeks after BMT.

profound FECH enzymatic activity deficiency was observed in the liver of both transplanted and untransplanted EPP mice (Table 1). Surprisingly, the liver function was greatly improved in transplanted adult EPP mice, as indicated by a strong reduction of the hepatomegaly and a normalization of the biochemical liver functions (Table 2). However, the examination of histological liver sections showed the persistence of periportal fibrosis with PPIX deposits indicating that liver hepatitis was only partially reverted in adult mice (Fig. 4). To study if both the hepatic and erythroid metabolic corrections could be maintained over time in transplanted EPP neonates, group 5 (conditioning with 2×10 mg/kg BU) was sacrificed 5 months after BMT. We observed a high hematopoietic chimerism associated with a strong decrease of PPIX accumulation in RBCs which was maintained for 5 months after BMT (Fig. 5A and Table 1). As compared with untransplanted EPP mice, these mice presented a 26 and 70 fold reduction of PPIX in erythrocytes and plasma, respectively, while hepatic PPIX was moderately reduced (Table 1). We then investigated whether the decrease of circulating PPIX was sufficient to reverse skin photosensitivity (Fig. 5B). Normal C57BL/6J mice showed no evidence of burns or lesions on the exposed skin surface whereas untransplanted EPP mice showed severe skin photosensitivity. As expected, transplanted EPP mice (group 5) showed no signs of photosensitivity on dorsal skin. In transplanted EPP mice (group 5), we observed a dramatic reduction of both hepatomegaly and liver damage (Table 2). Histological sections' analyses showed a massive reduction of periportal fibrosis as well as ductular reaction in group 5 (Fig. 4). These results confirmed the long-term prevention of chronic hepatitis and cholestasis by early-stage BMT into EPP neonates.

Discussion

EPP is characterized by a wide variation in the severity of liver disease and a genotype–phenotype correlation related to liver disease is unclear in humans. A significant association between the possession of null-allele mutations that cause major structural alterations in the FECH enzyme and subsequent accumulation of high levels of PPIX in the blood and related liver disease was described (reviewed in [3]). There is currently no way to identify patients at risk, and no intervention is known to be uniformly effective in restoring normal liver function once hepatic failure ensues. It remains unclear what effect PPIX has on hepatocytes *in vivo* and how this relates to the development of liver disease. Until recently, there was uncertainty about whether EPP is a strictly erythropoietic porphyria and about the role of the hepatic contribution to the excess PPIX in some individuals. However, a new dominant EPP called X-linked erythropoietic porphyria was described, which resulted from increased activity of ALAS2 in the erythroid progeny and led to the production of excess PPIX by erythroid cells [18]. These patients accumulated sufficient amount of PPIX to cause photosensitivity and 17% of them had overt liver disease despite a normal FECH activity in the BM and the liver. These results strongly suggest the predominant role of the erythron as the main source of PPIX accumulation, responsible for liver damage. Liver transplantation is an effective therapy for liver failure, but persistence of the metabolic defect in the native bone marrow leads, in most cases, to the recurrence of liver injury caused by EPP in the graft. Although there is actually no definitive treatment to cure EPP in humans, an optimal therapy would correct the defect in heme biosynthesis and eliminate the photosensitivity before the development of significant liver injury. BMT constitutes a potential therapeutic option to reduce erythroid PPIX accumulation, especially for patients with high risk for liver failure [11,12]. However, the usefulness of BMT, to prevent liver disease occurrence before hepatic damages become detectable, was never demonstrated.

In adult EPP mice, BMT or HSC-gene therapy was successfully used to reverse the skin photosensitivity but failed to totally reverse the liver disease in EPP mice with BALB/CJ genetic background [13–17]. One possible explanation is that BMT is performed to a latter stage regarding the advanced liver fibrosis, in 6- to 8 week-old EPP mice. Fontanellas et al. demonstrated a partial reversion of hepatobiliary alterations by BMT in young adult EPP mice [13]. Using a similar approach, Garcian-Bravo et al. demonstrated that, after BMT, the liver function improved with time, suggesting a progressive contribution of bone marrow cells to liver repair and regeneration [17]. Surprisingly, we found a significant improvement of biochemical hepatic parameters without reversion of hepatic fibrosis after BMT in adult EPP mice with a C57BL/6 genetic background. These results can be explained by the differences in liver injury which were observed among EPP mice of different genetic background [8]. The more severe cholestasis in BALB/CJ as compared to C57BL/6 mice led to an increased acute toxicity of PPIX in hepatocytes.

We can hypothesize that the dramatic reduction of circulating PPIX, associated with a moderate cholestasis in C57BL/6 EPP mice, participated to the correction of the hepatocyte damage. However, it is important to note that hepatic fibrosis was not improved by BMT, confirming its irreversibility in adult EPP mice.

We showed that newborn EPP mice accumulate high PPIX levels in erythrocytes but not in the liver. We observed a significant increase of erythrocyte PPIX content after birth, leading to progressive hepatic PPIX deposits during the second week. These metabolic modifications are associated with the progressive development of liver injury in EPP mice. These data suggest that the first week of life could constitute an interesting therapeutic window to perform BMT, before liver dysfunction becomes detectable. While BMT preparative regimens are well described for adult mice, very few studies describe efficient hematopoietic engraftment assays in newborn mice [19,20]. Total body irradiation (TBI) is a standard procedure for myelosuppression in adult mice, but is toxic and leads to increase in morbidity and mortality as well as disruption of normal tissue development when administrated to newborn mice, even at sublethal doses. Busulfan is an alkylating agent that affects mainly HSC and is widely used in myeloablative conditioning regimens for BMT. The few published papers exploited the pioneering study of Yoder et al. which describes the effect of *in utero* busulfan exposure and/or TBI of day 1 newborn on BM engraftment [19]. In order to improve this protocol and prevent BU injection into pregnant female mice, we developed a new myeloablative assay based on direct injection of low doses BU directly into newborn mice. We showed that a twice injection of 10 mg/kg BU allows efficient and long-term hematopoietic engraftment. Six weeks after BMT into newborn EPP mice, we observed near complete normal values of hepatic biochemical parameters as compared with severely affected control EPP mice. Furthermore, histological analysis confirmed

the absence of liver fibrosis and cholestasis after transplantation. Interestingly, we determined that 60% of donor hematopoietic engraftment constituted a threshold to get liver benefits, as previously demonstrated for skin photosensitivity [15,16]. Highly engrafted EPP neonates were maintained for 5 months in order to evaluate the long-term efficiency of the therapeutic procedure on both skin photosensitivity and liver disease. A full donor myeloid chimerism was maintained during 5 months in transplanted EPP neonates, allowing the normalization of circulating PPIX and the correction of the skin photosensitivity. As observed in 6-week-old mice, a dramatic improvement of the liver function was observed 5 months after BMT, confirming the full long-term metabolic and phenotypic corrections.

In view of the relatively benign nature of uncomplicated EPP in humans, the use of HSCT would be related to liver disease. It is actually difficult to identify EPP patients at risk for severe liver disease. However, progressive fibrosis might be detected in time but better prognostic markers are needed to identify these patients early. Furthermore, the field would benefit from the identification of genetic markers that are potentially involved in hepatic injury in EPP patients, as suggested for EPP mice [8].

In conclusion, we demonstrate, for the first time, that hepatic injury develops during the first 2 weeks in EPP mice. Furthermore, we show that, in the EPP mouse, BMT can fully protect from hepatic damages when performed at an early stage, before hepatic involvement. These results highlight the importance of the use of BMT or autologous HSC-gene therapy for EPP, especially to prevent liver disease.

Conflict of interest

The authors who have taken part in this study declared that they do not have anything to disclose regarding funding or conflict of interest with respect to this manuscript.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Association Française contre les Myopathies (AFM) and from the Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM). We thank Dr. François Frenois from the virtual slides and histology platform of the University of Bordeaux 2 and the Cancéropole Grand Sud Ouest (GSO) for technical assistance with liver histology.

References

[1] Anderson KE, Sassa S, Bishop DF, Desnick RJ. Disorders of heme biosynthesis: X-linked sideroblastic anemia and the porphyrias. In: Scriver BA, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. The metabolic basis of inherited diseases. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 2991–3062.

[2] Holme SA, Worwood M, Anstey AV, Elder GH, Badminton MN. Erythropoiesis and iron metabolism in dominant erythropoietic protoporphyria. Blood. 2007;110:4108–4110.

[3] Anstey AV, Hift RJ. Liver disease in erythropoietic protoporphyria: insights and implications for management. Gut 2007;56:1009–1018.

[4] McGuire BM, Bonkovsky HL, Carithers Jr RL, Chung RT, Goldstein LI, Lake JR, et al. Liver transplantation for erythropoietic protoporphyria liver disease. Liver transpl 2005;11:1590–1596.

[5] Tutois S, Montagutelli X, Da Silva V, Jouault H, Rouyer-Fessard P, Leroy-Viard K, et al. Erythropoietic protoporphyria in the house mouse. A recessive inherited ferrochelatase deficiency with anemia, photosensitivity, and liver disease. J Clin Invest 1991;88:1730–1736.

[6] Meerman L, Koopen NR, Bloks V, Van Goor H, Havinga R, Wolthers BG, et al. Biliary fibrosis associated with altered bile composition in a mouse model of erythropoietic protoporphyria. Gastroenterology 1999;117:696–705.

[7] Libbrecht L, Meerman L, Kuipers F, Roskams T, Desmet V, Jansen P. Liver pathology and hepatocarcinogenesis in a long-term mouse model of erythropoietic protoporphyria. J Pathol 2003;199:191–200.

[8] Abitbol M, Bernex F, Puy H, Jouault H, Deybach JC, Guénet JL, et al. A mouse model provides evidence that genetic background modulates anemia and liver injury in erythropoietic protoporphyria. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2005;288:G1208–G1216.

[9] Wahlin S, Harper P. The role for BMT in erythropoietic protoporphyria. Bone Marrow Transplant 2010;45:393–394.

[10] 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 2008;8:176–186.

[11] Wahlin S, Aschan J, Björnstedt M, Broomé U, Harper P. Curative bone marrow transplantation in erythropoietic protoporphyria after reversal of severe cholestasis. J Hepatol 2007;46:174–179.

[12] Rand EB, Bunin N, Cochran W, Ruchelli E, Olthoff KM, Bloomer JR. Sequential liver and bone marrow transplantation for treatment of erythropoietic protoporphyria. Pediatrics 2006;118:1896–1899.

[13] Fontanellas A, Mazurier F, Landry M, Taine L, Morel C, Larou M, et al. Reversion of hepatobiliary alterations By bone marrow transplantation in a murine model of erythropoietic protoporphyria. Hepatology 2000;32:73–81.

[14] Pawliuk R, Bachelot T, Wise RJ, Mathews-Roth MM, Leboulch P. Long-term cure of the photosensitivity of murine erythropoietic protoporphyria by preselective gene therapy. Nat Med 1999;5:768–773.

[15] Richard E, Mendez M, Mazurier F, Morel C, Costet P, Xia P, et al. Gene therapy of a mouse model of protoporphyria with a self-inactivating erythroid-specific lentiviral vector without preselection. Mol Ther 2001;4:331–338.

[16] Pawliuk R, Tighe R, Wise RJ, Mathews-Roth MM, Leboulch P. Prevention of murine erythropoietic protoporphyria-associated skin photosensitivity and liver disease by dermal and hepatic ferrochelatase. J Invest Dermatol 2005;124:256–262.

[17] García-Bravo M, Morán-Jiménez MJ, Quintana-Bustamante O, Méndez M, Gutiérrez-Vera I, Bueren J, et al. Bone marrow-derived cells promote liver regeneration in mice with erythropoietic protoporphyria. Transplantation 2009;88:1332–1340.

[18] Whatley SD, Ducamp S, Gouya L, Grandchamp B, Beaumont C, Badminton MN, et al. 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 2008;83:408–414.

[19] Yoder MC, Cumming JG, Hiatt K, Mukherjee P, Williams DA. A novel method of myeloablation to enhance engraftment of adult bone marrow cells in newborn mice. Biol Blood Marrow Transplant 1996;2:59–67.

[20] Askmyr M, Holmberg J, Flores C, Ehinger M, Hjalt T, Richter J. Low-dose busulphan conditioning and neonatal stem cell transplantation preserves vision and restores hematopoiesis in severe murine osteopetrosis. Exp Hematol 2009;2:302–308.

Résultats 2 :

Article 2

Metabolic Correction of Congenital Erythropoietic Porphyria with iPSCs Free of Reprogramming Factors

Bedel, A., Taillepierre, M., Guyonnet-Duperat, V., Lippert, E., Dubus, P., Dabernat, S., Mautuit, T., Cardinaud, B., Pain, C., Rousseau, B., Magalie Lalanne, Ged, C., Duchartre, Y., Richard, E., de Verneuil, H., and Moreau-Gaudry, F. (2012). Metabolic correction of congenital erythropoietic porphyria with iPSCs free of reprogramming factors. American journal of human genetics *91*, 109-121.

Résultats 2 et 3 :

Thérapie génique des porphyries érythropoïétiques à l'aide de cellules iPS

La porphyrie érythropoïétique congénitale (PEC) se caractérise par un défaut de l'activité de l'uroporphyrinogène III synthase entraînant une photosensibilité cutanée et une anémie hémolytique importantes. Le seul traitement curatif de la PEC et de la PPE est la transplantation de moelle osseuse d'un donneur HLA-compatible.

Bien que ce traitement soit efficace, il est risqué (4 décès dans le cas de la PEC et 1 dans le cas de la PPE) et les patients souffrent du manque de donneurs de moelle osseuse compatibles. La greffe de cellules souches hématopoïétiques autologues corrigées est une alternative à la transplantation de moelle osseuse. Depuis plusieurs années, les travaux du laboratoire se concentrent sur la réalisation d'une thérapie génique des porphyries érythropoïétiques. Dernièrement, la correction d'un modèle de souris (porteur de la mutation P248Q ayant été introduite par recombinaison homologue) a été réalisée marquant une étape supplémentaire vers la thérapie génique de cette porphyrie (Robert-Richard *et al*. 2008).
Cependant, deux principaux inconvénients freinent ce protocole : le faible nombre de cellules souches hématopoïétiques à disposition pour la correction génique et l'insertion aléatoire du transgène pouvant entraîner une oncogenèse insertionnelle (Hacein-Bey-Abina *et al*. 2003).

Le deuxième projet de ma thèse a consisté à essayer de résoudre ces problèmes en évaluant la faisabilité d'un protocole de thérapie génique des porphyries érythropoïétiques à l'aide de cellules iPS. En 2006, Takahashi et Yamanaka génèrent des cellules pluripotentes à partir de cellules différenciées murines puis humaines en exprimant quatre facteurs de transcription (Takahashi et Yamanaka, 2006 et Takahashi et Yamanaka, 2007). Ces cellules ont les mêmes propriétés que des cellules ES (autorenouvellement et pluripotence) et sont donc particulièrement intéressantes dans le cadre d'une thérapie génique. En effet, il est possible de générer des lignées iPS à partir de cellules de patients. Ces lignées et les cellules différenciées en découlant seront donc compatibles avec le patient. Leur capacité d'autorenouvellement lève l'inconvénient du faible nombre de cellules corrigées à greffer. Surtout, il est possible d'effectuer une approche clonale des populations de cellules iPS corrigées permettant ainsi d'analyser les sites d'insertion du vecteur thérapeutique par LAM-PCR ou séquençage et de sélectionner les clones présentant une insertion sûre.

Nous avons travaillé sur un modèle de cellules humaines de patients PEC et sur deux modèles murins (PEC et PPE). Des kératinocytes (humains PEC) ou des fibroblastes (murins PEC et PPE) ont été transduits avec un vecteur thérapeutique. Ces cellules ont ensuite été reprogrammées en cellules iPS par l'action de facteurs de transcription ectopiques (OCT4, SOX2, KLF4 pour les cellules murines et ces 3 transgènes ajoutés à un deuxième vecteur exprimant c-MYC et un ARN interférent permettant d'inhiber l'expression de p53). Ces transgènes sont flanqués par des séquences LoxP permettant leur excision lors de l'expression de la CRE recombinase. La pluripotence des lignées obtenues a été caractérisée par l'étude de marqueurs de pluripotence par RT-PCR et immunomarquages ainsi que des expériences de différenciation *in vitro* par la formation de corps embryoïdes et *in vivo* par celle de tératomes. Les vecteurs de reprogrammation ont été correctement excisés lors de l'expression transitoire de la CRE recombinase. L'étude visant à déterminer le site d'intégration du vecteur thérapeutique s'est faite par LAM-PCR permettant ainsi de sélectionner les clones les plus sécuritaires. Les cellules iPS humaines ont par la suite été différenciées en progéniteurs hématopoïétiques afin d'apprécier la correction génique dans ces cellules. Le vecteur thérapeutique contenant un promoteur érythroïde-spécifique, l'augmentation de l'activité enzymatique de l'UROS a pu être observée une fois la différenciation érythroïde acquise (Article 2**)**.

Dans le cas des cellules iPS murines, des lignées pluripotentes des deux modèles murins de porphyries ont été générées. Leur pluripotence a également été caractérisée par RT-PCR, immunomarquages, formation de corps embryoïdes et de tératomes. La différenciation hématopoïétique n'a, pour le moment, pas pu être finalisée (Résultats 3).

Metabolic Correction of Congenital Erythropoietic Porphyria with iPSCs Free of Reprogramming Factors

Aurélie Bedel,[1,2] Miguel Taillepierre,[1,2] Véronique Guyonnet-Duperat,[2,3] Eric Lippert,[1,2] Pierre Dubus,[2,4] Sandrine Dabernat,[1,2] Thibaud Mautuit,[1,2] Bruno Cardinaud,[1,2] Catherine Pain,[1,2] Benoît Rousseau,[2,5] Magalie Lalanne,[1,2] Cécile Ged,[1,2] Yann Duchartre,[1,2] Emmanuel Richard,[1,2] Hubert de Verneuil,[1,2] and François Moreau-Gaudry[1,2,3,*]

Congenital erythropoietic porphyria (CEP) is due to a deficiency in the enzymatic activity of uroporphyrinogen III synthase (UROS); such a deficiency leads to porphyrin accumulation and results in skin lesions and hemolytic anemia. CEP is a candidate for retrolentivirus-mediated gene therapy, but recent reports of insertional leukemogenesis underscore the need for safer methods. The discovery of induced pluripotent stem cells (iPSCs) has opened up new horizons in gene therapy because it might overcome the difficulty of obtaining sufficient amounts of autologous hematopoietic stem cells for transplantation and the risk of genotoxicity. In this study, we isolated keratinocytes from a CEP-affected individual and generated iPSCs with two excisable lentiviral vectors. Gene correction of CEP-derived iPSCs was obtained by lentiviral transduction of a therapeutic vector containing *UROS* cDNA under the control of an erythroid-specific promoter shielded by insulators. One iPSC clone, free of reprogramming genes, was obtained with a single proviral integration of the therapeutic vector in a genomic safe region. Metabolic correction of erythroblasts derived from iPSC clones was demonstrated by the disappearance of fluorocytes. This study reports the feasibility of porphyria gene therapy with the use of iPSCs.

Introduction

Congenital erythropoietic porphyria (CEP [MIM 263700]) is an autosomal-recessive disorder characterized by a profound deficiency in the enzymatic activity of uroporphyrinogen III synthase (UROS; EC 4.2.1.75), the fourth enzyme of the heme biosynthetic pathway.[1,2] The enzymatic defect causes the accumulation of the nonphysiological porphyrin isomer uroporphyrin I. The lack of UROS causes mutilating dermatological lesions resulting from the release of photocatalytic porphyrins and transfusion-dependent hemolytic anemia with massive secondary hypersplenism. The clinical severity of the disease and the lack of specific treatment—apart from when bone marrow (BM) transplantation with a histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-compatible donor is available[3–8]—are strong arguments for gene therapy.[2] We, as well as others,[9–11] have generated an animal model of CEP in order to study the pathophysiology of the disease and to evaluate the feasibility of stem cell and gene therapy for this disease. Lentivirus-mediated transfer of the human therapeutic *UROS* cDNA into hematopoietic stem cells (HSCs) from homozygous *Uros*$^{c.744C>A/c.744C>A}$-knockin mice (p.Pro248Gln) (the *Uros* RefSeq accession number is NM_009479.2) resulted in the complete and long-term enzymatic, metabolic, and phenotypic correction of the disease. This correction is favored by the survival advantage of corrected red blood cells.[12] This data supports the proof of concept of a successful gene therapy for this disease by transplantation of genetically modified HSCs. Gene-transfer technologies have now been successfully used in clinical gene-therapy applications for many genetic diseases,[13–19] but recent reports of proviral insertional leukemogenesis underscore the need for safer methods.[20]

The discovery of key transcription factors enabling reprogramming of a somatic cell into a pluripotent stem cell, called an induced pluripotent stem cell (iPSC), has provoked an exciting rebound in gene-therapy research.[21–24] Gene-therapy model systems based on iPSCs have been created for a wide range of hereditary hematologic disorders, such as Fanconi anemia (MIM 227650),[25] sickle-cell anemia (MIM 141900),[26] thalassemia (MIM 613985),[27] and hemophilia B (MIM 306900).[28] Because iPSCs can be maintained indefinitely in vitro, they represent an unlimited source of cells, and this surmounts the difficulty of obtaining sufficient amounts of autologous HSCs for transplantation. Moreover, the clonal approach allowed by iPSCs could overcome the risk of insertional oncogenesis by the characterization of proviral integration sites (ISs) of the therapeutic vectors and the selection of iPSC clones with ISs in a genomic safe harbor (GSH).[27,29]

The main goal of this project was to evaluate whether iPSCs might provide a key cell resource for gene therapy in a CEP model. To achieve this goal, we derived human iPSCs with epidermal keratinocytes taken from a CEP-affected individual by using excisable lentiviral vectors. Excised iPSC clones, free of reprogramming factors, were corrected (gene additive therapy). All ISs were found in nononcogenic genes, and one IS was found without cancer-related genes nearby. Then, they were differentiated

[1]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1035, Biothérapies des Maladies Génétiques et Cancers, Laboratoire d'Excellence du Globule Rouge, F-33000 Bordeaux, France; [2]Université Bordeaux Segalen, F-33000 Bordeaux, France; [3]Vectorology Platform, Structure Fédérative de Recherche Transbiomed, Université Bordeaux Segalen, F-33000 Bordeaux, France; [4]Equipe d'Accueil 2406, Université Bordeaux Segalen, F-33000 Bordeaux, France; [5]Animalerie A2, Université Bordeaux Segalen, F-33000 France
*Correspondence: fgaudry@u-bordeaux2.fr
http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.05.026. ©2012 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved.

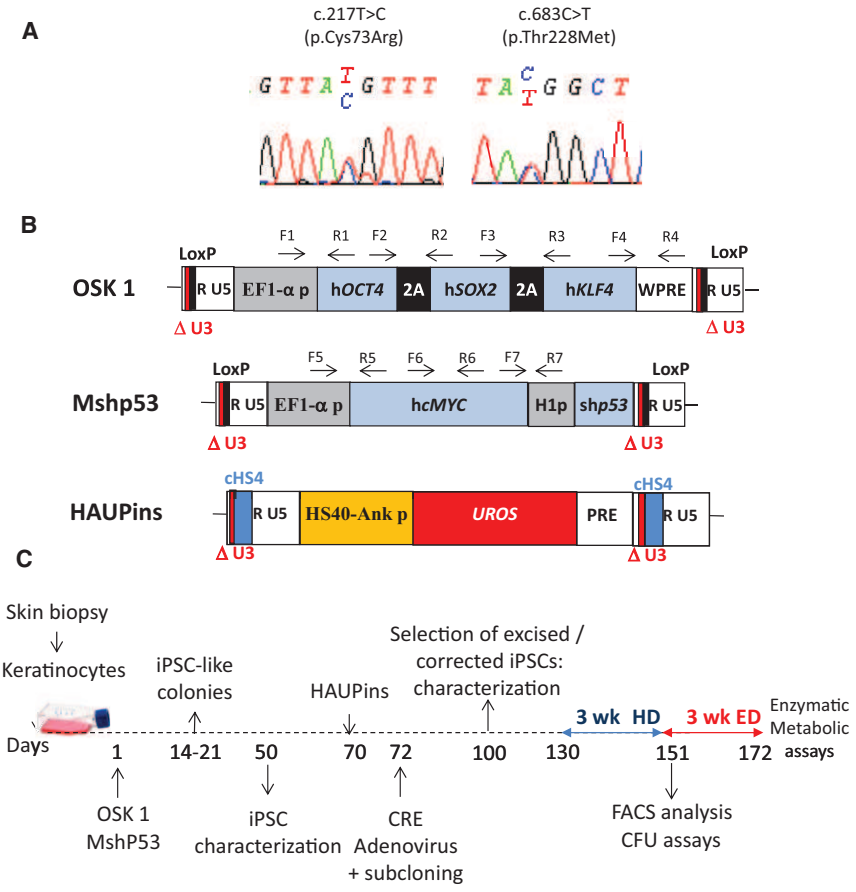


Figure 1. CEP Characterization and Schematic Drawing of iPSC Generation

(A) Genotyping of keratinocytes from a CEP-affected individual compound heterozygous for *UROS* mutations c.217T>C (p.Cys73Arg) and c.683C>T (p.Thr228Met).

(B) Schematic representation of the proviral form of the lentivectors used. OSK 1 is an excisable single polycistronic vector coexpressing *OCT4*, *SOX2*, and *KLF4* cDNAs linked with the porcine teschovirus-1 2A sequence. Mshp53 coexpresses *MYC* and a shRNA against *TP53*; both vectors are flanked by loxP sites. HAUPins contains the *UROS* cDNA under the control of the erythroid chimeric *HS-40 enhancer/ankyrin* promoter. Arrows show the position of forward (F) and reverse (R) primers used for proviral integration analyses. The following abbreviations are used: HS40, enhancer of *HBA1* (MIM 141800); Ank p, *ankyrin* promoter of *ANKYRIN-1* (MIM 612641); *UROS*, cDNA of uroporphyrinogene III synthase; H1p, mammalian polymerase III *H1* promoter; *EF1α*-p, *elongation factor-1 alpha* promoter; WPRE, woodchuck posttranscriptional regulatory element; PRE, a mutated WPRE sequence (WPREmut6); and cHS4, element of the chicken *β-globin hypersensitivity site 4*.

(C) Schematic strategy used for reprogramming human keratinocytes from a CEP-affected person and for HSC differentiation. The following abbreviations are used: HD, hematopoietic differentiation; and ED, erythroid differentiation.

into HSCs. Enzymatic and metabolic corrections were obtained in erythroid cells derived from corrected CEP iPSC clones. This study is a proof of principle of a safe iPSC-mediated gene therapy for CEP.

Material and Methods

Lentiviral Constructions and Productions

Two lentiviral vectors were used for iPSC generation (OSK 1 and Mshp53) (Figure 1B). The polycistronic pKP332 (Lenti-OSK1) vector (OSK 1) was obtained from Addgene (plasmid 21627). *OCT4* (*POU5F1* [MIM 164177]), *SOX2* (MIM 184429), and *KLF4* (MIM 602253) cDNAs, linked with porcine teschovirus-1 2A sequences, were under the control of the *EF1-α* promoter in a self-inactivating (SIN) lentiviral vector containing a Lox P site in the truncated 3′ long terminal repeat (LTR).[30] We constructed Mshp53 containing *MYC* (MIM 190080) cDNA and shRNA against *TP53* (MIM 191170) as follows: *MYC* from a lentiviral Cre-Lox pMXs-hc-MYC plasmid (17220 from Addgene) was digested by NotI and inserted into a subcloning vector to flank the cassette with EcoRI and BamH1 restriction sites. The *EGFP* cassette from pLVTH-siP53 (12239 from Addgene) was removed with EcoRI and BamHI and replaced by the insert of *MYC* under the control of the *EF1- α* promoter.

The therapeutic lentiviral vector HAUPins has been previously described[31] and is derived from the original HAUW vector containing *UROS* cDNA under the control of the chimeric *HS40-Ankyrin* promoter, a vector already used in gene therapy in the CEP mouse model.[12] In brief, HAUPins is different from HAUW in that it contains (1) the insertion of a mutated WPRE sequence (PRE) without the potentially oncogenic WPRE-X[32] and (2) the insertion of the 5′ cHS4 insulator in the ΔU3 sequence of the 3′ LTR.[33] The HAEPins control vector contains exactly the same backbone but has *EGFP* instead of *UROS* cDNA (Figure 5C).

VSV-G pseudotyped lentivectors were produced by triple transient transfection in 293T cells and were concentrated by ultrafiltration (Vivaspin 20, Sartorius Biotech SA, USA) as previously described.[12] To determine viral production, we measured human immunodeficiency virus (HIV) p24 titles in the concentrated viral supernatant by ELISA assay (Innotest HIV, p24, Innogenetics, France). We estimated viral titers by comparing p24 antigen levels of each lentiviral supernatant with a green fluorescent protein (GFP) lentiviral supernatant produced simultaneously. Supernatants were found to be free of replication-competent virus.

Source of Somatic Cells for Human iPSC Generation and Transduction

Keratinocytes were isolated from a CEP-affected person and a healthy person undergoing plastic surgery after informed consent was obtained in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux). Skin fragments were treated with trypsin-EDTA for 3 hr at 37°C for the separation of

the epidermis from the dermis. Keratinocytes were seeded at a concentration of 10^5 cells per cm^2 in MCDB153 medium, which included hydrocortisone (0.5 μg/ml), epidermal growth factor (10 ng/ml), insulin (5 μg/ml), and bovine pituitary extract (70 μg/ml) (all from Sigma). For reprogramming, keratinocytes were seeded at a concentration of 10^5 cells per well (in a 6-well plate) and were cotransduced 24 hr later with a combination of OSK 1 and Mshp53 lentivectors at a multiplicity of infection (MOI) of 10. After an additional 2 day culture in the same medium, cells were transferred onto mitomycined mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and cultured in the embryonic stem (ES) medium described below.

$CD34^+$ cells from a cord-blood sample were obtained after informed consent was obtained according to procedures approved by the Bagatelle Hospital review board. Mononuclear cells were isolated by Ficoll gradient. $CD34^+$ cells were purified according to the manufacturer's (Miltenyi Biotech) instructions. Purity was analyzed by flow cytometry with a phycoerythrin-conjugated CD34 antibody (Becton Dickinson). $CD34^+$ cells were cultured 2 days in expansion medium consisting of Stem Span SFEM (STEMCELL Technologies, Grenoble, France) supplemented with Flt3-L (50 ng/ml), SCF (50 ng/ml), and human TPO (50 ng/ml) (all from Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA). For reprogramming, $CD34^+$ cells were cotransduced with a combination of the two reprogramming lentivectors at a MOI of 100. After an additional 2 day culture in the same expansion medium, cells were transferred onto mitomycined MEFs and cultured in ES medium.

For keratinocytes and $CD34^+$ cells, the individual iPSC-like colonies were picked up from days 14–21 for expansion. iPSC-like colonies from human skin fibroblasts were obtained with the same two lentivectors at a MOI of 30 and were later picked up from week 5 to week 6.

Human iPSC Culture

Human iPSC clones were maintained as undifferentiated cells in cocultures with mitomycined MEFs. The ES medium used was the following: KO-DMEM (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France) containing 20% KOSR (Invitrogen) (vol/vol), 15 ng/ml human bFGF (Peprotech), 1 mM GlutaMAX (Invitrogen), 100 μM Non-Essential Amino Acids (Invitrogen), 100 μM 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 50 μg/ml ascorbic acid (Sigma-Aldrich), 0.5 mM sodium butyrate (Sigma-Aldrich), 50 U/ml penicillin, and 50 mg/ml streptomycin (Invitrogen). The ES medium was changed every day.

iPSC Characterization

Substrate staining for alkaline phosphatase (ALP) was carried out with a leukocyte ALP staining kit (Sigma-Aldrich).

For the detection of pluripotency markers, cells grown in 24-well plates were fixed by 4% paraformaldehyde and permeabilized with ice-cold 0.2% Triton X-100 in PBS. After saturation with 0.2% PBS-triton and 1% HSA, cells were stained with primary antibodies for 1 hr and were then incubated with a second fluorochrome-labeled antibody (Alexa Fluor, Invitrogen). The primary antibodies used were: OCT4 (clone C-10, Santa Cruz,CA, USA), SOX2 (Abcam, Cambridge, UK), KLF4 (Abcam), NANOG (Abcam), SSEA-4 (clone 813-70, STEMCELL Technologies), and TRA1-60 (STEMCELL Technologies).

For RT-PCR analysis of pluripotency markers, total RNA from iPSC clones and primary cells ($CD34^+$ cells, keratinocytes, and fibroblasts) was isolated with TRIZOL reagent (Invitrogen). RT-PCR (27 cycles) was performed after RNase-free DNase pretreatment with a first-Strand cDNA synthesis kit for RT-PCR (Roche Applied Science, Meylan, France) and with oligonucleotides described by Papapetrou et al.[27]

For teratoma induction, iPSCs were plated in a 10 cm MEF feeder dish. At day 6, approximately 2×10^6 cells were harvested, resuspended in 100 μl of ES medium containing 10 μM of the Rho-associated kinase (Rock) inhibitor Y-27632 (Sigma), and injected into NOD Cg-*Prkdc*^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ (NOD-SCID *IL2Rg* null:NSG) mice (subcutaneous space). The NSG mice were produced and housed in the University Bordeaux Segalen animal facility according to the rules and regulations governed and enforced by the Institutional Animal Care and Use Committee. The animal facility's institutional agreement number is A33063916. Animals were included in protocols between the ages of 6 and 8 weeks. Teratomas were harvested 8–12 weeks after injection. Paraffin-embedded tissue was sliced and stained with Alcian blue.

Karyotyping

After FrdU synchronization followed by a thymidine chase, standard R-banding analysis was performed on metaphase chromosomes obtained with all iPSC clones. At least 20 metaphase chromosomes were fully karyotyped.

Cre-Mediated Vector Excision

IPSC clones were transduced twice at an MOI of 100 with a Cre-expressing adenovirus (kindly provided by the Association Française contre les Myopathies, Généthon). At day 7, iPSCs were dissociated into single cells with accutase (STEMCELL Technologies) and cloned by a limiting dilution. Cre-Lox excision of proviral reprogramming cassettes was checked in each subclone by multiple PCR analyses. Primers used were designed by Primer3 software for both proviruses, and their positions in OSK 1 and Mshp53 are shown in Figure 1B. All oligonucleotide sequences are provided in Table S1, available online.

Quantitative PCR Detection of HAUPins Provirus

DNA was isolated with the NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) from 1×10^6 cells, and real-time PCR was performed on 100 ng of DNA with the use of Taqman technology (Applied Biosystems, Foster City, CA). DNA from nontransduced cells was isolated and amplified at the same time for demonstrating the absence of contamination. Samples were heated to 50°C for 2 min and to 95°C for 10 min, and then 40 cycles of PCR were performed for 15 s at 95°C and for 1 min at 60°C. *UROS* amplimers are described in Table S1. *RNaseP* was used for normalization (Applied Biosystems, Foster City, CA). DNA from two different cell clones (human 293T and K562 cells), containing a single integrated copy of the transgene, was used as a standard.

Characterization of Proviral Integration Site by LAM-PCR

For the identification of genomic proviral ISs, linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR) was performed as previously described[34] with 100 ng of DNA from each iPSC clone. Linear PCR was carried out with biotinylated primer LTRI*. Selection of biotinylated extension products was performed with magnetic beads according to the manufacturer's (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway) instructions. After double-stranded DNA synthesis, Tsp509I was used as the restriction enzyme, and a double-stranded asymmetric linker cassette was linked with LC1 and LC3 linkers.

The first exponential PCR was carried out with linker-cassette primer LCI and vector-specific primer LTRII*, whereas the second exponential PCR was carried out with internal primers LCII and LTRIII. PCR products were cloned into the TOPO TA cloning vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) and sequenced. Sequences obtained were aligned by BLAST with the human genome.

ISs were confirmed by PCR with the forward primer specific to the cHS4 insulator sequence and the reverse primers specific to the genomic sequence adjacent to the integration (all oligonucleotides are provided in Table S1).

The proximity of ISs to proto-oncogenes was determined by comparison with the allOnco database.

Hematopoietic Differentiation of iPSCs

Hematopoietic differentiation of iPSCs was performed as described by Woods et al.[35] with modifications. In brief, we first generated embryonic bodies (EBs). From day 0 to day 2, iPSCs were harvested and placed in EB medium (IMDM medium, 15% fetal bovine serum [FBS], 1% nonessential amino acid) overnight on nonadherent cell-culture dishes. Then, to induce mesodermal transition, we cultured newly generated EB colonies on mitomycined OP9 feeder cells (CRL-2749 from ATCC, Manassas, VA, USA) on Matrigel (BD Biosciences) for 12 additional days; we partially changed the medium every day in a mesodermal-specifying medium (DMEM/F12, 15% FBS with BMP4, low doses of VEGF, TPO, EPO, SCF, and Flt3L [all from Peprotech at the same concentrations described by Woods et al.[35]], holotransferrine and ascorbic acid [from Sigma-Aldrich], and PGE_2 [Cayman Chemical]). From day 14 to day 21 of hematopoietic differentiation, medium was changed to serum-free expansion medium (STEMCELL Technologies) supplemented with TPO, EPO, SCF, Flt3L, and PGE_2 for the promotion of hematopoietic differentiation and HSC expansion. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis of $CD34^+$ and $CD45^+$ cells was performed at day 21 for the evaluation of hematopoietic-differentiation efficiency.

Hematopoietic Colony Formation in Methylcellulose

Single-cell suspensions of hematopoietic cells were plated in a methylcellulose-based medium of MethoCult H4435 (STEMCELL Technologies) (approximately 10^5 cells) in 6-well plates. At day 14, colonies were scored by bright-field microscopy and fluorescence for the visualization of fluorocytes and GFP expression. Fluorescent images were acquired with a Nikon ECLIPSE Ti inverted microscope and captured with a digital sight camera and NIS-element imaging software.

Erythroid Differentiation

For erythroid differentiation, we performed a 3 week protocol after hematopoietic differentiation. In brief, cells were seeded in a 6-well low attachment plate with erythroid medium (Stem-alpha AE base [Stem Alpha, France] supplemented with 5% human plasma, 5 U/ml Epo, 50 ng/ml SCF from Peprotech, 1 mg/ml holotransferrine, 10^{-6} M dexamethasone, 20 ng/ml insulin, and 10^{-4} M β-mercapto-ethanol [Sigma Aldrich]). Hemoglobin analysis was performed by HPLC (Variant II, Bio-Rad). FACS analysis of $CD71^+$ and GPA^+ cells was performed at day 21 for the evaluation of erythroid-differentiation efficiency.

Flow Cytometry

Cells were individualized from the differentiation cultures, collected, and washed with 1% PBS-HSA. Cells were stained with phycoerythrin (PE)- or allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD34, PECy5- or PE-conjugated anti-CD45, PE-conjugated anti-CD14, APC-conjugated anti-CD19, PE-conjugated anti-CD33, PE-conjugated anti-CD71, and APC-conjugated anti-GpA (all from BD, Franklin Lakes, NJ, USA).

Fluorocytes were analyzed at 550 nm emission wavelength with a 405 nm excitation laser. Cells were analyzed on a FACS flow cytometer (Canto II, BD, San Jose, CA, USA).

UROS Enzymatic Activity and Metabolic Correction

UROS activity was determined by an enzyme-coupled assay as described previously.[36] One unit was defined as the amount of enzyme that formed 1 nmol of uroporphyrinogen III per hour at 37°C.

Statistical Analysis

Results are expressed as mean ± standard deviation (SD). Statistical tests were performed with Student's t tests. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Generation of iPSCs

Primary human epidermal keratinocytes were isolated from the skin of a healthy donor undergoing plastic surgery and from a skin biopsy from a CEP-affected individual after informed consent was obtained. Genetic testing revealed that the CEP-affected individual was compound-heterozygous for *UROS* (RefSeq NG_011557.1) mutations c.217T>C (p.Cys73Arg) and c.683C>T (p.Thr228Met), thus confirming the diagnosis of CEP (Figure 1A). The residual enzymatic activity measured by an enzyme coupled assay was below 2% of the normal level.

To increase the yield of iPSC generation, we designed the Mshp53 vector carrying the coexpression of *MYC* under the control of *EF1-α* promoter and a shRNA against *TP53* under the control of the *H1* promoter (Figure 1B). In addition to the expression of the four standard reprogramming factors, the repression of TP53 has been previously reported to improve the efficiency of the reprogramming process.[37] iPSC generation was obtained by transduction of normal and deficient keratinocytes with the two SIN lentivectors (OSK 1 and Mshp53, Figure 1B). Colonies with ES-like morphology from normal keratinocytes (N-K iPSCs) and CEP keratinocytes (CEP-K iPSCs) were picked from days 14–21 (Figure 1C). Fibroblasts were also transduced for reprogramming as controls. In addition to transduction of these cells, transduction of neonatal $CD34^+$ cells from umbilical-cord blood cells was performed for generating control iPSCs for further hematopoietic differentiation.

Generation of iPSC clones from keratinocytes was ten times more efficient than that from control skin fibroblasts (0.4% versus 0.04%, respectively) and was faster (picked from days 14–21 versus days 35–42 for fibroblasts). Although OSK 1 vector transduction alone led to efficient reprogramming with murine fibroblasts,[30] the use of this

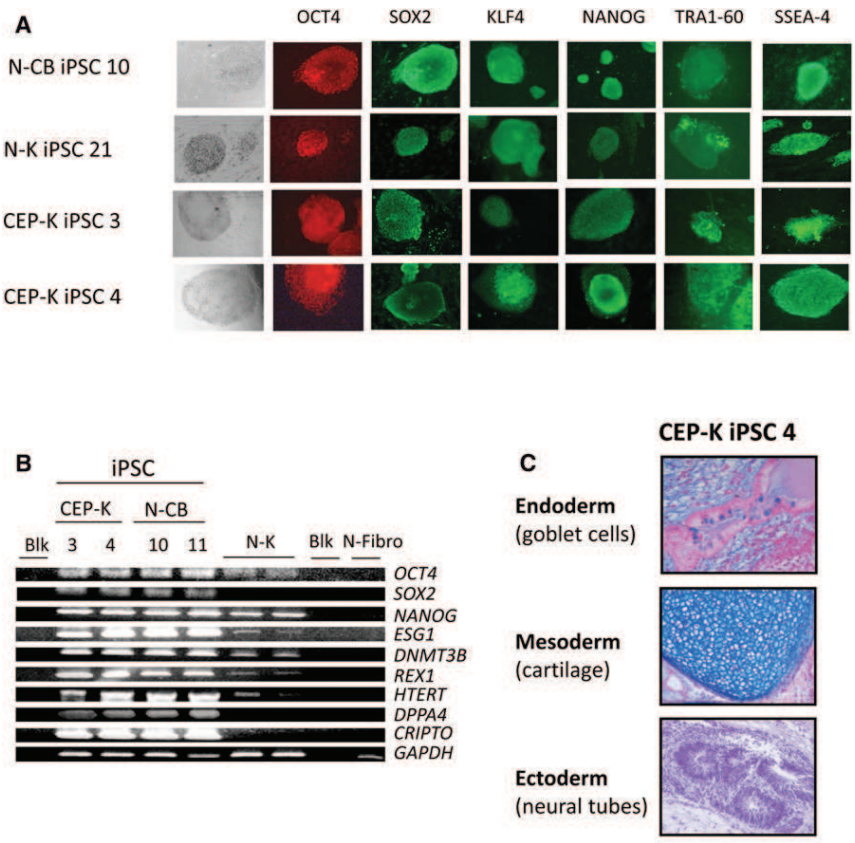


Figure 2. Characterization of iPSC Clones

(A) Representative immunofluorescence of pluripotency markers in human iPSC clones derived from normal $CD34^+$ CB cells (N-CB iPSC 10) and in keratinocytes derived from a normal individual (N-K iPSC 21) and a CEP-affected individual (CEP-K iPSC 3 and CEP-K iPSC 4); staining is with anti-OCT4, anti-SOX2, anti-KLF4, anti-NANOG, anti-SSEA-4, and anti-TRA1-60. MEFs surrounding human iPSCs served as a negative control for immunofluorescence (magnification ×100 or ×200).

(B) Expression of pluripotency-associated genes (*OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *ESG1*, *DNMT3B*, *REX1*, *HTERT*, *DPPA4*, and *CRIPTO*) by RT-PCR cycles (28) from two independent CEP-K iPSC clones and two N-CB iPSC clones. Primary N-K cells and primary normal human fibroblast (N-Fibro) cells were used as controls. *GAPDH* served as an internal positive control. The following abbreviation is used: Blk, blank (PCR performed without cDNA).

(C) Alcian-blue staining of histological sections of a representative teratoma derived from human CEP-K iPSC 4 shows tissues of all three germ layers (magnification ×200).

(D) Representative karyotypic analysis of two human CEP-K iPSC clones (CEP-K iPSC 3 and CEP-K iPSC 4).

single vector failed to generate stable iPSC clones from human cells. Indeed, the addition of the Mshp53 vector was mandatory for achieving the terminal reprogramming and generating high-quality iPSC clones. Efficiency and kinetics of keratinocyte reprogramming were quite similar to neonatal normal $CD34^+$ cells (N-CB iPSCs). All the colonies harvested demonstrated the typical characteristics of pluripotent stem cells, i.e., similar morphology to human ES cells, strong alkaline-phosphatase activity (data not shown), and expression of pluripotent stem cell markers, such as OCT3/4, SOX2, KLF4, NANOG, SSEA-4, and TRA1-60 (Figure 2A), as evidenced by immunocytochemistry. We isolated a total of 23 iPSC clones from keratinocytes (N-K iPSCs and CEP-K iPSCs), fibroblasts, or normal $CD34^+$ cells (N-CB iPSCs). Four putative iPSC clones (two CEP-K iPSCs [3 and 4] and two N-CB iPSCs [10 and 11]) were kept for further characterization. RT-PCR analysis revealed that the endogenous pluripotency-associated genes *NANOG* (MIM 607937), *ESG1* (*TLE1* [MIM 600189]), *DNMT3B* (MIM 602900), *REX1* (*ZFP42* [MIM 614572]), *TERT* (MIM 187270), *DPPA4* (MIM 614125), and *CRIPTO* (*TDGF1* [MIM 187395]) were robustly expressed in the isolated colonies (Figure 2B). iPSC xenografts into immunodeficient NSG mice resulted in the formation of teratomas, and all three embryonic germ layers demonstrated in vivo pluripotency of the iPSC clones (Figure 2C). Karyotypic analyses confirmed the absence of macroscopic genetic abnormality in all the tested iPSC clones (Figure 2D) except for CEP-K iPSC 3, in which there was a minor abnormality (some mitosis with one X chromosome deletion) (Figure 2D, left panel). As a precaution, this iPSC clone was kept as an uncorrected control for further experiments.

Generation of Safe and Corrected iPSC Clones without Exogenous Reprogramming Factors

To develop safe iPSCs without exogenous reprogramming factors, we excised the reprogramming cassettes, flanked by the loxP sites, by adenovirus-mediated CRE recombinase expression in the four iPSC clones tested (Figure 1C). After subcloning the four iPSCs (two CEP-K iPSCs [3 and 4] and two N-CB iPSCs [10 and 11]), we performed a DNA-PCR analysis to select clones with excision of both reprogramming cassettes (Figure 3A, upper panel). To check the absence of additional recombination with portions of

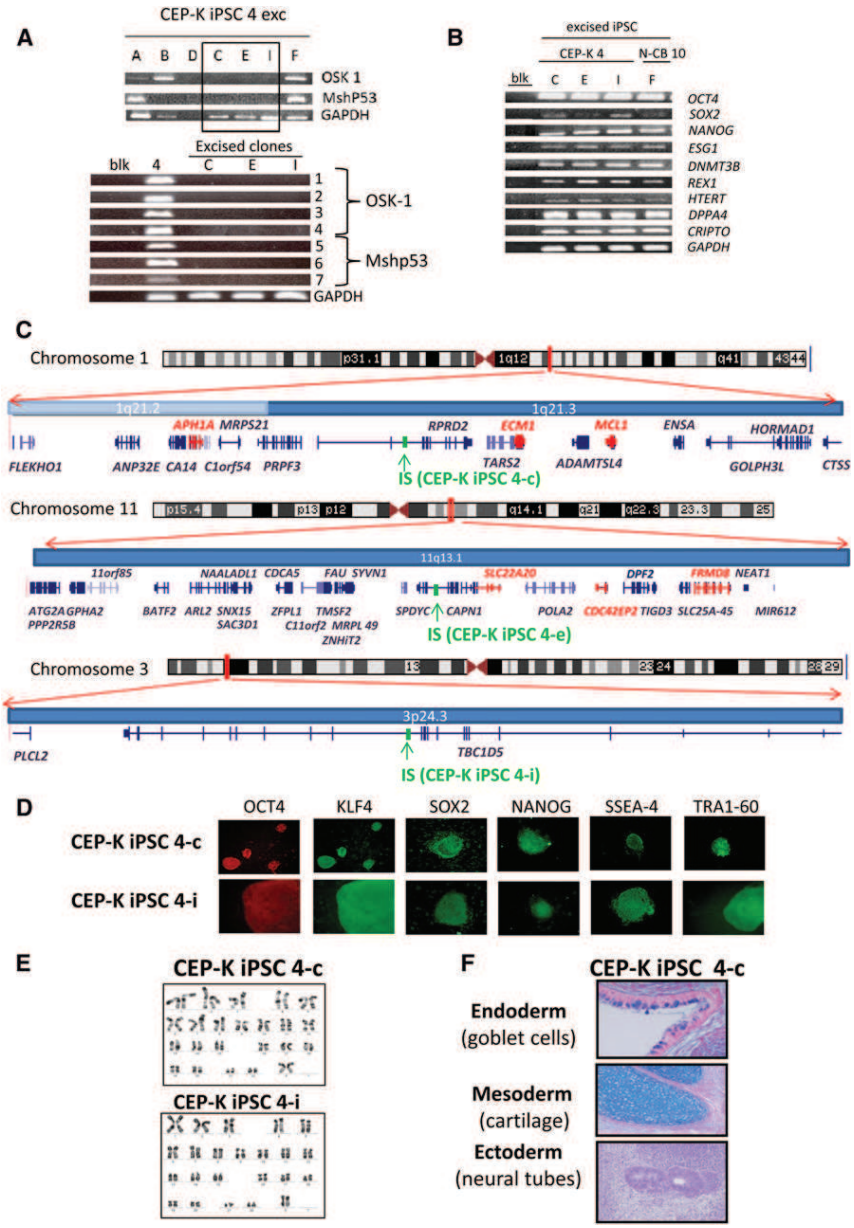


Figure 3. Characterization of iPSC Clones Free of Reprogramming Transgene

(A) Upper panel: PCRs for the integrated vectors OSK 1 and Mshp53 in seven CEP-K iPSC 4 subclones pretreated by CRE adenovirus (subclones are A, B, C, D, E, F, and I). Lower panel: Multiple PCRs performed on DNA from the three excised clones (C, E, and I) and the nonexcised iPSC 4 with seven couples of primers described in (B) for detecting the presence of portions of the recombinant provirus.

(B) Expression of pluripotency-associated genes by RT-PCR from three independent iPSC subclones from CEP-K iPSC 4 and one iPSC subclone from N-CB iPSC 10.

(C) Chromosome ideograms and graphics depicting 300 kb of the human genome on both sides of the proviral IS (in green) of HAUPins from CEP-K iPSC 4-c (upper panel), from CEP-K iPSC 4-e (middle panel), and from CEP-K iPSC 4-i (lower panel). Graphics were obtained with the UCSC Genome Graphs tool. All known genes present in the genomic region are shown (genes implicated in cancer according to the allOnco database are shown in red).

(D) Representative immunofluorescence of pluripotency markers in human iPSC clones that are free of reprogramming transgene and derived from CEP-K iPSC 4-c and 4-i (magnification ×100 or ×200).

(E) Karyotypic analysis of the two excised clones (4-c and 4-i).

(F) Alcian-blue staining of histological sections of a teratoma derived from human CEP-K iPSC 4-c, free of reprogramming transgene, shows tissues of all three germ layers.

the reprogramming vectors in the three excised clones (4-c, 4-e, and 4-i), we used an additional set of multiple primers all along both proviruses (Figure 3A, lower panel). Gene correction of CEP-K iPSC 4 was then obtained by lentiviral transduction with a HAUPins vector. This vector contains the *UROS* cDNA sequence under the control of the chimeric *HS40 enhancer/ ankyrin-1* erythroid-specific promoter and is shielded by cHS4 insulators in the LTR (Figure 1B). Subsequently, we tested excised subclones from CEP-K iPSC 4 by quantitative-PCR analysis to identify those with only one copy of the HAUPins vector. The sequencing of the proviral IS after LAM-PCR allowed us to locate the IS of HAUPins (Figure 3C). For corrected subclone 4-c, the IS is located on chromosome 1 (position 148,683,731, orientation +) in the sixth intron of *RPRD2*. For corrected subclone 4-e, the IS is located on chromosome 11 (position 64,963,338, orientation +) in the tenth intron of *CAPN1* (MIM 114220). For corrected subclone 4-i, the IS is located on chromosome 3 (position 17,418,684, orientation +) in the fifth intron of *TBC1D5*. Graphics depicting 600 kb of human genome of the IS region for each clone and all genes present are shown in Figure 3C. Sixteen genes, including three cancer-related genes (*APH1A* [MIM 607629], *ECM1* [MIM 60220], and *MCL1* [MIM 159552]; all labeled in red in Figure 3C, upper panel) were found in the 600 kb region around the IS of clone 4-c. In the same way, twenty-eight genes, including three cancer-related genes (*SLC22A20* [MIM 611696], *CDC42EP2* [MIM 606132], and *FRMD8* [Figure 3C, middle panel]) were found near the IS of clone 4-e. In contrast, only two genes (neither of them related to cancer) were found in the 600 kb region of the 4-i IS (Figure 3C, lower panel). Then, we eliminated clone 4-e because of the density of genes in the neighbor of the IS. Characterization of the four excised iPSC clones (4-c, 4-e, 4-i, and 10-f) by

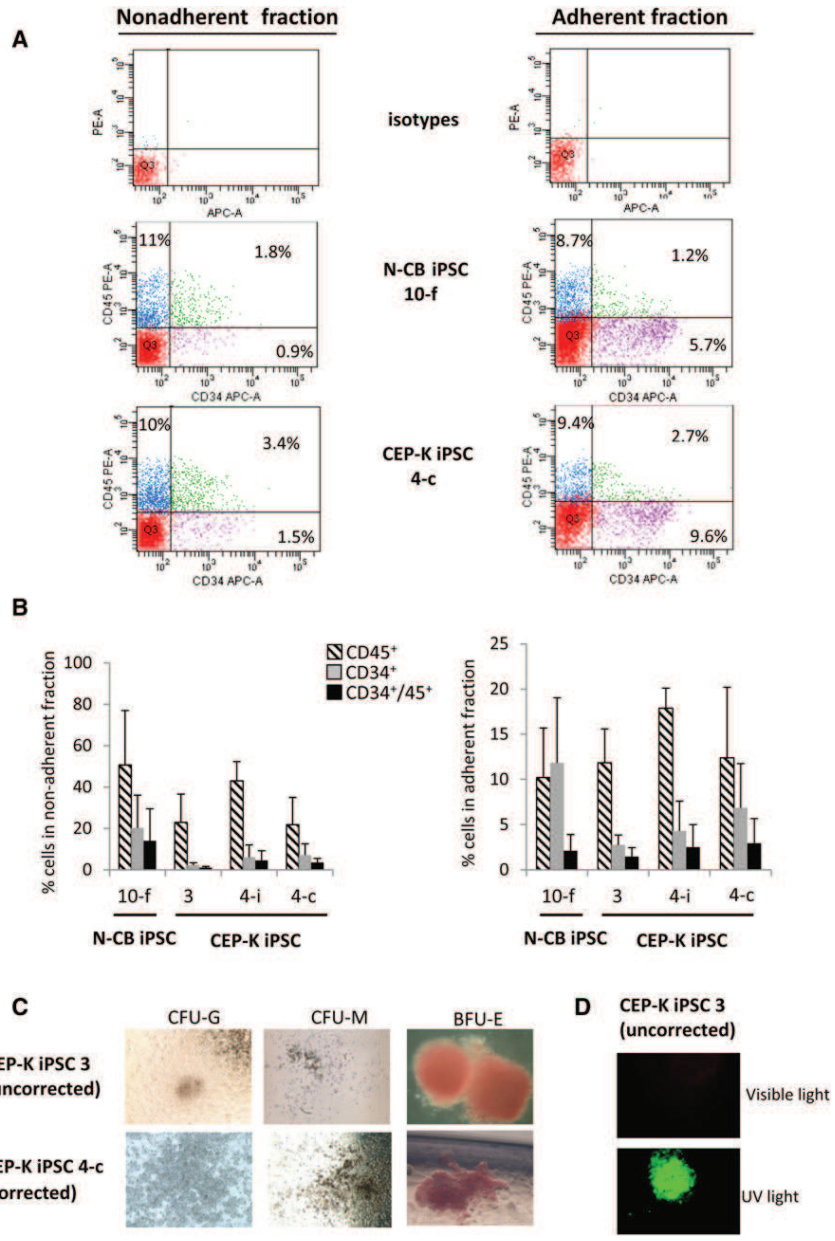


Figure 4. Efficient Hematopoietic Differentiation of iPSCs

(A) Representative FACS analysis of $CD45^+$ and $CD34^+$ cells obtained from N-CB iPSC 10-f (upper panels) and CEP-K iPSC 4-c (lower panels), both free of reprogramming transgenes, after hematopoietic differentiation (at day 21) in nonadherent fraction (left panels) and in adherent fraction (right panels) from the same experiment.

(B) Bar graphs show the average percentages of $CD45^+$, $CD34^+$, and $CD34^+$ and $CD45^+$ cells obtained from four iPSC clones (N-CB iPSC 10-f, uncorrected CEP-K iPSC 3, and corrected CEP-K iPSCs 4-i and 4-c) in nonadherent fractions (left panel) and in adherent fractions (right panel) at day 21 of hematopoietic differentiation ($n = 5$ independent experiments, mean ± SD). No statistical difference was observed between clones.

(C) Bright-field microscopy of CFUs (a granulocytic CFU [CFU-G], a monocytic CFU [CFU-M], and an erythroid burst-forming unit [BFU-E]) in methylcellulose medium by hematopoietic cells obtained from uncorrected (upper panel) or corrected (lower panel) CEP-K iPSCs (magnification ×100).

(D) Inverted microscopy of a BFU-E in methylcellulose derived from the uncorrected CEP-K iPSC 3 under visible (upper panel) or UV light (lower panel).

RT-PCR (Figure 3B), immunocytochemistry (Figure 3D), and teratoma assays (Figure 3F) confirmed that the subclones retained their pluripotency. No abnormality was found by new karyotypic analysis (Figure 3E).

Differentiation of iPSCs into HSCs

To generate hematopoietic cells, including hematopoietic stem and progenitors cells (HSPCs), we used the optimized 3 week protocol described by Woods et al.[35] with some modifications (days 1–21, Figure 1C). At day 21, after hematopoietic differentiation, we obtained hematopoietic cells ($CD45^+$) derived from all iPSC clones but with various yields of hematopoietic cells ($CD45^+$) depending on the cell fractions (in adherent or nonadherent compartments) (Figures 4A and 4B).

In the nonadherent fraction, high yields of $CD45^+$ cells were obtained without a significant difference between clones: N-CB iPSC 10-f had a mean of 50.7%, CEP-K iPSC 3 had a mean of 22.8%, CEP-K iPSC 4i had a mean of 43%, and CEP-K iPSC 4c had a mean of 21.8% (Figures 4A and 4B, left panels). For the $CD34^+$ and $CD45^+$ population, we observed a higher mean of percentage for cells derived from N-CB iPSCs than for cells derived from K iPSCs, but there was no significant difference: N-CB iPSC 10-f had a mean of 14%, CEP-K-iPSC 3 had a mean of 1.1%, CEP-K iPSC 4i had a mean of 4.5%, and CEP-K-iPSC 4c had a mean of 3.5% (Figure 4B, left panel).

In the adherent fraction, no difference in hematopoietic-differentiation efficiency was observed for percentages of $CD45^+$ cells and $CD34^+$ and $CD45^+$ cells between iPSCs derived from keratinocytes and those derived from cord-blood cells (Figure 4B, right panel). Interestingly, however, we found that the mean fluorescent intensity (MFI) of CD34-APC signals was ten times higher in the adherent fraction than in the nonadherent counterpart (Figure 4A).

A more complete cell-surface-marker signature was realized in nonadherent $CD45^+$ cells compartment derived

from the corrected CEP-K iPSC 4-i clone. FACS analysis showed the presence of myeloid cells ($CD33^+$: 29.5%), monocytes ($CD14^+$: 27.1%), erythroid cells ($CD71^+$ and GPA^+: 11.2%), and B lymphoid cells ($CD19^+$: 2.6%).

In addition to performing cell-surface-marker analysis, we performed colony-forming unit (CFU) assays and observed erythroid burst-forming units (BFU-Es) and CFU granulocyte/monocyte (CFU-GM) colonies derived from all iPSC clones (Figure 4C). As a result of spontaneous porphyrin accumulation, BFU-Es from uncorrected CEP-K iPSC 3 fluoresced in red when viewed under UV light (excitation light 405 nm) (Figure 4D, lower panel), whereas BFU-Es from normal N-CB iPSCs, corrected CEP iPSC 4-c, and CEP iPSC 4-i did not fluoresce. A 3 week in vitro erythroid differentiation was then performed from nonadherent hematopoietic cells (Figure 1C). A very efficient erythroid differentiation was obtained (from 10% $CD71^+$ and glycophorin-A^+ at day 10 to 76% at day 17, for example, with CEP-K iPSC 4i) (Figure 5A). Cytological examination revealed abundant basophilic and polychromatic erythroblasts without enucleation (Figure 5B). HPLC analysis showed that these erythroblasts contained mainly fetal hemoglobin, but not adult hemoglobin (not shown).

Enzymatic and Metabolic Rescue of the Corrected Cells

After reprogramming, it is possible that epigenetic modifications induce silencing of the transgene promoter carried by a lentiviral vector. In our model, rescue of UROS activity was dependent on the activity of the *HS40/Ank* promoter during erythropoiesis. So, we first analyzed whether the chimeric *HS40/Ank* promoter was still functional and erythroid specific in our iPSC differentiation model. To carefully verify this main prerequisite, we transduced the N-CB iPSC 10-f clone with the HAEPins lentivector (the same as HAUPins but with *EGFP* cDNA instead of *UROS* cDNA [Figure 5C]) at a MOI of 10. Erythroid-specific GFP expression was confirmed by FACS analysis at day 21, when the hematopoietic differentiation was complete. Almost all GFP^+ cells were Glycophorin A^+ and had a high MFI, confirming the erythroid specificity of the vector in the iPSC model (Figure 5D). Surprisingly, inverted fluorescence microscopy at the early stage of hematopoietic differentiation (between days 10 and 14) revealed the presence of erythroid progenitor cells contained in sacs on the OP9 feeder cells; these sacs resembled the yolk sac described in early erythropoiesis during embryogenesis (Figure 5E, middle and left panels). These cells were found in the supernatant medium at day 21 (Figure 5E, right panel). GFP^+ BFU-E colonies in methylcellulose assays were observed under an inverted microscope (Figure 5F).

The residual UROS activity in primary CEP keratinocytes used for iPSC generation was much lower than that in normal primary keratinocytes (<0.2 U/mg protein, Figure 6A). We performed quantification of UROS enzymatic activity of erythroid cells derived from iPSCs 21 days after the induction of erythroid differentiation. In erythroid cells derived from N-CB iPSC 10-f, a high level of enzymatic activity was observed in erythroblasts as a result of the strong activity of the endogenous erythroid-specific *UROS* promoter from the two alleles (mean = 46.3 ± 9.6 U/mg protein). By contrast, the erythroid cells from the uncorrected CEP iPSC 3 displayed very low levels of UROS activity (below <1 U/mg protein). We observed that the enzymatic activity in erythroid cells from the corrected clone (4-i) was six times higher than that in cells from the uncorrected clone 3 (mean = 5.2 ± 0.9 U/mg protein) (Figure 6 A).This activity represents 11% of the UROS activity of the erythroid cells derived from N-CB iPSCs and 52% of the UROS activity of normal keratinocytes (Figure 6A). To examine whether this partial enzymatic correction was translated into a metabolic rescue, we looked at the proportion of fluorocytes at the end of erythroid differentiation. Spontaneous accumulation of porphyrins in erythroid cells derived from the uncorrected CEP-K iPSC 3 clone resulted in a high percentage of fluorocytes (47.3% ± 1.8, n = 3), whereas fluorocytes were almost absent in the erythroblasts derived from N-CB iPSC 10-f (2.6% ± 0.4, n = 3, $p < 0.001$) (Figures 6B and 6C, upper panels). After gene therapy, metabolic correction was easily demonstrated by the complete disappearance of fluorocytes in the erythroid cells derived from the corrected CEP-K iPSC clones 4-c and 4-i (4.3% ± 1.8 and 6.3% ± 3.5, respectively; $p < 0.01$ for both clones versus the uncorrected CEP-K iPSC) (Figures 6B and 6C, lower panels). These data demonstrate that a single HAUPins proviral copy in CEP-K iPSC clones is sufficient to allow a metabolic correction of erythroid cells by the disappearance of 90% of porphyrins in erythroid cells.

Discussion

We generated iPSCs from keratinocytes at a high efficiency (up to 1.4% of input cells) with only two reprogramming vectors. On the basis of our preliminary results, we chose these cells because they had a reprogramming yield 10× higher and 2.5× faster than did human control fibroblasts. The low endogenous expression of pluripotency markers in keratinocytes is in agreement with the higher reprogramming yield in these cells compared with fibroblasts in our model. The efficiency of reprogramming human keratinocytes has also been observed by others studying normal and dystrophic-epidermolysis-bullosa-affected individuals.[38,39] The low endogenous expression of *KLF4* and *MYC* in keratinocytes could also explain the ease with which they are reprogramed.[38]

An efficient hematopoietic differentiation was obtained from two independent N-CB iPSC clones and three independent K iPSC clones. Interestingly, we found that the MFI of CD34-APC signals was ten times higher in the adherent fraction than in the nonadherent counterpart, suggesting the presence of more primitive HSCs in the adherent fraction, as previously observed by

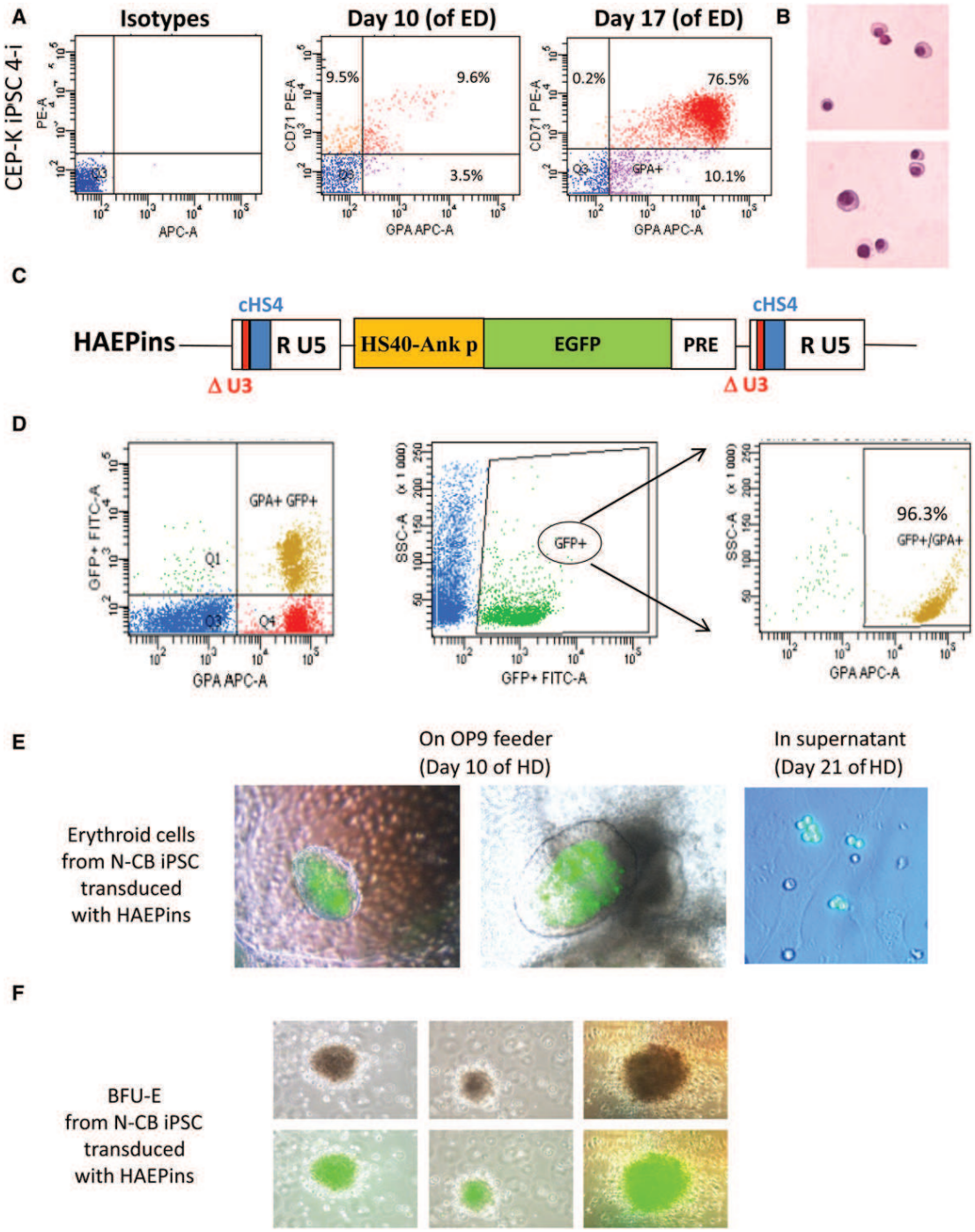


Figure 5. Efficient Erythroid Differentiation of HSCs Derived from iPSCs with Specific Transgene Expression
(A) Representative flow-cytometry data of in vitro erythroid-differentiation (ED) cultures from CEP-K iPSC 4-i. Cells were stained at day 10 and at day 17 of ED with anti-CD71-phycoerythrin (PE)- and anti-GPA-APC-conjugated antibodies (or they were stained with control isotype antibodies conjugated with PE and APC; left panels).
(B) Erythroblast maturation was evaluated at day 24 of ED by staining with May-Grünwald-Giemsa. Photographs show the late stage of erythroid maturation.
(C) Schema of the proviral form of the HAEPins control vector containing *EGFP* under the control of the *HS40/ankyrin* erythroid promoter.
(D) Representative FACS analysis of hematopoietic progenitors at day 21 of hematopoietic differentiation (HD) from the N-CB iPSCs previously transduced with the HAEPins lentivector.
(E) At day 10 of HD, formation of early erythroblast cells was revealed by GFP expression in sacks on OP9 stroma (middle and left panels) and by erythroblast cell suspension at day 21 of HD (right panel).
(F) Inverted microscopy of BFU-E colonies under a visible-light microscope (upper panels) and merged with GFP expression detected under UV light (lower panels).

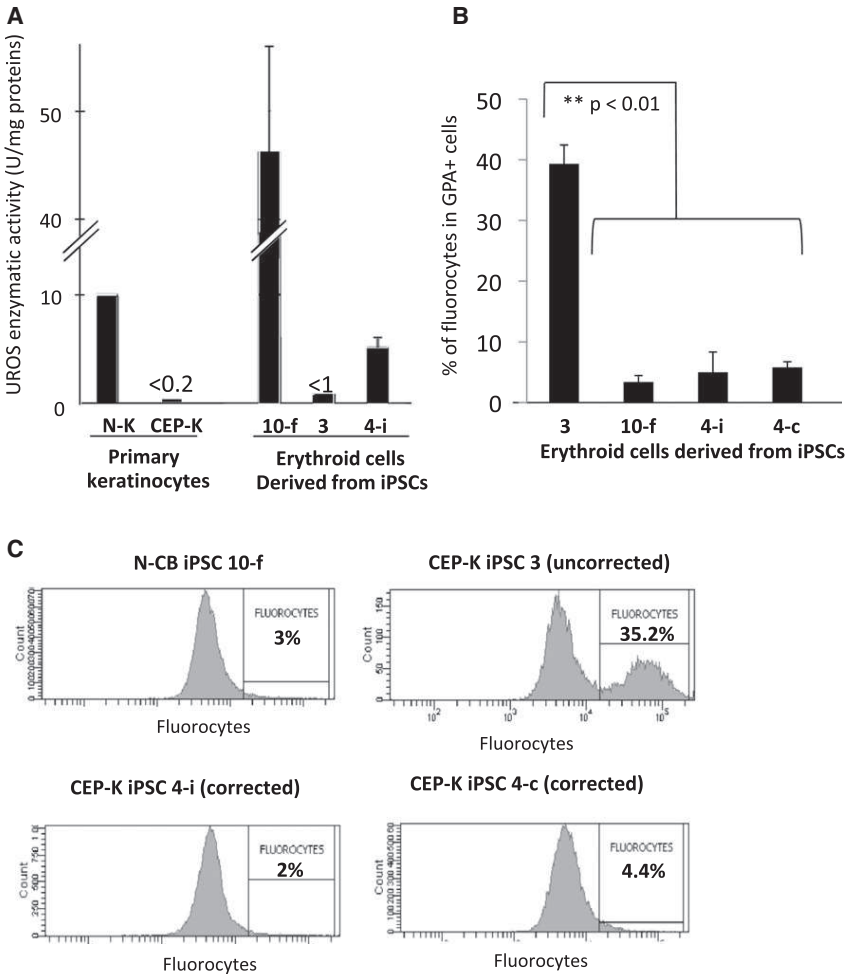


Figure 6. Enzymatic and Metabolic Correction

(A) UROS enzymatic activities in primary N-K and deficient CEP-K cells and in erythroid cells derived from N-CB iPSC 10-f, CEP-K iPSC 3 (uncorrected), and CEP-K iPSC 4-i (corrected) clones.

(B) Bar graphs show average percentages of fluorocytes gated on erythroid GPA$^+$ cells from three independent experiments (mean ± SD).

(C) Representative FACS analysis of the fluorocytes gated on erythroid GPA$^+$ cells derived from N-CB iPSC 10-f and uncorrected CEP-K iPSC 3 (upper panels) and from two corrected clones (4-i and 4-c; lower panels) at day 21 of erythroid differentiation.

Woods et al.[35] The type of donor cell can influence the epigenome and the differentiation potential of iPSCs.[40,41] Hematopoietic differentiation was supposed to be more efficient with iPSCs derived from cord blood than with those derived from keratinocytes. Surprisingly, in our study, CEP-K iPSCs did not show a hematopoietic differentiation rate that was significantly different from that of N-CB iPSCs. We believe that both downregulation of TP53 and forced expression of MYC are key requisites for erasing the residual epigenetic memory of the primary source of cells. Importantly, our experimental strategy was set to excise the reprogramming vectors for the generation of "clean" iPSCs, i.e., those that are free of reprogramming cassettes. Lack of the remaining reprogramming gene in our iPSCs possibly prevents aberrant de novo methylations, which can be deleterious to efficient further differentiation.[41] Methylcellulose assays showed evidence that the cells differentiated from both K iPSCs and N-CB iPSCs were functional hematopoietic progenitors. We can conclude that human primary keratinocytes are easily (1) available from human skin, (2) reprogrammed, and (3) differentiated in HSCs. Therefore, these cells are a very attractive somatic cell source for iPSC-based gene therapy for hematopoietic disorders.

We also report a highly efficient erythroid differentiation with HSCs derived from iPSCs. The erythroid specificity of our vector was demonstrated by a GFP-expressing control vector in which expression of the reporter gene was restricted to GPA$^+$ cells. The UROS enzymatic activity generated in erythroid cells was similar to that previously observed in erythroblasts from normal primary CD34$^+$ peripheral-blood cells.[42] A single copy of this vector restored 11% of the UROS enzymatic activity, whereas one allele of the normal endogenous erythroid-specific *UROS* restored 50%, suggesting that the endogenous *UROS* enhancer and promoter is almost five times stronger than our enhancer and promoter construct.[43] However, this partial activity (11% of the normal activity in erythroblasts) led to a disappearance of 90% of fluorocytes and was then enough to obtain a sufficient metabolic correction of the disease. This is in agreement with recently published results concerning a knockin CEP mouse model[11] in which the substitutions p.Cys73Arg (c.217T>C) and p.Val99Leu (c.296G>C) described in this mouse model were associated with 11% of wild-type UROS activity; the animals were just very mildly anemic (hemoglobin: 14 g/dl). This is also in agreement with clinical observations of the absence of phenotypes or minor phenotypes in persons with genotypes inducing residual UROS enzymatic activity.[44,45]

In a 3 week protocol of in vitro erythroid differentiation, iPSC-derived erythroid cells expressed the majority of fetal hemoglobin (65%), as previously reported.[27] This is probably due to an early stage of development, after only 21 days of culture. In vivo experiments in immunodeficient NSG mice could be helpful for modeling long-term erythroid differentiation with the use of iPSC clones derived from CEP cells. However, current humanized

mice have not proved to be very useful in assessing human red blood cell function because macrophages limit reconstitution of human red blood cells in them.[46]

In current HSC-based gene therapy, the recommended transduction level is around 30%–40% so that multiple integration events and associated oncogenic risks can be avoided. However, in CEP, there is no metabolic cross-correction between nontransduced and transduced deficient cells, and the majority of cells have to be corrected.[47] Fortunately, we previously demonstrated that gene therapy of CEP mice is facilitated by an in vivo survival advantage of corrected erythroid cells: only 40% of corrected cells were required for obtaining a complete phenotypic correction.[12] Therefore, for current CEP gene therapy, a full conditioning regimen prior to grafting is likely to be necessary. By contrast, a major advantage of the iPSC clonal approach is that 100% of HSCs derived from a genetically corrected clone are metabolically corrected. Thus, reinjection of 100% of corrected cells with their survival advantage allows us to consider only a partial conditioning with the advantage of dramatically reducing the morbidity risks of full conditioning.

For clinical applications, safe iPSC-based gene therapy will require considerable efforts for establishing a sufficient number of iPSC clones with (1) a normal karyotype, (2) full pluripotential capability, (3) complete excision of reprogramming cassettes, (4) only one proviral copy number of therapeutic gene, and (5) a rare random GSH. The reprogramming vectors used in this study were flanked by two loxP sites in order to be excised by expression of CRE recombinase. Thus, iPSCs free of potentially oncogenic reprogramming genes could be obtained. We chose adenovirus-mediated CRE transient expression with no risk of genomic integration to obtain a fast and efficient proviral excision. However, with this approach, small DNA from RU5 and the two residual loxP sites (34 bp each) still remains and could potentially cause deleterious effects, such as alteration of regulatory sequences. For clinical application, nonintegrative reprogramming methods could be safer, even if the efficiency of these methods is still very low. Furthermore, one advantage of iPSC-based gene therapy is the clonal approach allowing the characterization of the proviral IS of the therapeutic gene. Here, the IS of the HAUPins vector was mapped by LAM-PCR from the three corrected iPSC clones with only one copy of the transgene. We characterized the exact position of the IS: in both clones, the HAUPins vector was located outside of the exons in the intronic regions of nononcogenic genes (according to the allOnco database). However, three proto-oncogenes were found in the 600 kb region surrounding the IS of both clones 4-c and 4-e. This method allows us to identify and eliminate clones with potential oncogenic risk for clinical translation. The HAUPins vector used is a new generation of lentiviral vector secured by an erythroid-specific promoter and by the insertion of the efficient chicken hypersensitive site 4 (cHS4) chromatin insulator in the ΔU3 sequence from the 3′ LTR. This insulator was designed to prevent deregulation of neighboring genes.[48,49] Interestingly, no oncogene was found in the vicinity of the IS for the other clone (4-i). These would-be "GSHs" defined by Papapetrou et al.[27] are relatively rare (fewer than 10% of ISs)[29] and require a tedious characterization of each IS. In the same way, even the well-known safe AAVS1 locus does not respect all these strict rules because two oncogenes are in its vicinity and it even disrupts one gene.[50] An interesting alternative to lentiviral additive therapy for clinical application could be to insert *UROS* cDNA by the zinc finger nuclease (ZFN) strategy into GSHs chosen in silico.[50] Predicted high efficiency of this approach will certainly overpass the rarity of random retroviral ISs in GSHs. In the future, targeted repair of specific mutations will be the "ideal" correction approach but will require design of specific ZFNs for the most frequent *UROS* mutations.

In conclusion, this study reports iPSC-based gene therapy for porphyria. The next step of this project will be to evaluate the interest of iPSC-gene therapy in our CEP mouse model to study in vivo whether a long-term enzymatic and metabolic correction is possible. Although biosafety concerns still need to be addressed for clinical translation, regenerative therapy for CEP and other genetic red blood cell disorders is very promising.

Supplemental Data

Supplemental Data include one table and can be found with this article online at http://www.cell.com/AJHG.

Acknowledgments

We would like to thank Alice Biberan (from the vectorology platform, Bordeaux) for her technical assistance; Alban Giese for his technical assistance at the experimental histological platform, Cancéropole Grand Sud-Ouest, Bordeaux; and Ollivier Milhavet (Institut de Génétique Humaine, Montpellier) for his helpful discussion in the field of iPSC culture. The authors also thank Maison de Santé Protestante de Bordeaux-Bagatelle (Bordeaux) for providing umbilical-cord blood. This work was supported by the Association Française contre les Myopathies, the Agence Nationale de la Recherche (program GENOPAT-2009; grant iPSGENTHER), the Biomedicine Agence, and the Conseil Régional d'Aquitaine.

Received: March 2, 2012
Revised: April 18, 2012
Accepted: May 31, 2012
Published online: July 12, 2012

Web Resources

The URLs for data presented herein are as follows:

allOnco database, http://microb230.med.upenn.edu/protocols/cancergenes.html
Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), http://www.omim.org

References

1. Anderson, K.E., Sassa, S., Bishop, D.F., and Desnick, R.J. (2001). Disorders of heme biosynthesis: X-linked sideroblastic anemia and the porphyrias. In The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, and E. Valle, eds. (New York: C McGraw-Hill), pp. 2961–3062.
2. Richard, E., Robert-Richard, E., Ged, C., Moreau-Gaudry, F., and de Verneuil, H. (2008). Erythropoietic porphyrias: animal models and update in gene-based therapies. Curr. Gene Ther. *8*, 176–186.
3. Shaw, P.H., Mancini, A.J., McConnell, J.P., Brown, D., and Kletzel, M. (2001). Treatment of congenital erythropoietic porphyria in children by allogeneic stem cell transplantation: A case report and review of the literature. Bone Marrow Transplant. *27*, 101–105.
4. Kauffman, L., Evans, D.I.K., Stevens, R.F., and Weinkove, C. (1991). Bone-marrow transplantation for congenital erythropoietic porphyria. Lancet *337*, 1510–1511.
5. Lagarde, C., Hamel-Teillac, D., De Prost, Y., Blanche, S., Thomas, C., Fischer, A., Nordmann, Y., Ged, C., and De Verneuil, H. (1998). [Allogeneic bone marrow transplantation in congenital erythropoietic porphyria. Gunther's disease]. Ann. Dermatol. Venereol. *125*, 114–117.
6. Tezcan, I., Xu, W., Gurgey, A., Tuncer, M., Cetin, M., Oner, C., Yetgin, S., Ersoy, F., Aizencang, G., Astrin, K.H., and Desnick, R.J. (1998). Congenital erythropoietic porphyria successfully treated by allogeneic bone marrow transplantation. Blood *92*, 4053–4058.
7. Harada, F.A., Shwayder, T.A., Desnick, R.J., and Lim, H.W. (2001). Treatment of severe congenital erythropoietic porphyria by bone marrow transplantation. J. Am. Acad. Dermatol. *45*, 279–282.
8. Dupuis-Girod, S., Akkari, V., Ged, C., Galambrun, C., Kebaïli, K., Deybach, J.C., Claudy, A., Geburher, L., Philippe, N., de Verneuil, H., and Bertrand, Y. (2005). Successful match-unrelated donor bone marrow transplantation for congenital erythropoietic porphyria (Günther disease). Eur. J. Pediatr. *164*, 104–107.
9. Ged, C., Mendez, M., Robert, E., Lalanne, M., Lamrissi-Garcia, I., Costet, P., Daniel, J.Y., Dubus, P., Mazurier, F., Moreau-Gaudry, F., and de Verneuil, H. (2006). A knock-in mouse model of congenital erythropoietic porphyria. Genomics *87*, 84–92.
10. Bishop, D.F., Johansson, A., Phelps, R., Shady, A.A., Ramirez, M.C., Yasuda, M., Caro, A., and Desnick, R.J. (2006). 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.
11. Bishop, D.F., Clavero, S., Mohandas, N., and Desnick, R.J. (2011). Congenital erythropoietic porphyria: characterization of murine models of the severe common (C73R/C73R) and later-onset genotypes. Mol. Med. *17*, 748–756.
12. Robert-Richard, E., Moreau-Gaudry, F., Lalanne, M., Lamrissi-Garcia, I., Cario-André, M., Guyonnet-Dupérat, V., Taine, L., Ged, C., and de Verneuil, H. (2008). Effective gene therapy of mice with congenital erythropoietic porphyria is facilitated by a survival advantage of corrected erythroid cells. Am. J. Hum. Genet. *82*, 113–124.
13. Kohn, D.B., and Candotti, F. (2009). Gene therapy fulfilling its promise. N. Engl. J. Med. *360*, 518–521.
14. Hacein-Bey-Abina, S., Hauer, J., Lim, A., Picard, C., Wang, G.P., Berry, C.C., Martinache, C., Rieux-Laucat, F., Latour, S., Belohradsky, B.H., et al. (2010). Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. N. Engl. J. Med. *363*, 355–364.
15. Aiuti, A., Cattaneo, F., Galimberti, S., Benninghoff, U., Cassani, B., Callegaro, L., Scaramuzza, S., Andolfi, G., Mirolo, M., Brigida, I., et al. (2009). Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. N. Engl. J. Med. *360*, 447–458.
16. Gaspar, H.B., Cooray, S., Gilmour, K.C., Parsley, K.L., Zhang, F., Adams, S., Bjorkegren, E., Bayford, J., Brown, L., Davies, E.G., et al. (2011). Hematopoietic stem cell gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency leads to long-term immunological recovery and metabolic correction. Sci. Transl. Med. *3*, 97ra80.
17. Biffi, A., Aubourg, P., and Cartier, N. (2011). Gene therapy for leukodystrophies. Hum. Mol. Genet. *20* (R1), R42–R53.
18. Cavazzana-Calvo, M., Payen, E., Negre, O., Wang, G., Hehir, K., Fusil, F., Down, J., Denaro, M., Brady, T., Westerman, K., et al. (2010). Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β-thalassaemia. Nature *467*, 318–322.
19. Nathwani, A.C., Tuddenham, E.G., Rangarajan, S., Rosales, C., McIntosh, J., Linch, D.C., Chowdary, P., Riddell, A., Pie, A.J., Harrington, C., et al. (2011). Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. N. Engl. J. Med. *365*, 2357–2365.
20. Hacein-Bey-Abina, S., Garrigue, A., Wang, G.P., Soulier, J., Lim, A., Morillon, E., Clappier, E., Caccavelli, L., Delabesse, E., Beldjord, K., et al. (2008). Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. J. Clin. Invest. *118*, 3132–3142.
21. Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell *126*, 663–676.
22. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell *131*, 861–872.
23. Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science *318*, 1917–1920.
24. Park, I.H., Zhao, R., West, J.A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T.A., Lerou, P.H., Lensch, M.W., and Daley, G.Q. (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. Nature *451*, 141–146.
25. Raya, A., Rodríguez-Pizà, I., Guenechea, G., Vassena, R., Navarro, S., Barrero, M.J., Consiglio, A., Castellà, M., Río, P., Sleep, E., et al. (2009). Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. Nature *460*, 53–59.
26. Ye, L., Chang, J.C., Lin, C., Sun, X., Yu, J., and Kan, Y.W. (2009). Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in prenatal diagnosis in genetic diseases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *106*, 9826–9830.
27. Papapetrou, E.P., Lee, G., Malani, N., Setty, M., Riviere, I., Tirunagari, L.M., Kadota, K., Roth, S.L., Giardina, P., Viale, A., et al. (2011). Genomic safe harbors permit high β-globin

transgene expression in thalassemia induced pluripotent stem cells. Nat. Biotechnol. *29*, 73–78.
28. Xu, D., Alipio, Z., Fink, L.M., Adcock, D.M., Yang, J., Ward, D.C., and Ma, Y. (2009). Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *106*, 808–813.
29. Papapetrou, E.P., and Sadelain, M. (2011). Derivation of genetically modified human pluripotent stem cells with integrated transgenes at unique mapped genomic sites. Nat. Protoc. *6*, 1274–1289.
30. Chang, C.W., Lai, Y.S., Pawlik, K.M., Liu, K., Sun, C.W., Li, C., Schoeb, T.R., and Townes, T.M. (2009). Polycistronic lentiviral vector for "hit and run" reprogramming of adult skin fibroblasts to induced pluripotent stem cells. Stem Cells *27*, 1042–1049.
31. Robert-Richard, E., Lalanne, M., Lamrissi-Garcia, I., Guyonnet-Duperat, V., Richard, E., Pitard, V., Mazurier, F., Moreau-Gaudry, F., Ged, C., and de Verneuil, H. (2010). Modeling of congenital erythropoietic porphyria by RNA interference: A new tool for preclinical gene therapy evaluation. J. Gene Med. *12*, 637–646.
32. Kingsman, S.M., Mitrophanous, K., and Olsen, J.C. (2005). Potential oncogene activity of the woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element (WPRE). Gene Ther. *12*, 3–4.
33. Chung, J.H., Bell, A.C., and Felsenfeld, G. (1997). Characterization of the chicken beta-globin insulator. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *94*, 575–580.
34. Schmidt, M., Schwarzwaelder, K., Bartholomae, C., Zaoui, K., Ball, C., Pilz, I., Braun, S., Glimm, H., and von Kalle, C. (2007). High-resolution insertion-site analysis by linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR). Nat. Methods *4*, 1051–1057.
35. Woods, N.B., Parker, A.S., Moraghebi, R., Lutz, M.K., Firth, A.L., Brennand, K.J., Berggren, W.T., Raya, A., Izpisúa Belmonte, J.C., Gage, F.H., and Verma, I.M. (2011). Brief report: Efficient generation of hematopoietic precursors and progenitors from human pluripotent stem cell lines. Stem Cells *29*, 1158–1164.
36. Tsai, S.F., Bishop, D.F., and Desnick, R.J. (1987). Coupled-enzyme and direct assays for uroporphyrinogen III synthase activity in human erythrocytes and cultured lymphoblasts. Enzymatic diagnosis of heterozygotes and homozygotes with congenital erythropoietic porphyria. Anal. Biochem. *166*, 120–133.
37. Li, H., Collado, M., Villasante, A., Strati, K., Ortega, S., Cañamero, M., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2009). The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. Nature *460*, 1136–1139.
38. Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilić, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., et al. (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. Nat. Biotechnol. *26*, 1276–1284.
39. Itoh, M., Kiuru, M., Cairo, M.S., and Christiano, A.M. (2011). Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *108*, 8797–8802.
40. Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M.J., Ji, H., Ehrlich, L.I., et al. (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. Nature *467*, 285–290.
41. Kim, K., Zhao, R., Doi, A., Ng, K., Unternaehrer, J., Cahan, P., Huo, H., Loh, Y.H., Aryee, M.J., Lensch, M.W., et al. (2011). Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. Nat. Biotechnol. *29*, 1117–1119.
42. Géronimi, F., Richard, E., Lamrissi-Garcia, I., Lalanne, M., Ged, C., Redonnet-Vernhet, I., Moreau-Gaudry, F., and de Verneuil, H. (2003). Lentivirus-mediated gene transfer of uroporphyrinogen III synthase fully corrects the porphyric phenotype in human cells. J. Mol. Med. *81*, 310–320.
43. Aizencang, G., Solis, C., Bishop, D.F., Warner, C., and Desnick, R.J. (2000). Human uroporphyrinogen-III synthase: Genomic organization, alternative promoters, and erythroid-specific expression. Genomics *70*, 223–231.
44. Shady, A.A., Colby, B.R., Cunha, L.F., Astrin, K.H., Bishop, D.F., and Desnick, R.J. (2002). Congenital erythropoietic porphyria: Identification and expression of eight novel mutations in the uroporphyrinogen III synthase gene. Br. J. Haematol. *117*, 980–987.
45. Ged, C., Moreau-Gaudry, F., Richard, E., Robert-Richard, E., and de Verneuil, H. (2009). Congenital erythropoietic porphyria: Mutation update and correlations between genotype and phenotype. Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand) *55*, 53–60.
46. Hu, Z., Van Rooijen, N., and Yang, Y.G. (2011). Macrophages prevent human red blood cell reconstitution in immunodeficient mice. Blood *118*, 5938–5946.
47. Moreau-Gaudry, F., Mazurier, F., Bensidhoum, M., Ged, C., and de Verneuil, H. (1995). Metabolic correction of congenital erythropoietic porphyria by retrovirus-mediated gene transfer into Epstein-Barr virus-transformed B-cell lines. Blood *85*, 1449–1453.
48. Arumugam, P.I., Scholes, J., Perelman, N., Xia, P., Yee, J.K., and Malik, P. (2007). Improved human beta-globin expression from self-inactivating lentiviral vectors carrying the chicken hypersensitive site-4 (cHS4) insulator element. Mol. Ther. *15*, 1863–1871.
49. Robert-Richard, E., Richard, E., Malik, P., Ged, C., de Verneuil, H., and Moreau-Gaudry, F. (2007). Murine retroviral but not human cellular promoters induce in vivo erythroid-specific deregulation that can be partially prevented by insulators. Mol. Ther. *15*, 173–182.
50. Sadelain, M., Papapetrou, E.P., and Bushman, F.D. (2012). Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome. Nat. Rev. Cancer *12*, 51–58.

Résultats 3 :

Génération de cellules iPS murines : application à la thérapie génique de porphyries érythropoïétiques

Matériels et Méthodes

Dans le but de tester l'efficacité d'un protocole de thérapie génique des porphyries érythropoïétiques utilisant des cellules iPS, nous avons isolé des fibroblastes murins de modèles de PEC et PPE. Ces fibroblastes ont été transduits avec un vecteur thérapeutique puis reprogrammés en cellules iPS. Ces lignées iPS ont ensuite été caractérisées (pluripotence, différenciation), le vecteur de reprogrammation a été excisé puis les cellules iPS ont de nouveau été caractérisées. La différenciation hématopoïétique a été expérimentée selon plusieurs protocoles. Toutes les étapes du protocole sont résumées dans la figure 23.

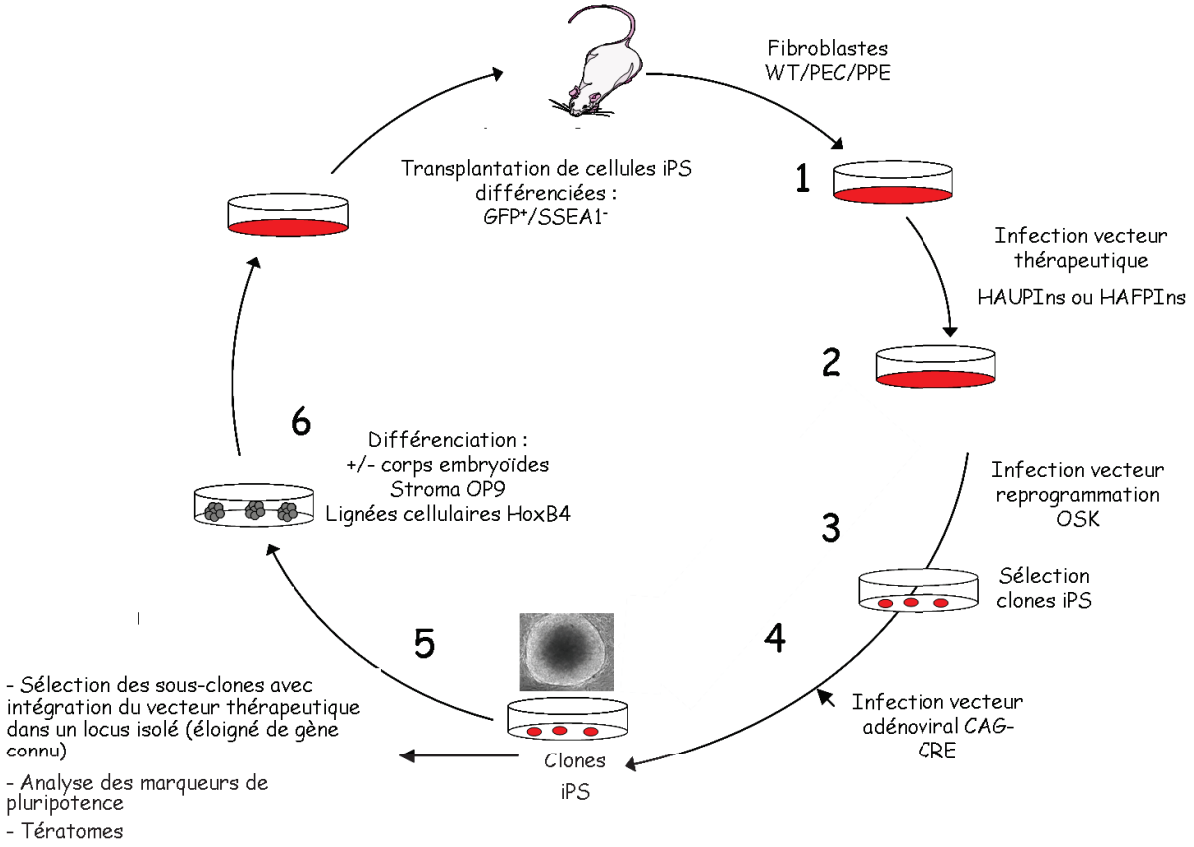


Figure 23. Protocole de thérapie génique des porphyries érythropoïétiques. Les différentes étapes sont indiquées par des chiffres et seront répétées au cours des chapitres Matériels et Méthodes et Résultats3.

1) Productions virales et vecteurs utilisés

Productions lentivirales

Les vecteurs viraux sont produits par cotransfection de cellules HEK 293T (Human Embryonic Kidney) avec trois plasmides : un plasmide codant pour le transgène d'intérêt, un plasmide codant pour les glycoprotéines d'enveloppe du virus de la stomatite vésiculeuse au

tropisme large et un plasmide codant pour les protéines de structure. Les cellules sont transfectées pendant 16 heures puis placées en milieu OPTIMEM-HEPES et P/S pendant 36 heures. Le surnageant viral est ensuite récupéré, centrifugé et filtré à 0,20µm avant d'être concentré par ultracentrifugation. Le titre viral est obtenu par transduction de cellules HEK 293T avec une concentration croissante de virus (préalablement dilué au 1/200ème) pendant 4 jours pour les vecteurs possédant un gène rapporteur type EGFP ou par un dosage de la protéine p24 par ELISA (vecteur viral sans gène rapporteur).

Vecteur de reprogrammation

Le vecteur de reprogrammation utilisé est un vecteur lentiviral polycistronique comprenant les séquences des ADNc de Oct3/4, Sox2 et Klf4 humains sous contrôle du promoteur du facteur d'élongation humain α - EF1α - (vecteur OSK, Chang *et al*. 2009). Ces transgènes sont séparés par des séquences peptides 2A provenant du teschovirus-1 porcin. Ces séquences lors de leur traduction, inhibent la liaison entre l'extrémité C-terminale du peptide naissant et l'acide aminé suivant. Elles permettent la traduction de plusieurs protéines à partir d'un seul ARNm (Figure 24). Le vecteur OSK possède également une séquence LoxP située dans sa séquence LTR en 3' qui, une fois répliquée en 5' lors du processus de rétrotranscription, permet une excision de ce vecteur par l'ajout de la recombinase CRE. Le vecteur est présenté en figure 25A.

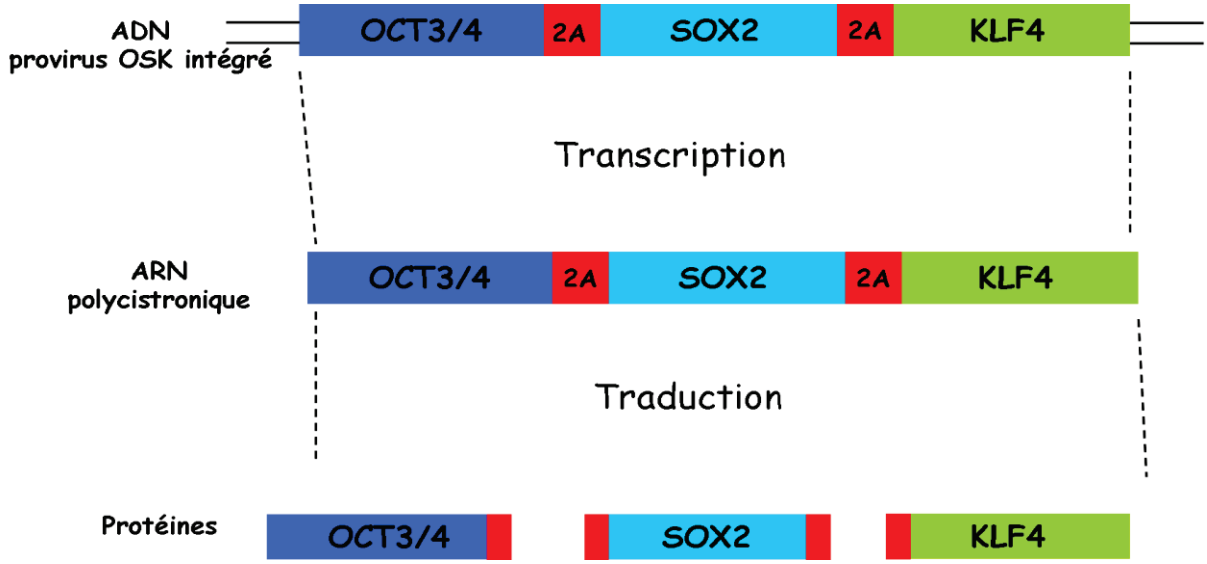


Figure 24. Traduction des protéines OCT3/4, SOX2 et KLF4 du vecteur de reprogrammation OSK. Le vecteur est transcrit en un ARN polycistronique contenant les séquences codantes pour les 3 protéines séparées par des séquences peptides 2A. Ces séquences, lors de la traduction, hydrolysent la liaison entre la fin du peptide naissant et l'ARN de transfert dans le site P du ribosome. Ils inhibent ainsi la liaison peptidique entre les protéines OCT3/4 et SOX2 par exemple. Le ribosome, ayant déjà commencé la traduction de la suite de l'ARNm, poursuit la traduction.

Vecteurs thérapeutiques

Les vecteurs thérapeutiques expriment l'ADNc de l'enzyme déficiente (UROS dans le cas de la PEC ou FECH pour la PPE, (ADNc humains, 1371pb et 1287pb respectivement). Ces transgènes sont placés sous le contrôle d'un enhancer/promoteur composé de la région activatrice de transcription (enhancer) de l'α-globine et du promoteur de l'ankyrine humaine (protéine du cytosquelette des érythrocytes) conférant un caractère érythroïde-spécifique à l'expression du transgène. Une séquence WPRE (Woodchuck hepatitis virus Posttranscriptional Regulatory Element) est placée après l'ADNc afin d'améliorer l'expression du transgène. Ces vecteurs lentiviraux ont une délétion de leur LTR au niveau du promoteur rétroviral U3 (vecteurs SIN) et contiennent dans leur LTR des régions isolatrices (isolateurs HS4). Un vecteur contrôle exprimant la GFP au lieu du transgène thérapeutique a également été utilisé. Ces vecteurs sont présentés en figure 25B.

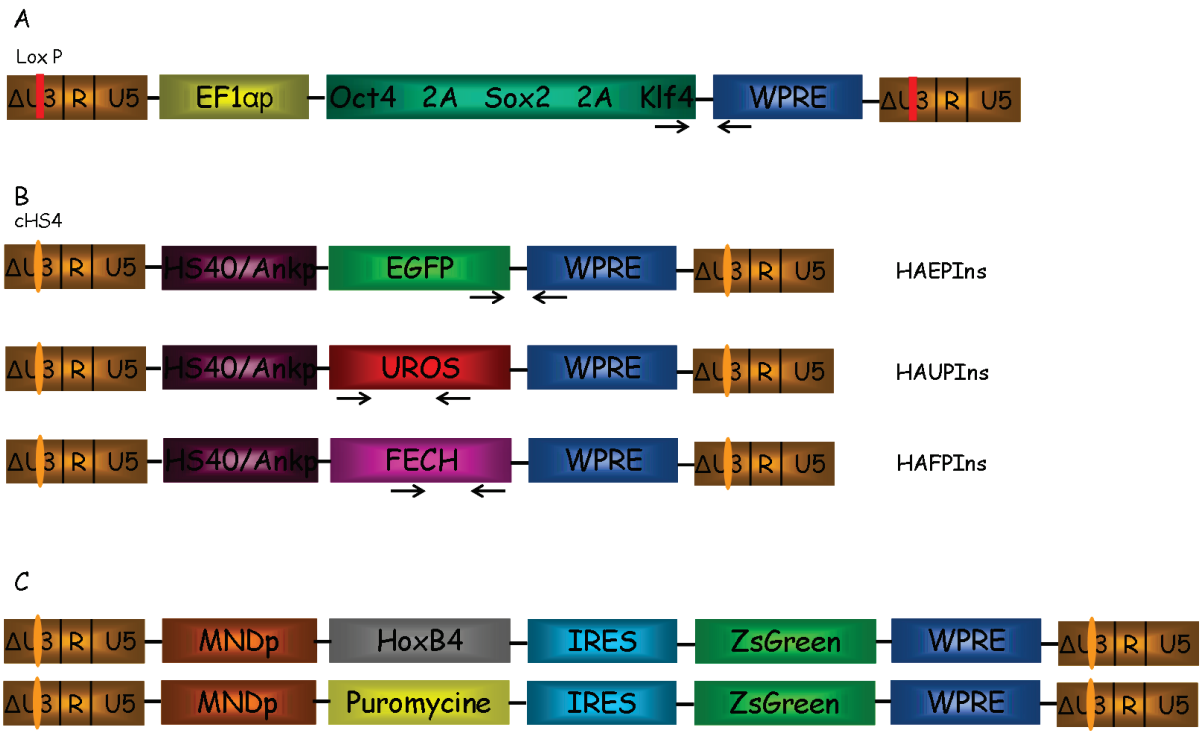


Figure 25. Schéma des provirus utilisés. **A)** Vecteur de reprogrammation OSK exprimant les facteurs de transcription Oct3/4, Sox2 et Klf4 flanqué par des séquences LoxP permettant son excision. **B)** Vecteurs SIN de correction génique (exprimant l'URO III synthase HAUPIns ou la ferrochélatase HAFPIns) et le vecteur contrôle (exprimant la GFP HAEPIns) sous contrôle d'un promoteur-enhancer permettant l'expression spécifique des transgènes dans les cellules érythroïdes. **C)** Vecteurs de différenciation (codant pour le facteur de transcription HoxB4) et contrôle (puromycine) sous contrôle d'un promoteur viral puissant (MND). Les vecteurs thérapeutiques et de différenciation comportent une séquence isolatrice cHS4 limitant les phénomènes de transactivation des promoteurs génomiques. Tous les vecteurs ont été vérifiés par séquençage avant leur utilisation. Les flèches noires placées sous les provirus représentent les amorces utilisées lors de la caractérisation des clones iPS.

2) Culture cellulaire et transductions

Préparation de fibroblastes murins – Etape 1

Les fibroblastes murins sont issus de souris BALB/c wild type (sauvage) ou de modèles de PEC ou de PPE décrits précédemment (Ged *et al*. 2006 ; Tutois *et al*. 1991). Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale. L'épiderme est aseptisé à l'éthanol 70° puis rasé au scalpel. La peau est ensuite coupée en fins morceaux disposés derme contre le plastique sur des plaques six puits scarifiées. Les morceaux de peau sont laissés sous la hotte, plaque ouverte, pendant trente minutes pour permettre l'adhésion des tissus au plastique. Puis, ils sont recouverts de quelques gouttes de milieu et placées à l'étuve pendant une nuit. Le milieu de culture des fibroblastes est composé de DMEM (4,5g/l de glucose), sérum de veau fœtal 20%, 100 U/ml de Pénicilline /Streptomycine (P/S) et amphotéricine B (0,5µg/ml). Le lendemain, ils sont totalement recouverts pour 24 heures supplémentaires (3ml de milieu par puits). Le milieu est ensuite changé tous les deux jours (pendant une semaine environ). Lorsque les cellules sont confluentes, les fibroblastes sont récupérés par action de la trypsine.

Génération de lignées de cellules iPS – Etape 2 et 3

Les fibroblastes d'intérêt sont ensemencés à ~500 cellules/cm² et infectées sur une nuit avec le vecteur lentiviral de reprogrammation OSK. Le lendemain matin, le milieu des cellules est changé. La transduction des fibroblastes WT s'est faite avec un vecteur concentré et titré par dosage de la protéine virale p24. Quatre conditions de transductions ont été utilisées : des fibroblastes contrôles non transduits, puis transduits à MOI de 10, 30 et 100 (Figure 26A). Les protocoles de reprogrammation suivants (cellules PEC et PPE) ont été effectués avec une préparation virale non concentrée (Figure 26B). Dans le cas des fibroblastes déficients, la transduction avec le vecteur thérapeutique s'effectue le jour précédent celle du vecteur OSK. Le jour suivant la dernière transduction, les fibroblastes sont décollés à la trypsine et réensemencés sur une boîte 10cm (préalablement recouverte de gélatine à 0,2%) en milieu ES : DMEM GLUTAMAX (4,5g/L de glucose), 15% de SVF non décomplémenté (remplacé par du Knock Out Serum Remplacement (KOSR) pour les expériences sur les fibroblastes PEC), P/S 100U/ml, bêta-mercaptoéthanol (0,1mM), amphotéricine (0,5µg/ml), acides aminés non essentiels 1X et LIF (10ng/ml). Le milieu est changé quotidiennement. Les colonies iPS apparaissent environ le 30ème jour après la transduction avec le vecteur OSK.

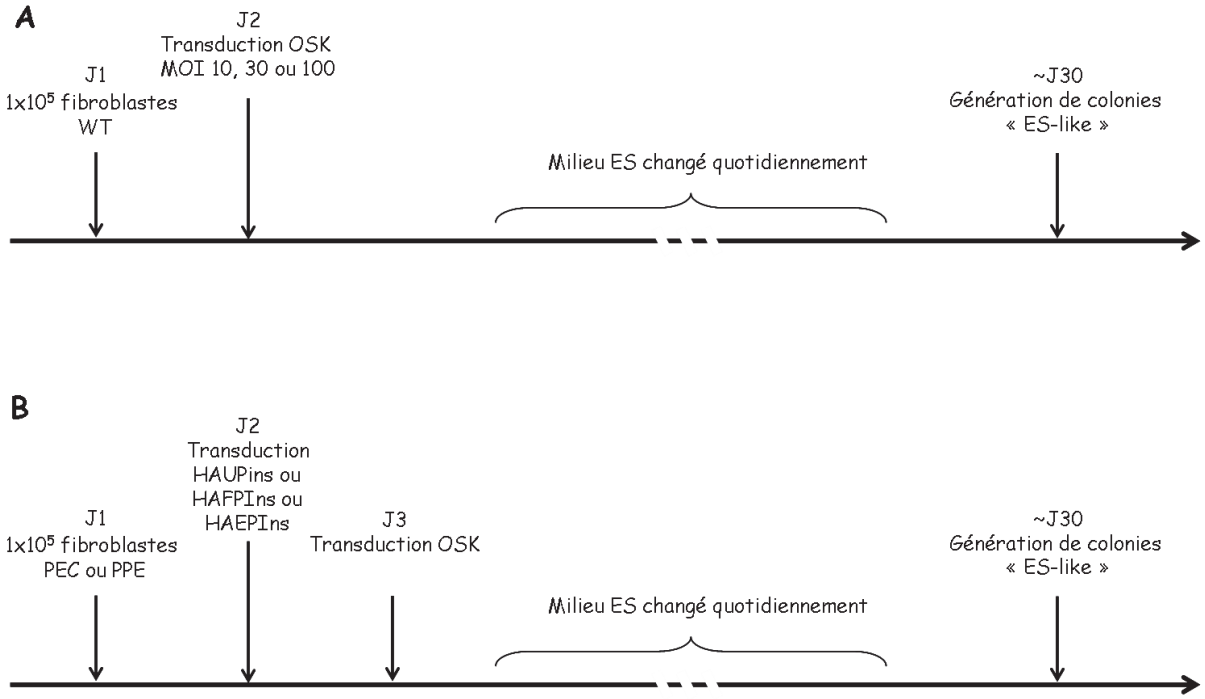


Figure 26. Protocoles de reprogrammation de fibroblastes murins WT (**A**) ou porphyriques (PEC ou PPE en **B**) en cellules pluripotentes induites (iPS).

Elles sont repiquées manuellement sous microscope et cultivées sur boîte couvertes de gélatine. Les cellules sont passées environ tous les 3 jours. Pour cela, le milieu est enlevé, les cellules sont lavées au PBS, détachées par une incubation dans de la trypsine et réensemencées sur des boîtes de culture recouvertes de gélatine.

Excision du vecteur de reprogrammation – Etape 4

Après une première caractérisation, les cellules iPS sont transduites avec un adénovirus exprimant la recombinase CRE sous contrôle d'un promoteur CAG (combinaison d'un élément early enhancer du cytomégalovirus (CMV) et du promoteur de la bêta actine de poulet). Cette recombinase permet l'excision du vecteur de reprogrammation au niveau des séquences LoxP situées dans les LTR du vecteur OSK (cf. Figure 13). Les cellules sont infectées plusieurs fois à faible MOI et sous-clonées par un ensemencement à très faible densité (environ 20 cellules/cm²). Le milieu de culture est changé quotidiennement. Après une semaine de culture, les clones isolés sont repiqués. Une PCR permet de déterminer la présence du vecteur de reprogrammation OSK. Les clones négatifs sont à nouveau caractérisés (RT-PCR, immunofluorescence et activité de la phosphatase alcaline).

3) Caractérisation des iPS murines – Etape 5

Marquage de l'activité phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline est une protéine exprimée par les cellules embryonnaires (même si d'autres types cellulaires partage cette expression : cellules hépatiques, rénales, certaines lignées tumorales…). Son expression est considérée comme un des critères de pluripotence de cellules iPS. Son activité est révélée par une coloration rouge lors de l'incubation des cellules avec une solution alcaline de naphtol (Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit, Sigma Aldrich).

PCR et RT-PCR

L'intégration du vecteur OSK dans le génome des lignées iPS est déterminée par PCR et RT-PCR semi-quantitative. L'expression des gènes marqueurs de pluripotence est également testée par RT-PCR : *OCT4*, *ESG1*, *CRIPTO*, *ERAS*, *c-MYC*.
Lors de la différenciation *in vitro*, les corps embryoïdes sont récupérés à J6 et leurs ARNm sont extraits. Une RT-PCR permet de déterminer l'expression des gènes marqueurs de différenciation : *BRACHYURY* (mésoderme), *NESTIN* (ectoderme), *ALPHA-FOETOPROTEINE* (endoderme). La protéine BRACHYURY est un facteur de transcription impliqué, lors du développement embryonnaire, dans la mise en place de l'axe antéro-postérieur et dans la différenciation mésodermique (Lartillot *et al*. 2002 ; Marcellini *et al*. 2003). La protéine NESTIN est une protéine du filament intermédiaire de type IV. Elle est exprimée dans les premières étapes du développement du système nerveux central (Michalczyk et Ziman, 2005). La protéine ALPHA-FOETOPROTEINE est une protéine plamatique produite par le foie durant le développement fœtal (Tomasi, 1977). Elle se lie aux
L'expression du gène codant pour la GAPDH est utilisée comme référence pour toutes les RT-PCR.
Les amorces utilisées sont listées dans le tableau 10.

Transgène amplifié / Expérience	Intitulé de l'amorce	Séquences	Tm (°C)
OSK	OSKF	GATGAACTGACCAGGCACTA	60
	OSKR	CTCGAGGGAATTCCGATAA	47,3
EGFP	HAEF	ACATGGTCCTGCTGGAGTTC	60,12
	HAER	GCATTAAAGCAGCGTATCCA	58,94
FECH	Fech F	CATGGAGGTGGAAGTCAGGT	62
	Fech R	GCTTCCGTCCCACTTGATTA	60
UROS	UROSF	TGCGAAGGAAGATGACTGTG	58,4
	UROSR	ATGTGAGGCCAGAGGGACTA	60,5
mOct4 (endogène)	mOct4F	TCTTTCCACCAGGCCCCCGGCTC	59,1
	mOct4R	TGCGGGCGGACATGGGGAGATCC	59,1
Cripto	CriptoF	ATGGACGCAACTGTGAACATGATGTTCGCA	56,5
	CriptoR	CTTTGAGGTCCTGGTCCATCACGTGACCAT	59,3
ERas	ERasF	ACTGCCCCTCATCAGACTGCTACT	54
	ERasR	CACTGCCTTGTACTCGGGTAGCTG	55,7
Esg-1	Esg1F	GTCTGGTTCCTTGGCAGGAT	62
	Esg1R	ACTCGATACACTGGCCTAGC	62
c-Myc	MycF	TGACCTAACTCGAGGAGGAGCTGGAATC	57,8
	MycR	AAGTTTGAGGCAGTTAAAATTATGGCTGAAGC	54,2
GAPDH	GAPDHF	ACCACAGTCCATGCCATCAC	62
	GAPDHR	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	62
Nestin	NesF	ACTGGCACACCTCAAGATGT	60
	NesR	CAAGGGTATTAGGCAAGGGG	62
Brachyury	BraF	GTGACTGCCTACCAGAATGA	60
	BraR	ATTGTCCGCATAGGTTGGAG	60
α-féto-protéine	AfpF	CAGAAACACATCGAGGAGAG	60
	AfpR	TTAAACGCCCAAAGCATCAC	58
LAM-PCR	Ins-F	ACGCTTCTCGCTGCTCTTTGA	61,2
	LC1	GACCCGGGAGATCTGAATTCAGTGGCACAGTTAGG	77,6
	LC3	AATTCCTAACTGCTGTGCCACTGAATTCAGATC	71,3
	LTRI	[Btn]GAGCTCTCTGGCTAACTAGG	60,5
	LCI	GACCCGGGAGATCTGAATTC	60,5
	LTRII	[Btn]AGCTTGCCTTGAGTGCTTCA	58,4
	LCII	AGTGGCACAGCAGTTAGG	56,3
	LTRIII	AGTAGTGTGTGCCCGTCTGT	60,5
qPCR	UROS. F	GGAAGCAGCAGAGTTATGTTTGGA	63,6
	UROS.R	ACATACACTGACTTGGCATTCCATT	62,5
	UROS.probe	ACCTTTCCCAGACTTCA	49,9
	EGFP.F	GCGCACCATCTTCTTCAAGG	60,5
	EGFP.R	GTGTCGCCCTCGAACTTCAC	62,5
	EGFP.Probe	CGGCAACTACAAGACCC	54,9
	Mouse-bactin.F	GACCCTGAAGTACCCCATTGAAC	64,6
	Mouse-bactin.R	CACGCAGCTCATTGTAGAAGGT	62,1
	Mouse-bactin.Probe	CCACATGGGACGACATG	54,9

Tableau 10. Liste des amorces utilisées lors de la caractérisation des lignées iPS générées.

Immunofluorescence

Les cellules iPS sont ensemencées en plaque 24 puits à 50 000 cellules par puits. Après 3 jours de culture, les cellules sont fixées au formaldéhyde 1,5%, perméabilisées avec une solution de PBS/Triton X-100 (0,5%) et incubées dans un solution d'anticorps dirigés contre OCT3/4, SSEA1 (Mouse, Santa Cruz BioTechnologies, Santa Cruz, USA) ou NANOG (Rabbit, Abcam, Cambridge, USA) pendant 1 heure à température ambiante ou à 4°C sur la nuit. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois au PBS. Les anticorps secondaires (Goat anti-rabbit ou chicken anti-mouse Alexa Fluor 488, Invitrogen) sont également incubés pendant 1 heure à température ambiante à l'obscurité. Un milieu de montage contenant du DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) est utilisé pour l'observation des marquages au microscope (Vectorshield meduim mouting H-1200, Vector Labs). Les photos des cellules et des marquages ont été prises sur un microscope à fluorescence Nikon Eclipse T*i* à l'aide du logiciel Nis Elements BR (Nikon, Japon).

Cytométrie en flux

Toutes les acquisitions sont effectuées sur un cytomètre en flux FACS Canto II (Becton Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, USA). Les analyses se sont faites sur le logiciel BD FACS Diva.

Corps embryonnaires et tératomes

La pluripotence des cellules iPS est évaluée *in vitro* par la formation spontanée de corps embryonnaires. Pour cela, les cellules sont détachées de la boîte par incubation dans une solution de trypsine, lavées et réensemencées en boîte non gélatinée et non traitée dans un milieu de culture de cellules ES et sans LIF. L'expression de gènes marqueurs de chaque feuillet embryonnaire est caractérisée par RT-PCR après 6 jours de culture (Nestin, Brachyury, Alpha-fœtoprotéine - Tableau 10).

Pour tester la pluripotence des cellules iPS *in vivo*, elles sont détachées par action de la trypsine, lavées et un million de cellules sont implantées par voie sous-cutanée dans des souris NOG immunodéficientes. Environ 1 mois plus tard, les tératomes formés sont fixés au formol, déshydratés et inclus en paraffine avant d'être coupés au microtome (coupes de 4µm).

Les coupes sont colorées à l'hématoxyline/éosine ainsi qu'au bleu Alcian. Le Pr Dubus a scanné numériquement et analysé toutes les coupes. Il a pratiqué l'analyse histologique et distingué les différents types de tissus (endoderme, mésoderme et ectoderme).

Caryotypes

Les caryotypes sont effectués en collaboration avec l'Institut Clinique de la Souris (Strasbourg).

LAM-PCR

La recherche des sites d'intégration du vecteur thérapeutique dans les lignées iPS PEC s'est faite par LAM-PCR (Linear Amplification-Mediated-Polymerase Chain Reaction). Cette technique consiste à séquencer les portions de génome flaquant les LTR du vecteur lentiviral. Les amorces ont été élaborées afin de cibler spécifiquement le transgène thérapeutique (cf. Tableau 10). Brièvement, une PCR est pratiquée en utilisant l'amorce LTRI biotinylée sur 100ng d'ADN. L'ADN synthétisé est capturé par une incubation avec des billes magnétiques. Après synthèse du brin complémentaire, l'ADN est digéré par l'enzyme de restriction Tsp509I. Une cassette formée des amorces LC1 et LC3 est liguée aux extrémités des fragments d'ADN. L'ADN est ensuite dénaturé et les fragments non biotinylés sont récupérés pour pratiquer une PCR nichée avec les amorces LTRII et LCI. Une deuxième PCR nichée est effectuée avec les amorces LTRIII et LCII (Figure 27). Ces fragments PCR sont ensuite clonés dans un T-Vecteur, séquencés (plateforme de séquençage de l'université Bordeaux 2) et analysés par BLAST avec le génome murin. Les intégrations provirales proches d'un proto-oncogène connu ou d'un gène identifié sont écartées afin de réduire le risque de mutagenèse insertionnelle.

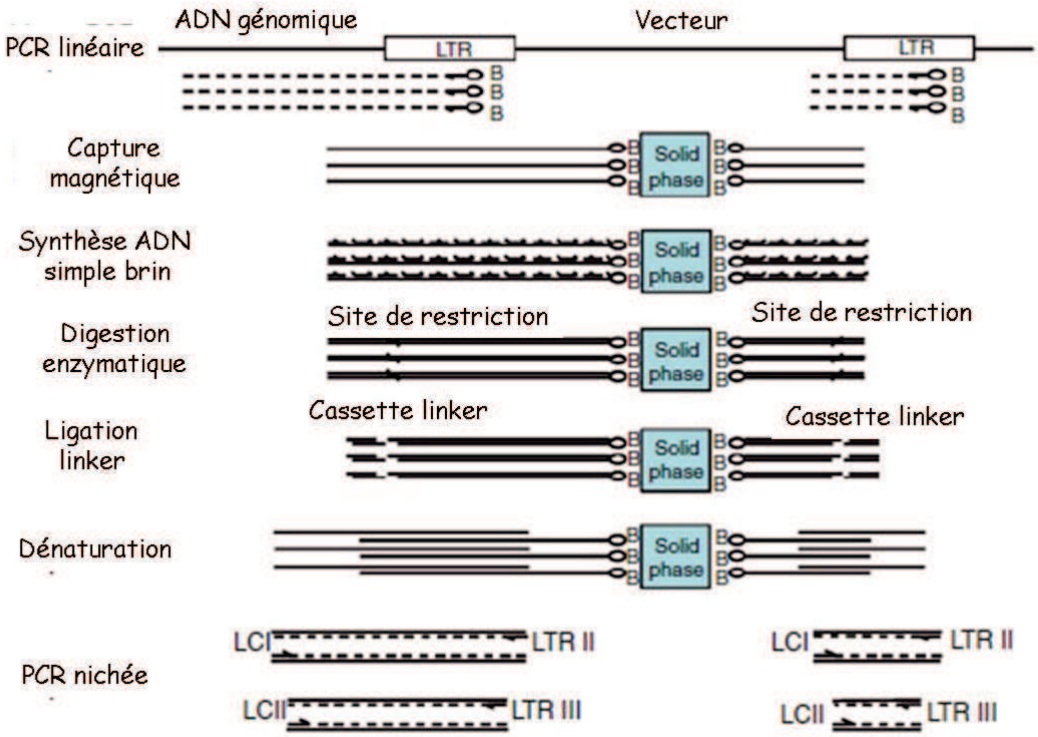


Figure 27. Représentation schématiques des étapes de la LAM-PCR (D'après Schmidt *et al*. 2007)

4) Protocoles de différenciation hématopoïétique –Etape 6

Après avoir excisé les facteurs de reprogrammation et caractérisé la pluripotence de nos lignées iPS, l'étape suivante consiste à les différencier en progéniteurs hématopoïétiques utilisables pour une greffe dans les modèles de souris porphyriques. Nous avons pour cela testé l'efficacité de deux protocoles décrits dans la littérature : une différenciation directe des cellules iPS sur un stroma OP9 et une différenciation des cellules iPS en passant par une étape de corps embryoïdes puis une culture sur stroma OP9.

A - Le premier, publié par Seiler et collaborateurs en 2011, consiste à ensemencer les cellules pluripotentes (ES ou iPS) sur un stroma de cellules OP9 confluentes à faible densité cellulaire (1250 cellules/ml) dans une plaque 6 puits en milieu de culture OP9 (α-MEM, 20% SVF, P/S). Les cellules OP9 (ATCC) sont une lignée de cellules issues de la calotte crânienne de souris op/op possédant une mutation sur le gène codant pour le M-CSF. Elles ne produisent donc pas de M-CSF fonctionnel qui est délétère pour toute autre différenciation que celle en macrophage. Cinq jours plus tard, les cellules sont décollées, comptées et réensemencées sur un nouveau stroma OP9 confluent à 70 000 cellules/ml en milieu OP9 complété avec les

cytokines mSCF (Stem Cell Factor murin, 10ng/ml) et mFlt3-L ((Fms-related Tyrosine kinase 3-Ligand murin, 10ng/ml) (toutes les cytokines utilisées proviennent de PeproTech, Rocky Hill, USA). Les cellules sont récupérées à J10 pour analyse par cytométrie en flux et culture en milieu semi-solide (méthylcellulose) (Seiler *et al*. 2011 et Figure 28A).

B - Le deuxième protocole consiste à former des corps embryoïdes avec les cellules pluripotentes et à les conserver en culture pendant 6 jours (milieu ES - LIF). Les corps embryoïdes sont ensuite passés sur un filtre 0,45µm pour se débarrasser des cellules isolées et mortes. Les corps embryoïdes sont dissociés à la trypsine (préalablement chauffée à 37°C) et centrifugés. Les cellules sont comptées, infectées avec le vecteur HoxB4 et ensemencées à 100 000 cellules sur un stroma de cellules OP9 confluentes en milieu IMDM, SVF10%, mSCF (100ng/ml), mFlt3-L (100ng/ml), hTPO (40ng/ml) et hVEGF (40ng/ml) (Hanna *et al*. 2007).

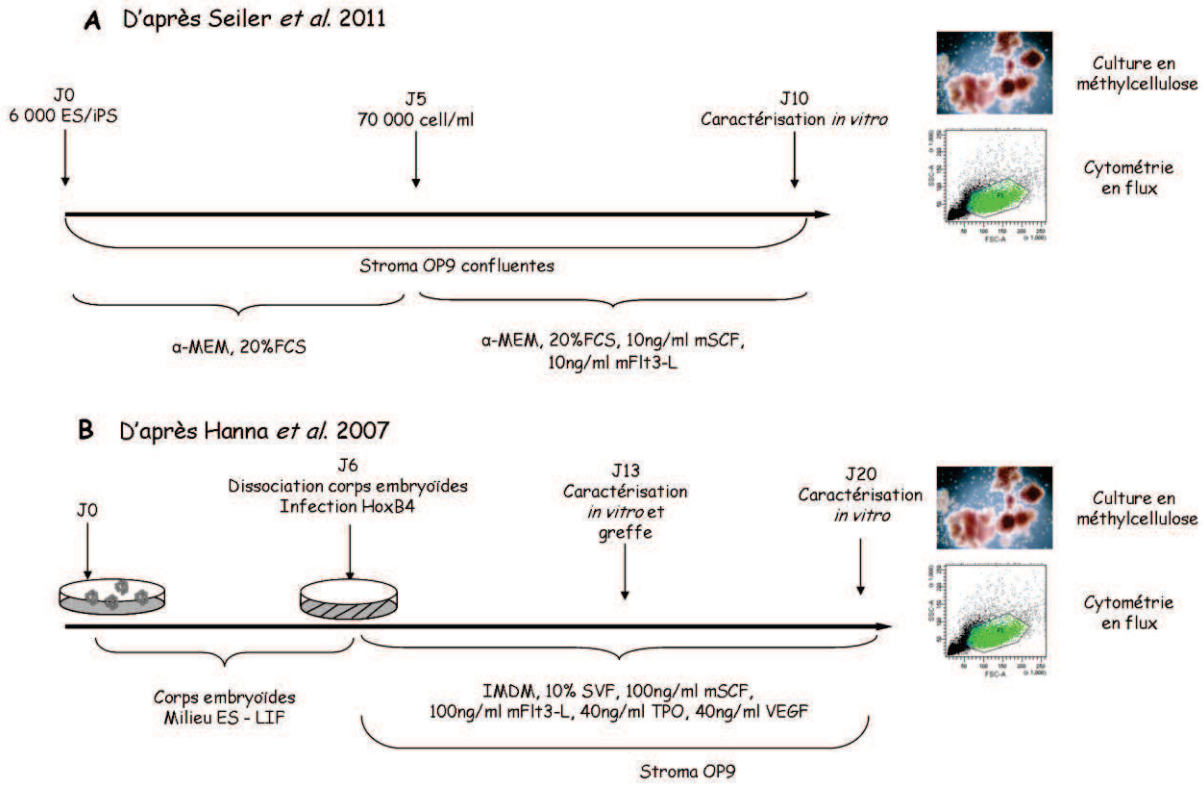


Figure 28. Protocoles de différenciation. **A**) Issu de Seiler *et al*. 2011. Ce protocole ne nécessitant pas la formation de corps embryoïdes. **B**) Issu de Hanna *et al*. 2007. Ce protocole débute la différenciation par la formation de corps embryoïdes pendant 6jours.

La mortalité causée par la dissociation des corps embryoïdes étant très importante, les transductions post-dissociation étaient peu efficaces. Des lignées iPS transduites avec le vecteur HoxB4 ont donc ensuite été générées afin de poursuivre le protocole sans étape de transduction. Après sept jours de culture, les cellules sont trypsinées et incubées avec des

anticorps dirigés contre le CD45, CD41, SSEA1 ou VEGFR2 (= Flk-1) (20 minutes à 4°C). Après un lavage, les cellules sont passées au cytomètre en flux. Une partie des cellules est remise en culture sur de nouvelles OP9. Sept jours plus tard, les cellules sont de nouveau analysées *in vitro* (Figure 28B).

Le vecteur lentiviral exprimant le facteur de transcription mésodermique HoxB4 (ADNc humain, 756pb). Le transgène est sous contrôle du promoteur viral MND (promoteur synthétique composé l'association de la région U3 du LTR du virus Moloney de la leucémie murine MoMuLV et de l'enhancer du virus de sarcome myéloprolifératif et dont la région de contrôle négatif a été excisée, Li *et al*. 2010). La ZsGreen, protéine émettant une fluorescence dans le vert, est placée en aval d'une séquence IRES (Internal Ribosome Entry Site) permettant l'expression simultanée des deux transgènes. Le même vecteur mais comportant le gène de résistance à la puromycine à la place du transgène HoxB4 a servi de contrôle dans une expérience de différenciation (Figure 25).

Résultats

I- Génération de cellules iPS à partir de fibroblastes murins – Etapes 1 à 3

Les 10 premiers jours après la transduction avec le vecteur de reprogrammation OSK, les fibroblastes poussent et envahissent la boîte jusqu'à la confluence. Puis vers le 30ème jour, des colonies cellulaires se forment très rapidement (en quelques jours). Elles sont rondes au bord lisse. Les colonies ont une structure en relief, sont dense et composées de petites cellules (Figure 29). Après 40 jours de culture, une colonie est apparue et repiquée dans la condition MOI 30 et 6 colonies dans la condition MOI 100 sur 100 000 fibroblastes WT transduits (soit une efficacité de reprogrammation de 0,001% et 0.006% respectivement). Une nouvelle expérience de reprogrammation sur fibroblastes murins WT a permis d'obtenir 12 colonies iPS sur 200 000 cellules transduites (0,006% d'efficacité de reprogrammation). Selon le même protocole, des colonies iPS ont été obtenues à partir de fibroblastes issus de souris PPE et CEP avec une efficacité plus importante vraisemblablement due à une meilleure qualité du lot de virus et au changement de sérum (KOSR remplaçant un sérum spécial cellule ES dans le cas des cellules PEC). 54 colonies ont été obtenues lors de la reprogrammation de fibroblastes PPE (0,054% d'efficacité de reprogrammation) et une centaine de colonies dans le cas des fibroblastes PEC (~0,1% d'efficacité de reprogrammation). Nous montrons donc qu'il est possible de générer des cellules ES-like à partir de fibroblastes déficients en uroporphyrinogène III synthase ou en ferrochélatase avec une efficacité de reprogrammation proche de celles décrites dans la littérature (Takahashi et Yamanaka, 2006).

Une nomenclature spécifique est appliquée aux clones ES-like dérivés. Le nom d'un clone est constitué de lettres représentant les fibroblastes d'origine (« WT » pour les clones iPS issus de fibroblastes sauvages, « U » pour ceux issus de fibroblastes PEC et « F » pour ceux provenant de fibroblastes PPE) et d'un chiffre correspondant au numéro du clone. Un deuxième chiffre est ajouté pour distinguer les sous-clones obtenus après excision du vecteur OSK. Les clones iPS infectés avec le vecteur contrôle (GFP) sont annotés avec deux lettres : la première faisant référence aux fibroblastes d'origine (U pour PEC et F pour PPE), suivi d'un « E » pour EGFP.
Exemple : le clone WT1.2 est le 2ème sous-clone iPS excisé provenant de la 1ère lignée iPS issue de fibroblastes WT.

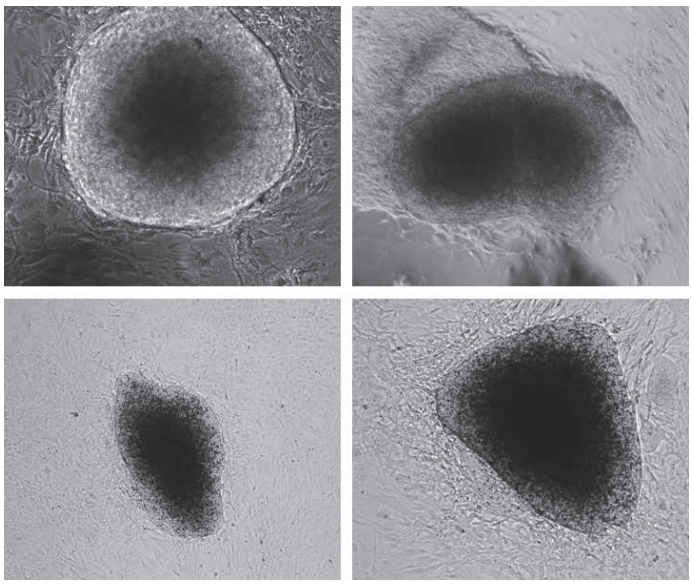


Figure 29. Colonies iPS apparues environ 30 jours après transduction du vecteur de reprogrammation OSK. Les colonies sont rondes, au bord bien définis et très denses. La morphologie est très différente des fibroblastes non reprogrammés situés sur les bords des colonies. (x10)

II- Caractérisation des lignées iPS dérivées de fibroblastes murins

Les clones « ES-like » sont caractérisés afin de prouver la pluripotence de ces cellules.

Les cellules iPS expriment des marqueurs de pluripotence

Afin de démontrer le caractère embryonnaire des clones « ES-like » obtenus, un test d'activité de la phosphatase alcaline a été pratiqué. Les fibroblastes, cellules différenciées, n'expriment pas cette enzyme et ne montrent aucune coloration. Les cellules ES et les clones d'intérêt révèlent une coloration rouge spécifique de l'activité de la phosphatase alcaline. Tous les clones iPS testés (WT, PEC et PPE) étaient positifs pour ce test (Figure 30).

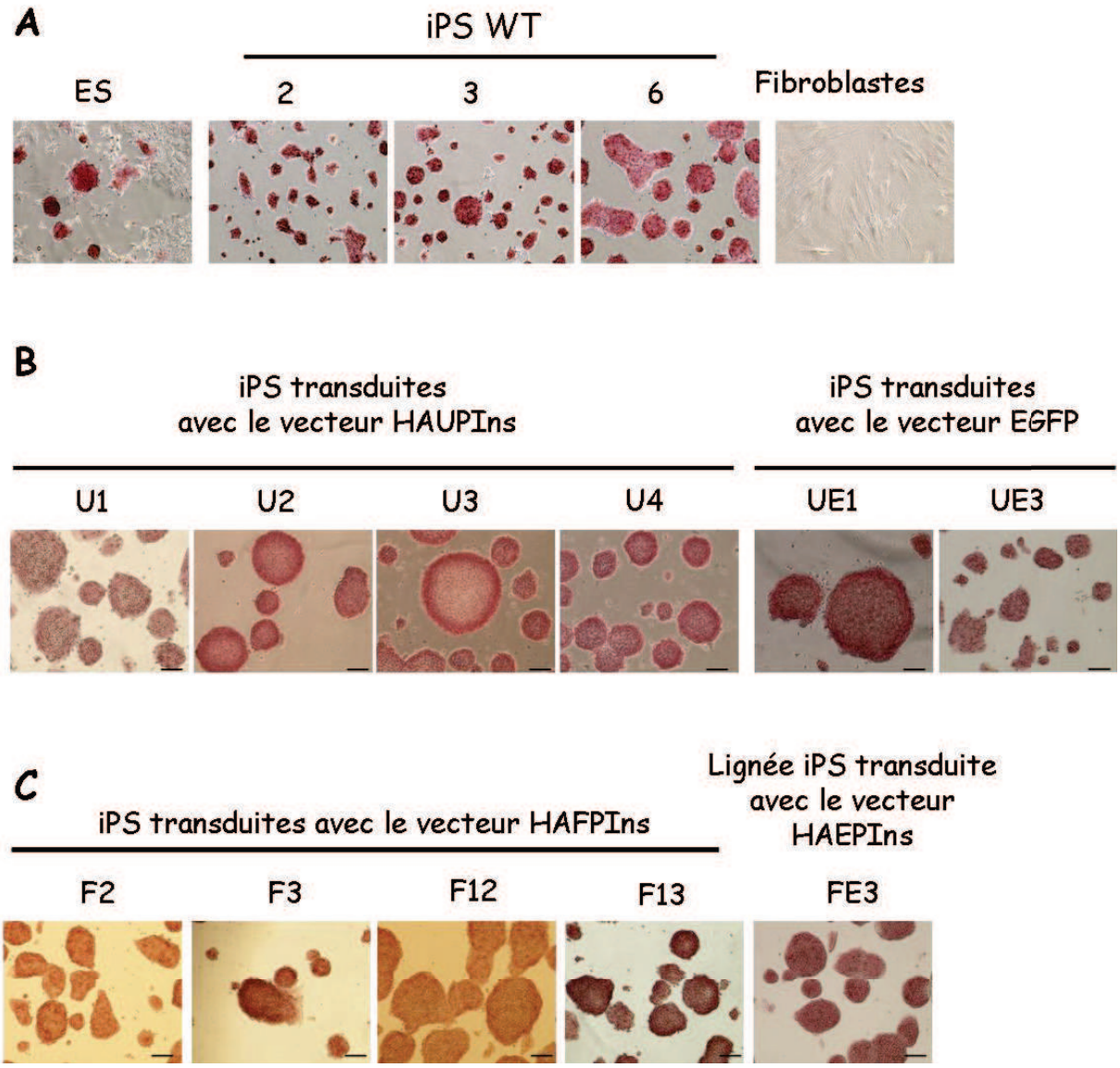
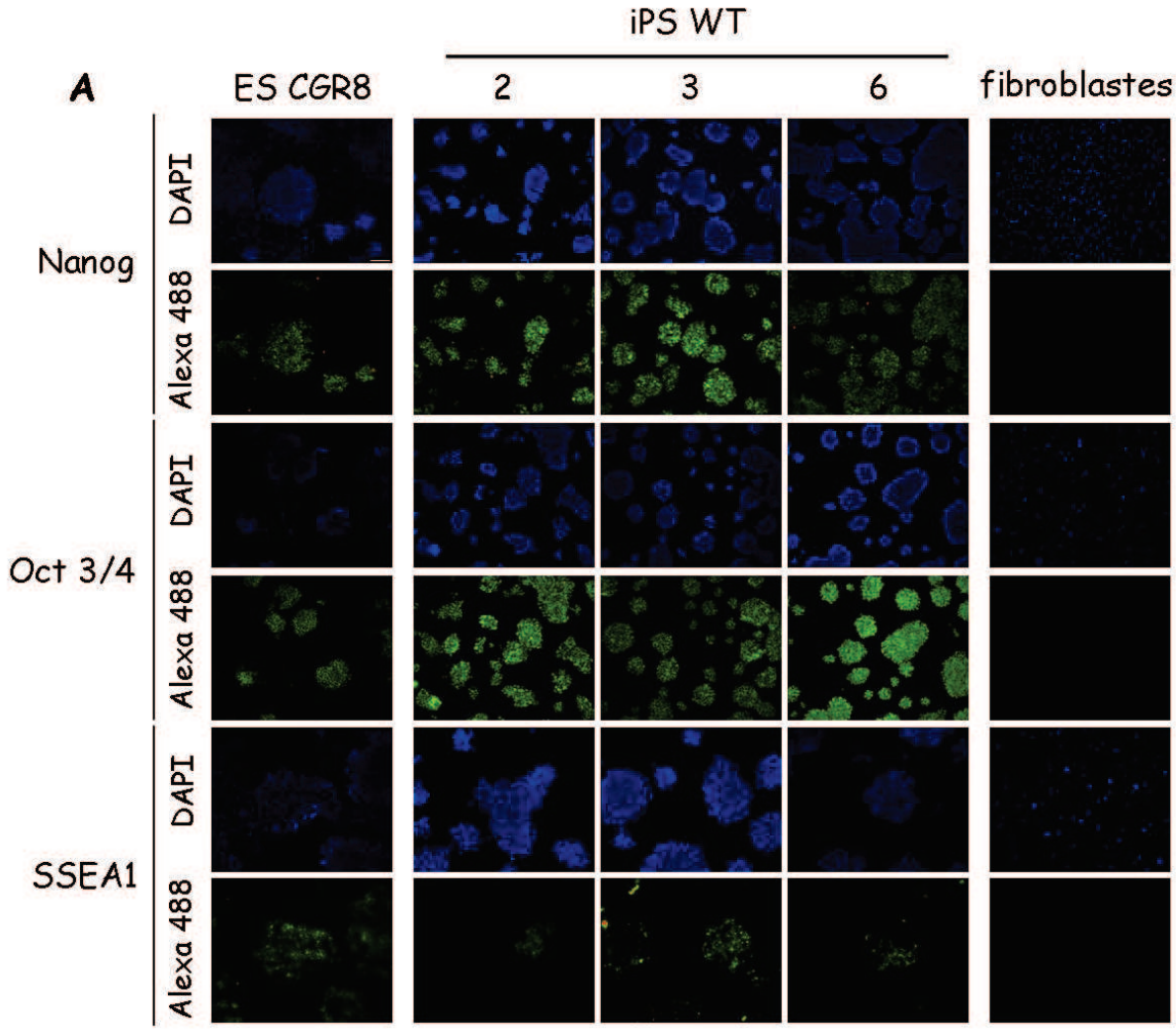
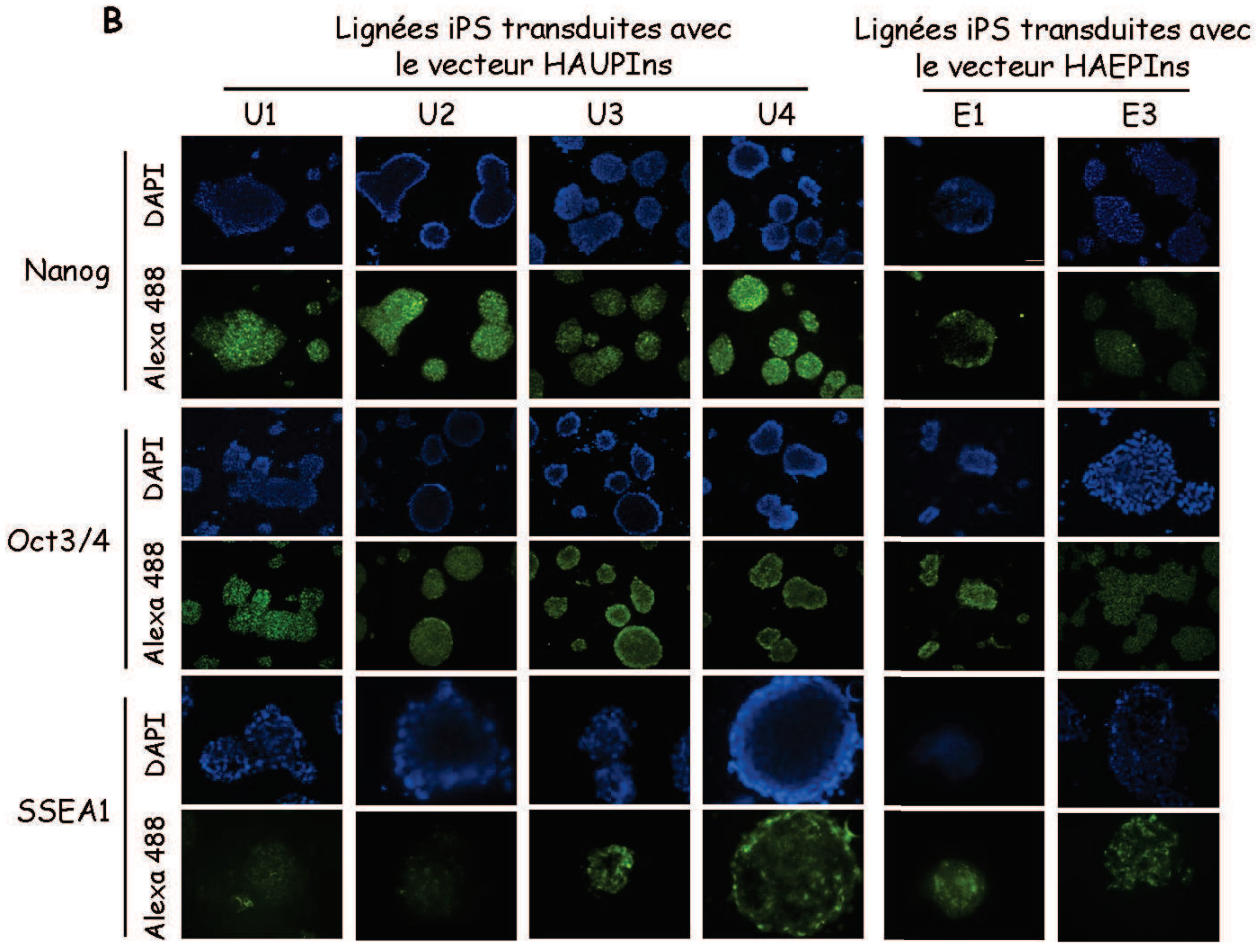


Figure 30. Révélation de l'activité phosphatase alcaline dans les lignées iPS générées. **A)** Lignées iPS issues de fibroblastes WT. Toutes les lignées iPS expriment la phosphatase alcaline tout les cellules ES (contrôle positif). Les fibroblastes d'origine, en tant que cellules différenciées, servent de contrôle négatif. **B)** Les lignées iPS issues de fibroblastes PEC expriment toutes la phosphatase alcaline. **C)** Un résultat identique a été obtenu dans le cas des lignées iPS dérivées de fibroblastes PPE où toutes les lignées se sont révélées positives pour ce marqueur de pluripotence. (Echelle : 100µm)

Les clones sont testés pour l'expression des marqueurs embryonnaires OCT4, NANOG et SSEA1 par immunofluorescence. Les fibroblastes, cellules différenciées, n'expriment aucun des 3 marqueurs (marquage contrôle avec le DAPI). Les différentes lignées WT, PPE et PEC expriment toutes OCT4, NANOG et SSEA1. L'expression de Oct4 endogène est présent mais indiscernable de celle assurée par le vecteur OSK intégré au génome des cellules. Mais les protéines NANOG et SSEA1 sont exprimées de manière endogène uniquement. Leur expression suggère la reprogrammation des fibroblastes en cellules pluripotentes (Figure 31).


iPS WT
A
ES CGR8
2
3
6
fibroblastes
Nanog
Oct 3/4
SSEA1
DAPI
Alexa 488
DAPI
Alexa 488
DAPI
Alexa 488


B
Lignées iPS transduites avec le vecteur HAUPIns
Lignées iPS transduites avec le vecteur HAEPIns
U1
U2
U3
U4
E1
E3
Nanog
Oct3/4
SSEA1
DAPI
Alexa 488

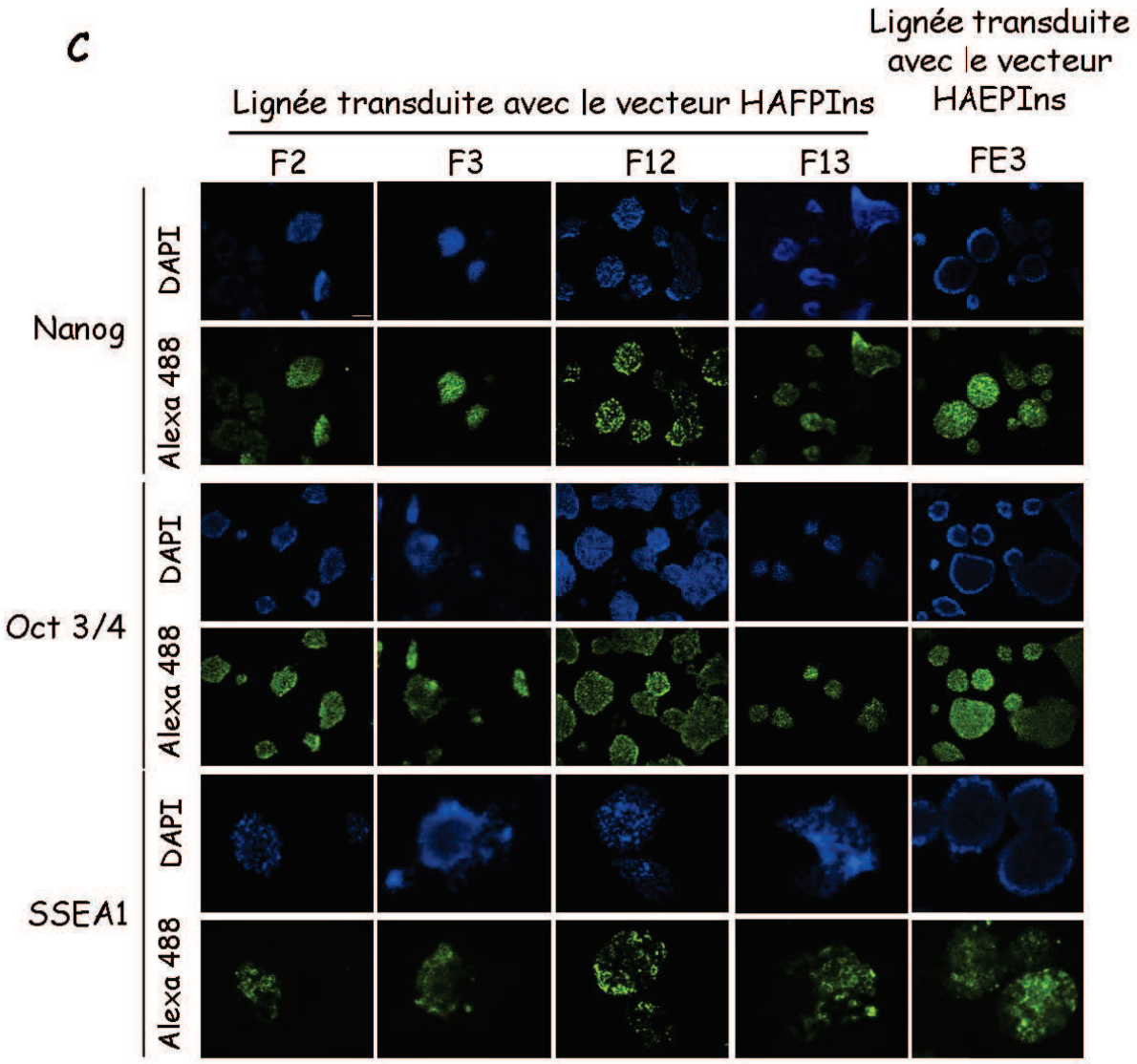


Figure 31. Expression des marqueurs de pluripotence NANOG, OCT3/4 et SSEA1 dans les lignées iPS générées. Toutes les lignées pluripotentes (ES et iPS) testées expriment les différents marqueurs de pluripotence. Les fibroblastes, en tant que cellules différenciées, servent de contrôle négatif. **A)** Lignées iPS WT. **B)** Lignées iPS PEC. **C)** Lignées iPS PPE. Echelle : 100µm.

Une PCR permet de vérifier que les clones possèdent bien le vecteur de reprogrammation OSK. La reprogrammation s'effectue donc exclusivement dans les cellules infectées et ne proviennent pas d'une contamination avec d'autres cellules pluripotentes (ES). Tous les clones iPS obtenus (WT, PEC, PPE) possèdent dans leur génome au moins un exemplaire du provirus OSK. Les RT-PCR montrent l'expression des marqueurs embryonnaires *Oct4* (murin donc endogène), *Cripto*, *ERas* et *Esg1* spécifiquement dans les cellules ES et les différents clones iPS dérivés prouvant ainsi leur pluripotence (Figure 32). Le gène *c-Myc* est, quant à lui, exprimé de manière constitutive dans les fibroblastes. Comme dans le cas de la caractérisation par immunofluorescence, les fibroblastes n'expriment aucun marqueur de pluripotence. L'expression de la GAPDH est utilisée comme contrôle de charge.

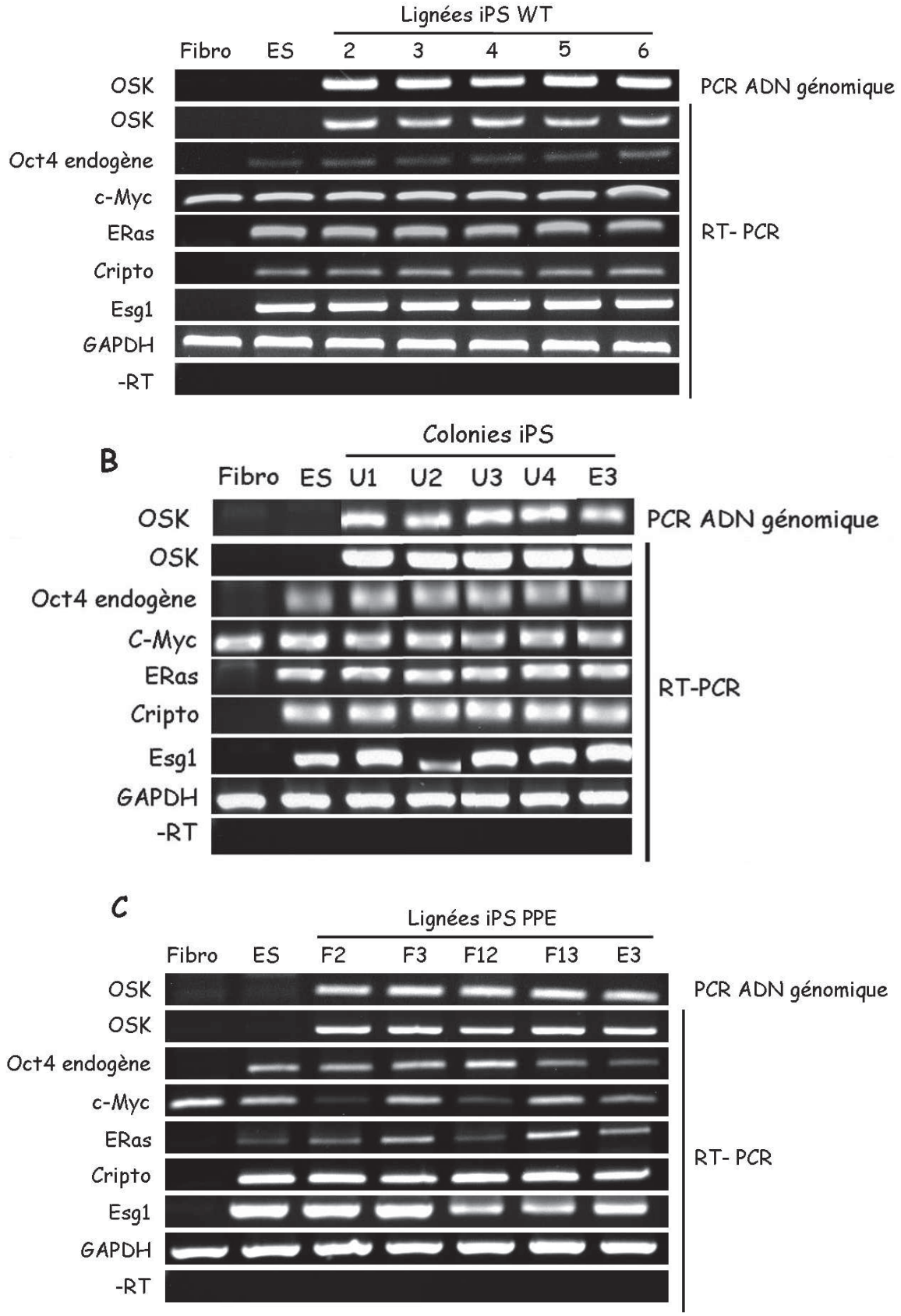


Figure 32. Expression du vecteur de reprogrammation et des marqueurs de pluripotence dans les lignées iPS générées par RT-PCR. Toutes les lignées iPS générées expriment les gènes spécifiques des cellules pluripotentes. Les cellules ES sont un contrôle positif et les fibroblastes un contrôle négatif. La ligne -RT représente une PCR GAPDH effectuée sur les ARN de chaque lignée après extraction et traitement à la DNase. **A)** Lignées iPS WT. **B)** Lignées iPS PEC. **C)** Lignées iPS PPE. GAPDH : Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase.

La transduction des lignées iPS par les différents vecteurs thérapeutiques (HAUPIns, HAFPIns) et contrôle (HAEPIns) est vérifiée par PCR et qPCR (amorces listées dans le tableau 10, Figure 33). Un faible nombre d'intégrations du vecteur thérapeutique HAUPIns a été déterminé par Q-PCR (Tableau 11).

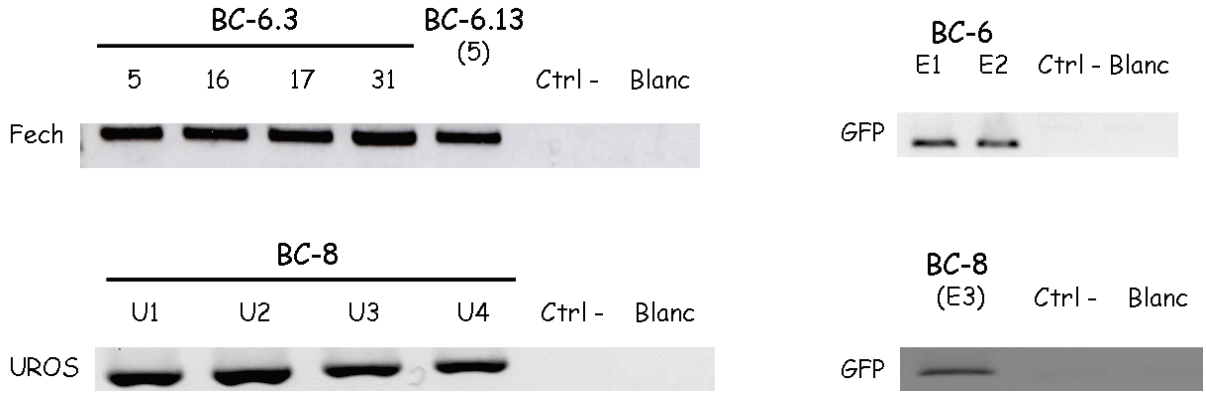


Figure 33. Détection des transgènes HAFPIns et HAUPIns (à gauche) et HAEPIns (à droite) dans les lignées iPS issus de fibroblastes murins PPE (ligne du haut) et PEC (ligne du bas).

Lignée	Nombre de copies du transgène
U1	3,6
U2	2,7
U3	2,5
U4	2

Tableau 11. Nombre de copies du transgène HAUPIns obtenu par qPCR dans les lignées iPS issues de fibroblastes PEC.

Les sites d'intégration du vecteur HAUPIns dans les lignées PEC sont détectés par LAM-PCR. Les lignées U1 et U3 n'offrent pas de séquences interprétables au moment de l'écriture de la thèse. La lignée U2 révèle 2 intégrations : 1 sur le chromosome 17 dans un intron du gène de la lysocardiolipine acyltransférase 1 (en position : 73,154,588-73,154,737pb) et une autre intégration sur le chromosome 6 dans un intron du gène codant pour la protéine à doigt de zinc 212 (en position : 47,879,000-47,979,000pb). Du fait de la présence du vecteur thérapeutique dans ces gènes, la lignée a été écartée. Les lignées U4 et E3 présentent toutes les deux une intégration dans les chromosomes 6 et 14 respectivement. Les

locus sont éloignés de tous gènes identifiés (position : 55,530,506-55,530,613pb pour U4, ~30Kb et position : 38,041,000-38,141,000pb pour E3, >200Kb). Les nombres d'intégrations obtenus en LAM-PCR n'étant pas toujours corrélés avec ceux de la Q-PCR, nous allons continuer les expériences de LAM-PCR et séquencer d'autres clones.

Les lignées iPS transduites avec le vecteur HAFPIns n'ont pour le moment pas été étudiées par qPCR ni LAM-PCR.

III- Excision du vecteur de reprogrammation et caractérisation – Etape 4

Les cellules obtenues lors des différentes expériences de reprogrammation présentent une activité phosphatase alcaline et l'expression de marqueurs de pluripotence. Il est nécessaire de prouver la pluripotence de ces lignées lors d'une différenciation *in vitro* et *in vivo* par la formation de corps embryoïdes et de tératomes respectivement. Dans le but de ne pas perturber l'expression génique endogène et de promouvoir la différenciation de nos lignées, la cassette de reprogrammation est excisée une fois les clones iPS établis (Sommers *et al*. 2010). Pour cela, ces derniers sont transduits avec un vecteur adénoviral exprimant la recombinase CRE. Cette recombinase clive spécifiquement l'ADN au niveau des séquences LoxP qui flanquent le vecteur OSK et permet la réparation de l'ADN aux points de cassure (cf. Figure 13). Dans le cas des lignées iPS PEC et PPE, plusieurs expériences (n=2 et n=3) de transductions/sous-clonage ont été nécessaire afin d'obtenir des clones iPS viables et excisés. En effet, la transduction avec le vecteur adénoviral est toxique et élimine de nombreuses cellules. Mais la mortalité se poursuit même une semaine après transductions vraisemblablement causée par une excision du provirus. Les transgènes permettent la recombinaison des cellules et sont donc initiateurs de voies intracellulaires de survie et d'autorenouvellement (Hong *et al*. 2008 ; Li *et al*. 2009). Leur excision entraîne donc parfois l'entrée en apoptose des clones dont le système endogène de maintien de la pluripotence n'aurait pas été totalement activé. Mais des lignées excisées issues de chaque type cellulaire ont pu être dérivées (WT, PEC et PPE).

Après excision, les lignées iPS conservent leur morphologie « ES-like ». L'expression des marqueurs de pluripotence est à nouveau testée. En effet, le vecteur de reprogrammation

permet d'activer les gènes endogènes impliqués dans le maintien de la pluripotence (déméthylation des promoteurs de Oct3/4 et Nanog et expression des protéines correspondantes). Si l'activation des gènes endogènes n'est pas complète, le clone iPS excisé peut perdre sa pluripotence.

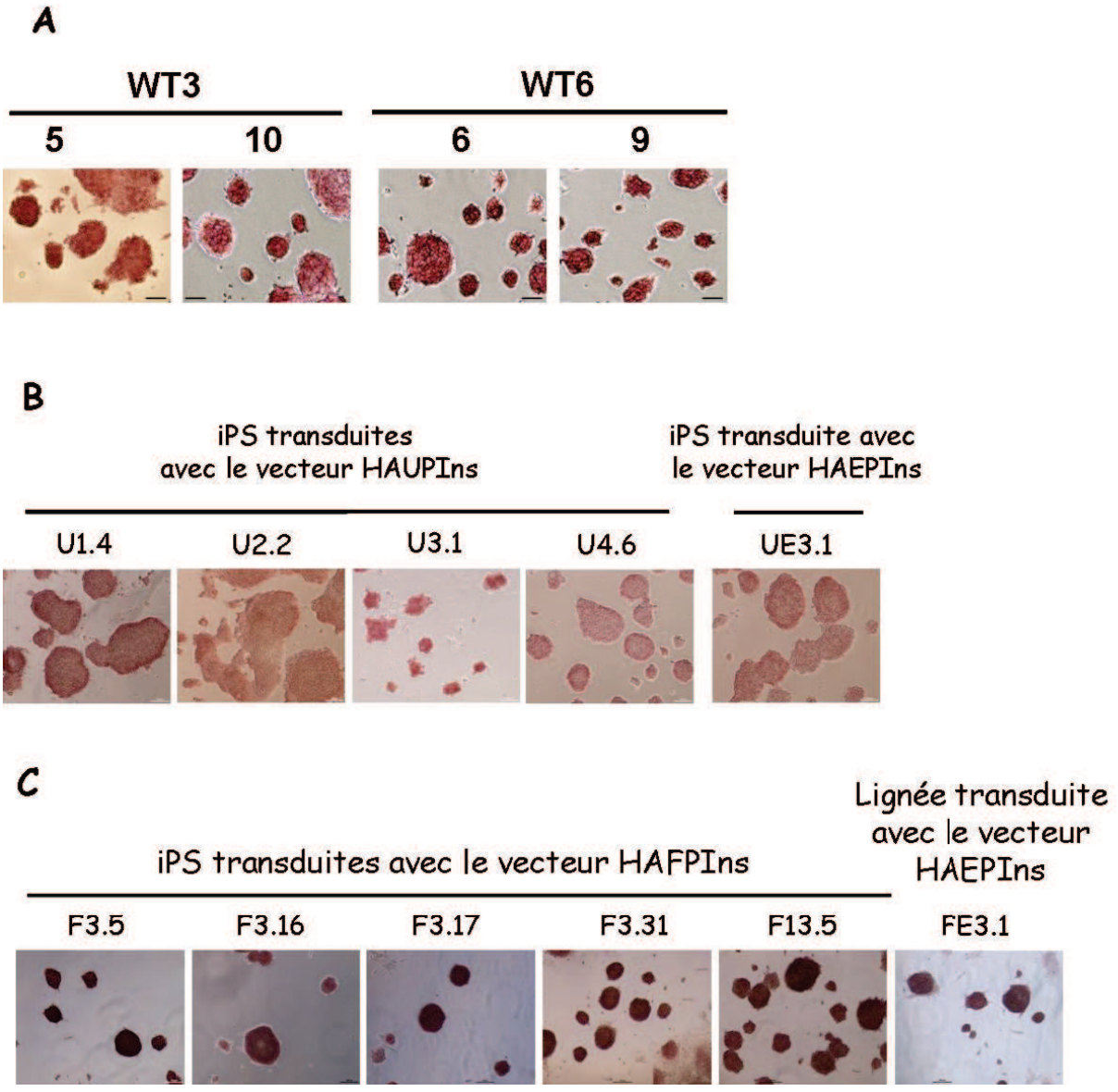
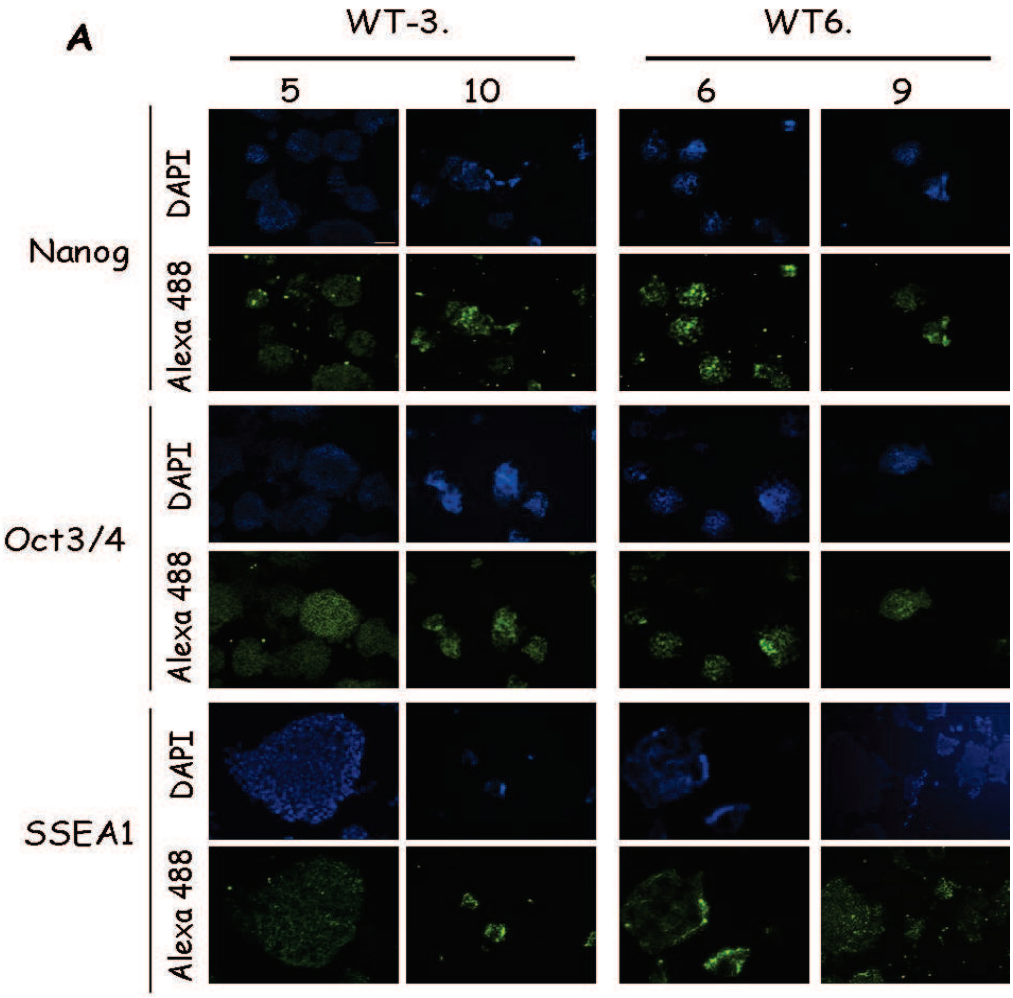


Figure 34. Evaluation de l'activité de la phosphatase alcaline. Même après excision du vecteur de reprogrammation, toutes les lignées iPS générées continuent à exprimer ce marqueur. Echelle : 100µm.


A
WT-3.
WT6.
5
10
6
9
Nanog
DAPI
Alexa 488
Oct3/4
DAPI
Alexa 488
SSEA1
DAPI
Alexa 488

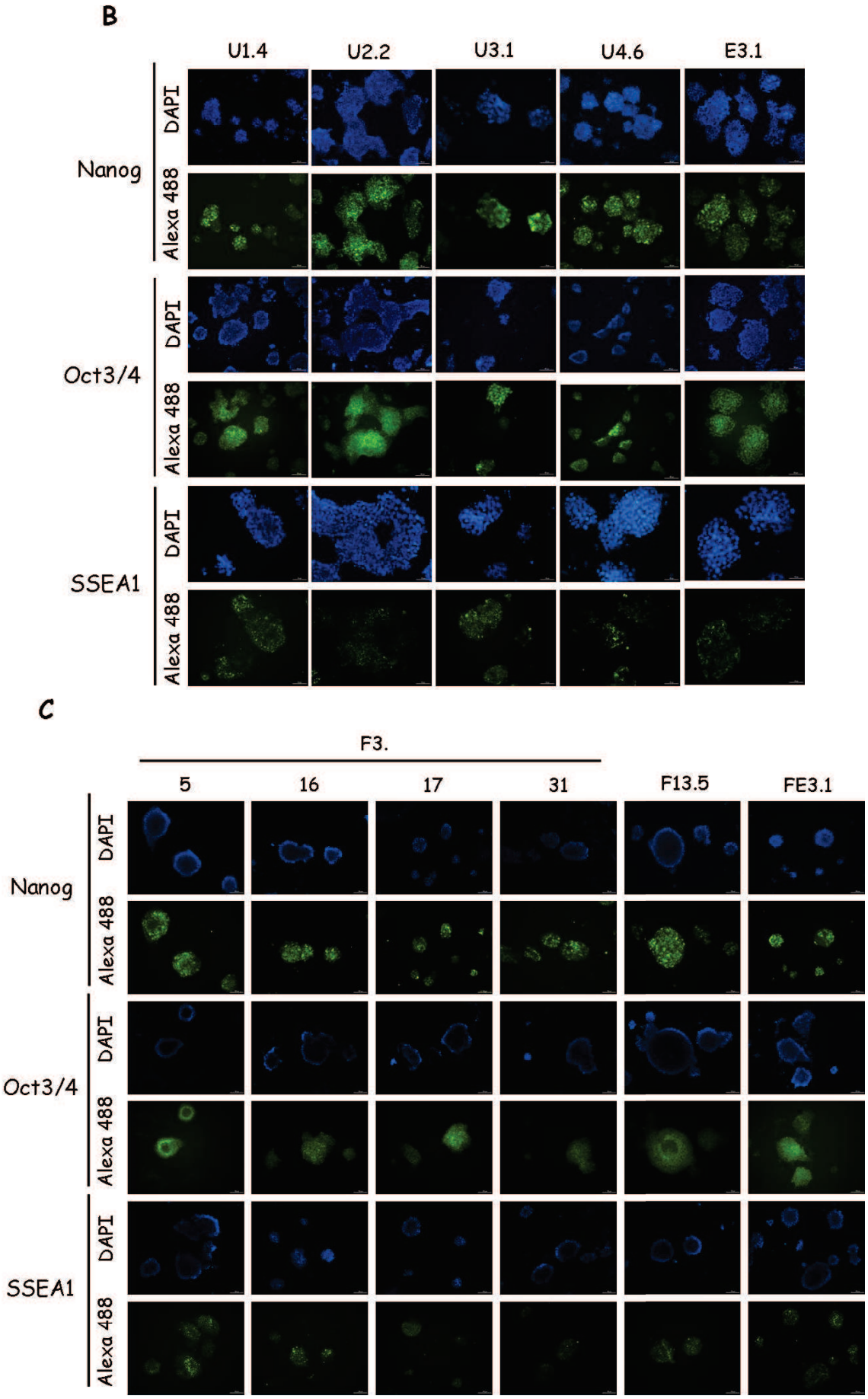


Figure 35. Evaluation de l'expression de marqueurs de pluripotence Nanog, Oct3/4 et SSEA1 par immunofluorescence. Toutes les lignées générées, même après excision de leur vecteur de reprogrammation expriment ces marqueurs de pluripotence.

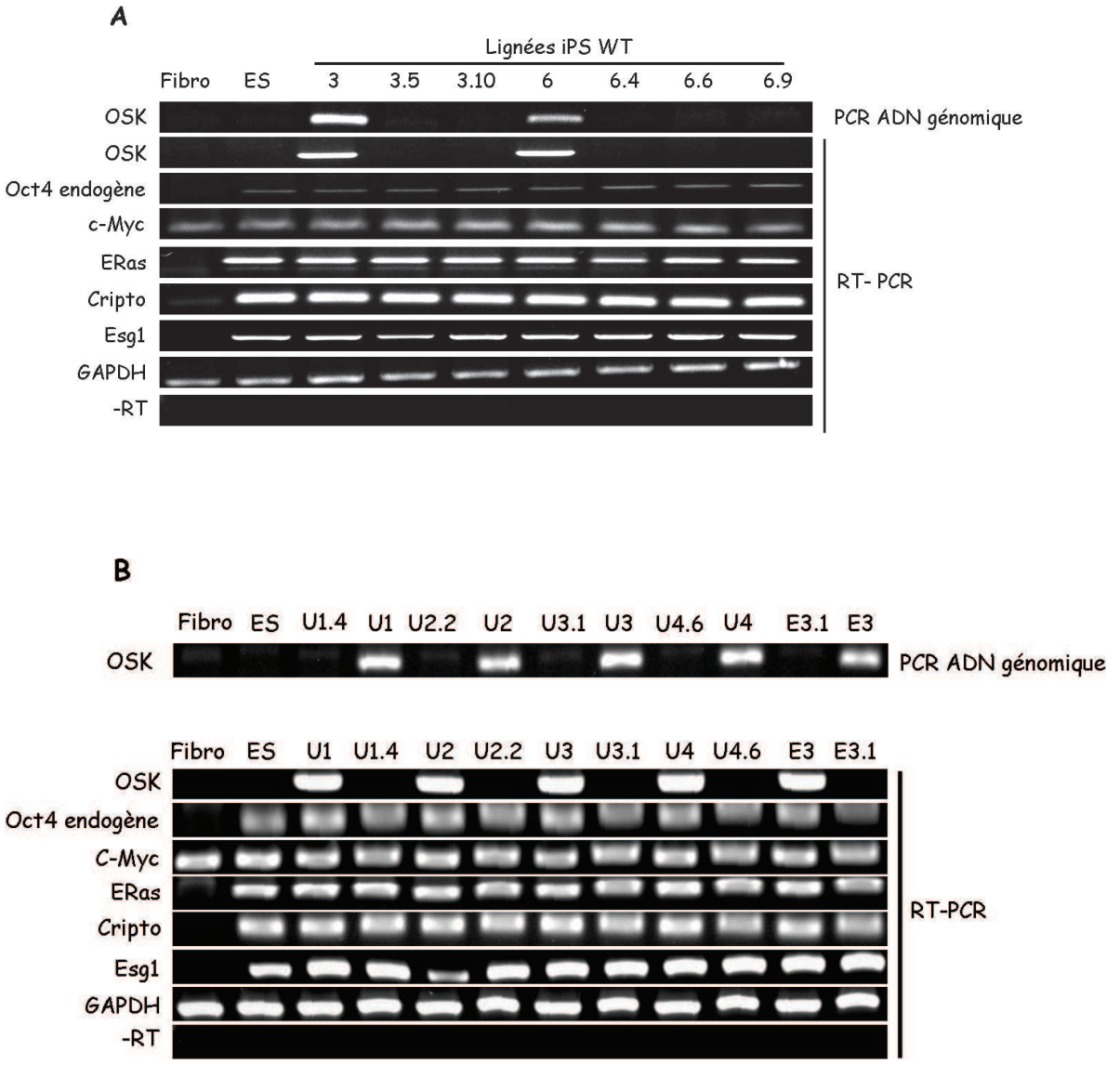


Figure 36. Evaluation de l'expression de marqueurs de pluripotence par RT-PCR. L'excision du vecteur de pluripotence est vérifiée par PCR et RT-PCR. Toutes les lignées iPS utilisées sont excisées et expriment les marqueurs de pluripotence testés.

Ceci démontre que le système transcriptionnel endogène a pris le relais dans le maintien de la pluripotence.

La différenciation des cellules pluripotentes *in vitro* est testée par la formation spontanée de structures cellulaires non adhérentes en 3 dimensions appelées corps embryoïdes. Ces structures miment le développement embryonnaires jusqu'au stade J5-6. Dans ces structures, les cellules se différencient en différents tissus dérivés des trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme). L'étude par RT-PCR révèle l'expression de gènes spécifiques de ces tissus. Deux lignées de cellules iPS WT et 5 lignées PEC ont été testées. Les lignées ne semblent pas toutes avoir les mêmes capacités de

pluripotence car l'expression des marqueurs de différenciation est inégale. Ceci semblerait indiquer une déficience dans la différenciation *in vitro* ou une pluripotence incomplète de certaines lignées. De plus, les lignées iPS expriment toutes la protéine NESTIN tout comme les fibroblastes d'origine peut-être à cause de la conservation de l'empreinte épigénétique des fibroblastes (Figure 37).

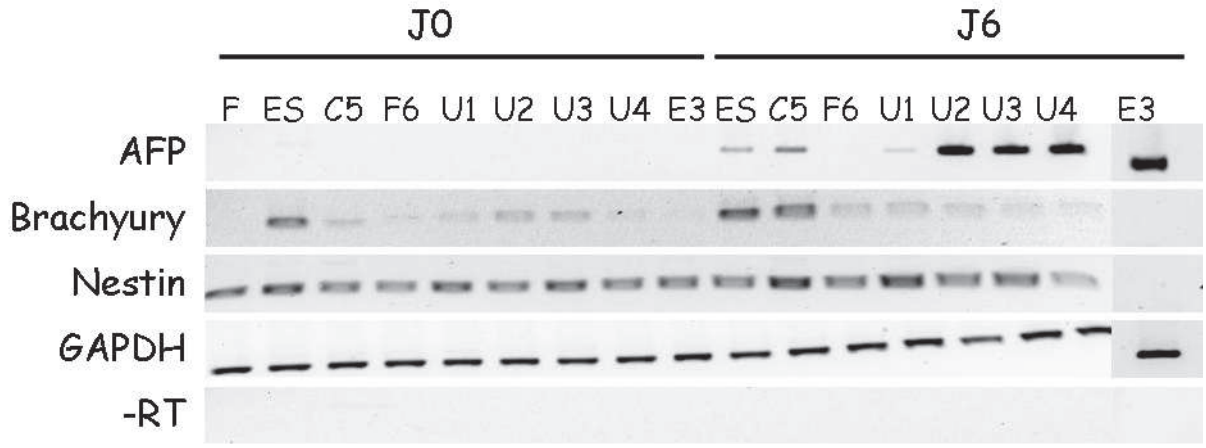


Figure 37. Expression de gènes caractéristiques de la différenciation dans un des 3 feuillets embryonnaires (Brachyury : mésoderme, Nestin : ectoderme, AFP –Alpha-fœtoprotéine : endoderme) dans les cellules iPS générées (C5 et F6 : WT et U1 à E3 : PEC) à J0 et J6. La ligne -RT représente une PCR GAPDH effectuée sur les ARN de chaque lignée après extraction et traitement à la DNase. GAPDH : Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase.

Les lignées iPS WT et PEC ont été différenciées *in vivo* par leur injection par voie sous-cutanée dans des souris NOG. Toutes les lignées testées ont formé une masse tumorale bénigne et non invasive. Les tératomes, formés par la greffe de lignées iPS testées WT3.5, WT6.6, WT6.9 (WT) et U1.4, U2.2, U3.1, U4.6, étaient composées de tissus issus des 3 feuillets embryonnaires (Figure 38).

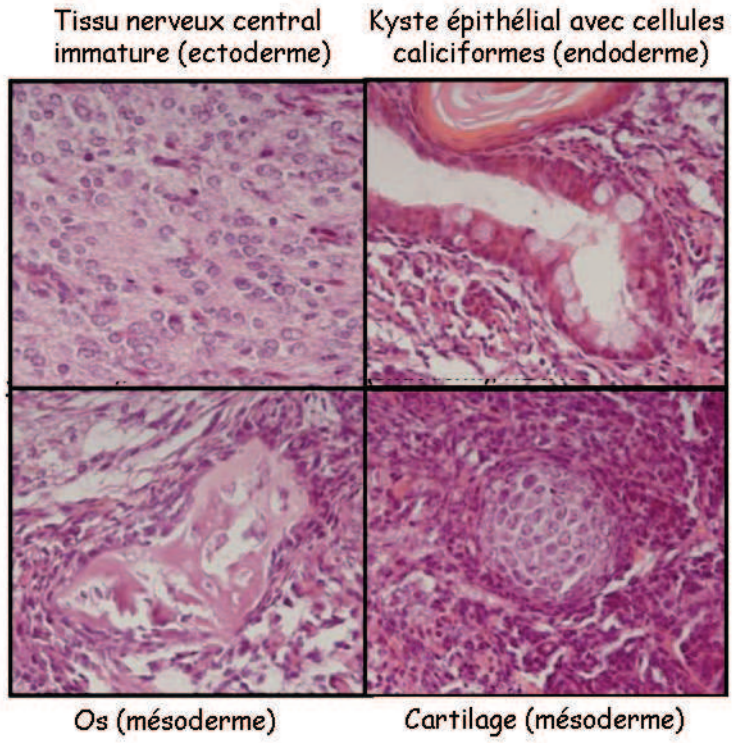


Figure 38. Coupes de tératomes (4µm) marquées à l'hématoxyline/éosine issus de la lignée iPS U4.1. Les tissus différenciés observés proviennent de feuillets embryonnaires différents prouvant la pluripotence des cellules. Toutes les photos ont été prises au x400.

Les cellules iPS sont donc toujours pluripotentes même après excision du vecteur de reprogrammation. Elles conservent leur pluripotence comme montré dans la formation de tératome chez la souris immunodéficiente. Pour une utilisation dans notre protocole de différenciation, les lignées U4.6 et UE3 ont été envoyées à l'Institut Clinique de la Souris (Strasbourg) pour une étude caryotypique.

IV- Différenciation hématopoïétique des lignées iPS – Etape 6

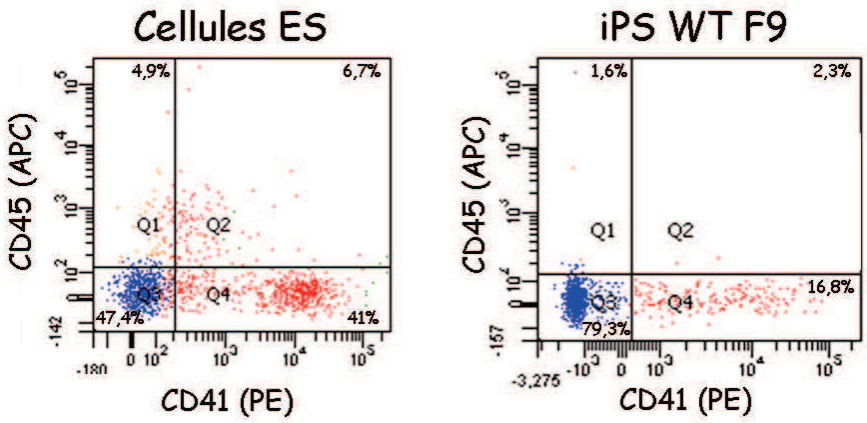
Afin de corriger les modèles murins porphyriques, nous avons cherché à différencier nos lignées iPS en cellules souches hématopoïétiques. Pour cela, nous avons utilisé plusieurs protocoles de différenciation hématopoïétique décrits dans la littérature. La majorité de ces protocoles sont basés sur l'expression ectopique du facteur de transcription HOXB4 facilitant la différenciation mésodermique des cellules pluripotentes et d'un stroma OP9 soutenant la différenciation hématopoïétique.

Dans un premier temps, nous voulions déterminer le potentiel de différenciation innée de nos lignées iPS. Nous avons donc expérimenté un protocole de différenciation sans HOXB4

consistant à générer des corps embryoïdes pendant 6 jours puis à placer les cellules résultant de leur dissociation en milieu permettant la prolifération de progéniteurs hématopoïétiques (Stem alpha, SVF 10%, mSCF 50ng/ml, mFlt3-L 50ng/ml, hTPO 50ng/ml, mIL-3 10ng/ml, hIL-6 10ng/ml, hIGF1 20ng/ml). Les antigènes analysés (CD45, Sca-1, c-Kit) par cytométrie en flux n'ont pas permis la sélection d'une population de progéniteurs hématopoïétiques : aucune cellule n'exprimait les antigènes hématopoïétiques CD45 et Sca-1. Une forte proportion de cellules exprimait l'antigène c-Kit$^+$ mais le récepteur au SCF est également présent à la surface des cellules pluripotentes en condition normale et aucune différence significative n'a pu être trouvée avec les cellules cultivées en milieu avec cytokines. De plus, la mortalité occasionnée par la dissociation des corps embryoïdes était très importante (~70-80%). Les cellules viables après dissociation ne prolifèraient pas. Nous avons donc expérimenté un autre protocole pour l'expérience suivante. Les études publiées analysant des marqueurs hématopoïétiques beaucoup plus précoces que le marqueur CD45 (antigène pan-hématopoïétique), le cluster de différenciation 41 (antigène hématopoïétique embryonnaire) a été ajouté aux antigènes analysés pour les études suivantes.

Dans un premier temps, le protocole de différenciation A a été utilisé (Figure 28A et Seiler *et al*. 2011). Les cellules iPS sont ensemencées à faible densité sur le stroma OP9 et poussent parfois en formant des colonies rondes et lisses, semblables morphologiquement à des colonies iPS. Mais cette prolifération n'est pas observée dans toutes les conditions. Les cellules récoltées à J5 sont réensemencées sur un stroma OP9 pour 4 à 5 jours supplémentaires. A J10, une population de cellules non adhérentes est analysée par cytométrie. Les cellules sont marquées et l'évolution des différents marqueurs est suivie par cytométrie. L'expression des marqueurs CD41 et CD45 est évaluée. La lignée OP9 exprimant le marqueur Sca-1, nous n'avons plus suivi cet antigène qui ne permettait pas de distinguer les cellules iPS des cellules stromales.

Une seule expérience a permis une différenciation hématopoïétique : la différenciation de cellules ES et iPS WT (lignée F9) a engendré l'apparition de cellules CD41$^+$ (51,3% dans les ES et 17,8% dans les iPS) et une plus faible proportion de cellules CD45$^+$ dans les ES uniquement (10,6%). Seules les cellules ES présentent un double marquage CD41/CD45 attestant d'une population cellulaire en cours différenciation hématopoïétique avancée (6,7%) (Figure 39). La lignée iPS F9 semble plus difficile à différencier car selon le même protocole de différenciation, environ 2,5 fois moins de cellules CD41$^+$ sont générées et aucune CD45$^+$.



Lignée	CD41 (%)	CD45 (%)
ES	51,3	10,6
F9	17,8	3

Figure 39. Différenciation de cellules ES et iPS WT. Après 10 jours sur stroma OP9, les cellules ES expriment les marqueurs hématopoïétiques CD45 et CD41 contrairement aux cellules iPS n'exprimant que le facteur le plus immature.

L'ensemencement de ces cellules en milieu semi-solide (méthylcellulose complémentée avec des cytokines hématopoïétiques) n'a pas permis d'observer de colonies hématopoïétiques.

De ce fait et afin d'obtenir des conditions expérimentales plus efficaces, nous avons cloné un vecteur lentiviral exprimant le facteur de transcription HOXB4 humain permettant une amélioration de la différenciation mésodermique (cf. Figure 25C). Le vecteur comprend également la séquence ADNc de la ZsGreen permettant de suivre les cellules transduites. Les mêmes lignées sont également transduites avec un vecteur contrôle comportant une construction identique, le gène de résistance à la puromycine se substituant à HoxB4. Plusieurs lignées de cellules pluripotentes ont été utilisées dans les 2 protocoles décrits (Seiler *et al*. 2011 - A et Hanna *et al*. 2007 - B) : ES, WT3.5 et WT6.6, U1.1, U2.2, U3.1, U4.6. Les antigènes VEGFR2 (apparaissant précocement dans le développement hématopoïétique) ainsi que SSEA1 (antigène strictement embryonnaire) ont également été analysés lors de ces protocoles.

Dans le protocole B, les lignées iPS ont été infectées avec le vecteur HoxB4 ou contrôle avant la formation de corps embryoïdes afin d'obtenir une meilleure transduction et de réduire la mortalité lors de leur dissociation. Après une sélection à la puromycine, les lignées obtenues par transduction du vecteur contrôle sont transduites à plus de 80%. Dans le

cas des lignées infectées avec le vecteur lentiviral exprimant HoxB4, les lignées présentent entre 30 et 50% de cellules positives (ZsGreen^{+}). L'expression de la ZsGreen dans ces deux vecteurs permet de suivre les cellules iPS au cytomètre lors des expériences de différenciation utilisant le stroma OP9 beaucoup plus aisément que dans les premiers protocoles.

L'efficacité de transduction est appréciée par cytométrie (tableau 11) et la surexpression de HoxB4 est vérifiée par un western blot sur deux lignées ES et F6 où l'expression est augmentée de 7,7 et 23,5 fois respectivement (Fig X).

Lignées	% cellules ZsGreen^{+}
ES PURO	78,7
ES HoxB4	50,3
C5 PURO	79,9
C5 HoxB4	73,2
F6 PURO	92,2
F6 HoxB4	66,8
U1 PURO	85
U1 HoxB4	36,6
U2 PURO	92,7
U2 HoxB4	94,3
U3 PURO	90
U3 HoxB4	70,3
U4 PURO	88,4
U4 HoxB4	21,9

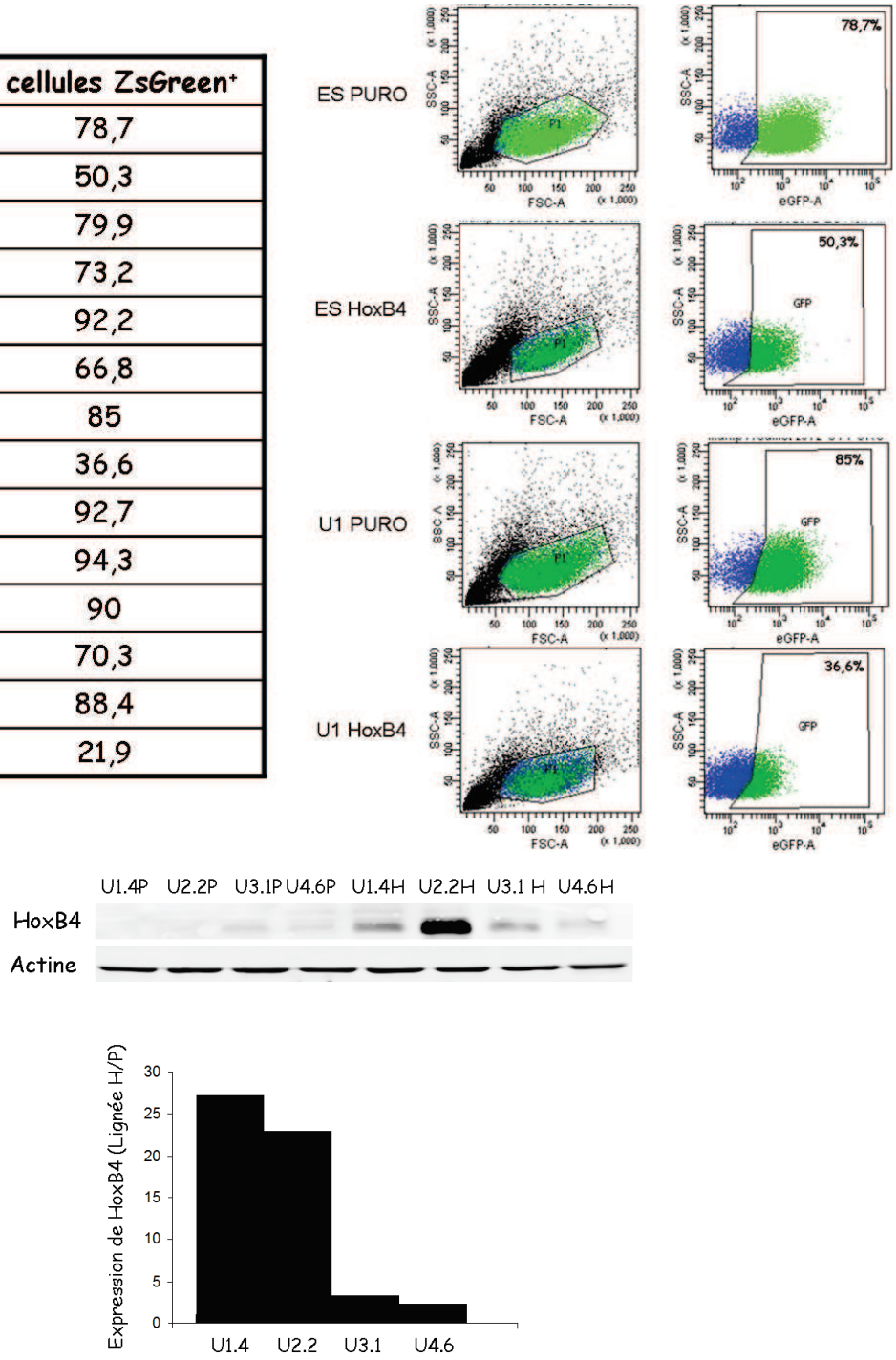


Figure 40. Transduction des lignées GFP et HoxB4. Le tableau montre le pourcentage de cellules GFP^{+}. Les images de cytométrie sont un exemple des images obtenues et ayant servies aux quantifications. Le western blot montre une surexpression forte de HoxB4 dans certaines lignées iPS (U1.4H et U2.2H).

A J0, toutes les lignées testées montrent le même profil d'expression : peu de cellules expriment les marqueurs hématopoïétiques recherchés et présentent une expression importante du SSEA1. L'expression de ces différents marqueurs est ensuite suivie lors des deux protocoles de différenciation. Les quantifications se sont faites sur la portion de cellules GFP^+ afin de ne pas tenir compte du marquage aspécifique potentiel dû au stroma (cellules stromales largement excédentaires par rapport aux cellules pluripotentes à différencier). Les marqueurs CD45 et VEGFR2 (Flk-1) n'ont jamais montré de résultats significatifs lors des deux protocoles de différenciation. L'étude de la différenciation s'est donc concentrée sur les marqueurs CD41 et SSEA1.

Lors du protocole de différenciation A, les cellules iPS poussent parfois parmi le stroma OP9 en formant des colonies semblables à des colonies iPS. Comme précédemment, cette prolifération n'est pas observée dans toutes les conditions. Les cellules expriment bien la ZsGreen visualisable en microscopie à fluorescence (Figure 41). Les cellules récoltées à J5 sont réensemencées sur un stroma OP9 pour 4 à 5 jours supplémentaires puis analysées par cytométrie. Le tableau 12 récapitule les résultats obtenus pour les deux marqueurs CD41 et SSEA1.

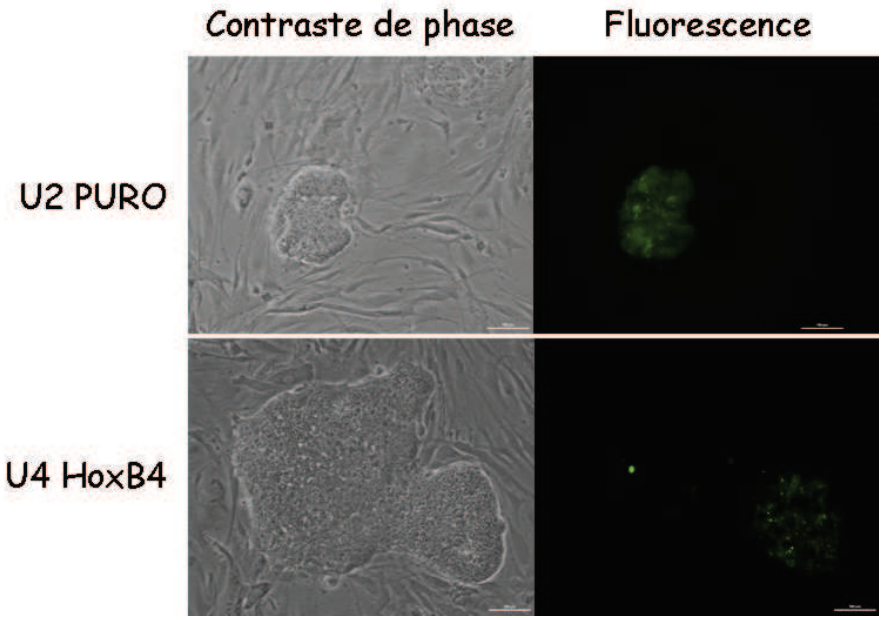


Figure 41. Lignées iPS observées en contraste de phase et en fluorescence au 5ème jour du protocole de différenciation A. Echelle 10µm.

Très peu de cellules expriment l'antigène hématopoïétique CD41 même après 10 jours sur stroma OP9. La lignée WT6.6 PURO présente le marquage le plus important avec 1,9%

des cellules CD41$^+$. Ces résultats s'expliquent par le maintien de l'état pluripotent dans ces cellules. En effet, toutes les lignées testées ayant suffisamment proliféré pour avoir un marquage interprétable, présentent un marquage embryonnaire très important (>70% de cellules SSEA1$^+$ sauf pour ES HoxB4 ~40% de cellules SSEA1$^+$). Cette différenciation inefficace est retrouvée dans les lignées iPS mais aussi dans les lignées ES. Ceci suggère que la méthode de reprogrammation (vecteur intégratif) ou l'excision du vecteur OSK n'est pas responsable de ce maintien de la pluripotence.
Contrairement à ce qui avait été démontré par Chan et collaborateurs, les cellules montrent une prolifération réduite même dans les lignées transduites avec le vecteur HoxB4 sensé soutenir cette prolifération (Chan *et al*. 2008). De ce fait, les résultats de plusieurs lignées ne sont pas interprétables par manque de cellules à analyser (environ 6 000 cellules sont ensemencées en début de protocole). Seules les cellules SSEA1$^+$ semblent conserver une certaine prolifération ou survie cellulaire comme observée dans la lignée U4 PURO où le pourcentage de cellules ZsGreen$^+$ augmente entre le début et la fin de l'expérience.

Lors du protocole de différenciation B, un plus grand nombre de lignées a été étudié. Les cellules sont analysées après 13 jours de différenciation (6 jours de corps embryoïdes suivis de 7 jours sur stroma OP9) et après 20 jours (7 jours supplémentaires sur stroma) (Figure 28B). Dans ces conditions, les cellules se différencient mieux comme attesté par la diminution du nombre de cellules SSEA1$^+$ à J13 (Tableau 13). Mais ce résultat dépend de la lignée considérée au vu de la disparité des résultats (entre 28% et 90% de cellules SSEA1$^+$). Seule la lignée ES semble restée indifférenciée indépendamment du facteur de transcription HoxB4. L'expression du marqueur CD41 est faible bien que présente dans la plupart des lignées (entre 0,5 et 5,9% de cellules CD41$^+$). La prolifération des cellules est également déficiente dans ce protocole où peu de résultats sont interprétables à J20 par manque de cellules ZsGreen$^+$. Les seules lignées présentant des cellules vivantes à J20 expriment le même pourcentage ou un pourcentage plus élevé de cellules non différenciées (SSEA1$^+$) qu'à J7. Ceci renforce l'hypothèse selon laquelle les cellules différenciées ne prolifèreraient que peu ou pas et entreraient potentiellement en apoptose tandis que les cellules non différenciées parviendraient à maintenir une prolifération même faible.

Protocole A

	J0		J9-12	
Lignée	CD41	SSEA1	CD41	SSEA1
ES PURO	0,2	88,1	0,3	81,9
ES HoxB4	0,2	94	0,4	38,6
6.6 PURO	0,3	91,3	1,9	92,2
6.6 HoxB4	0,1	68,8	ND	ND
U1.4 PURO	0,1	93	ND	ND
U1.4 HoxB4	0,1	75,6	2	0
U2.2 PURO	0,2	64,9	ND	ND
U3.1 PURO	0,5	81,1	ND	ND
U4.6 PURO	0,2	56,8	0,4	90,8
U4.6 HoxB4	0,5	47,3	ND	ND

Protocole B

	J0		J13		J20	
Lignée	CD41	SSEA1	CD41	SSEA1	CD41	SSEA1
ES PURO	0,2	88,1	0,5	91	0,7	80,9
ES HoxB4	0,2	94	0,5	82,3	1,2	80,3
3.5 PURO	0,1	86,1	0,5	48,1	0,5	62,5
3.5 HoxB4	0,6	72,5	0,8	54,6	0,6	60,4
6.6 PURO	0,3	91,3	1,6	61,2	8,6	33,3
6.6 HoxB4	0,1	68,8	2,5	69,2	5	69
U1.4 PURO	0,1	93	2,1	32,4	ND	ND
U1.4 HoxB4	0,1	75,6	1,6	27,9	ND	ND
U2.2 PURO	0,2	64,9	0,9	55,4	11	60,3
U2.2 HoxB4	0,3	35,6	1,3	59,1	0,6	70,4
U3.1 PURO	0,5	81,1	2	66,8	ND	ND
U3.1 HoxB4	0,4	69,6	5,9	68	ND	ND
U4.6 PURO	0,2	56,8	0,8	44,6	7,3	63,1
U4.6 HoxB4	0,5	47,3	0,5	57,8	ND	ND

Tableaux 12 et 13. Tableaux récapitulatifs des résultats de différenciation obtenus à partir du protocole A et B. ND : Non déterminé par manque de cellules.

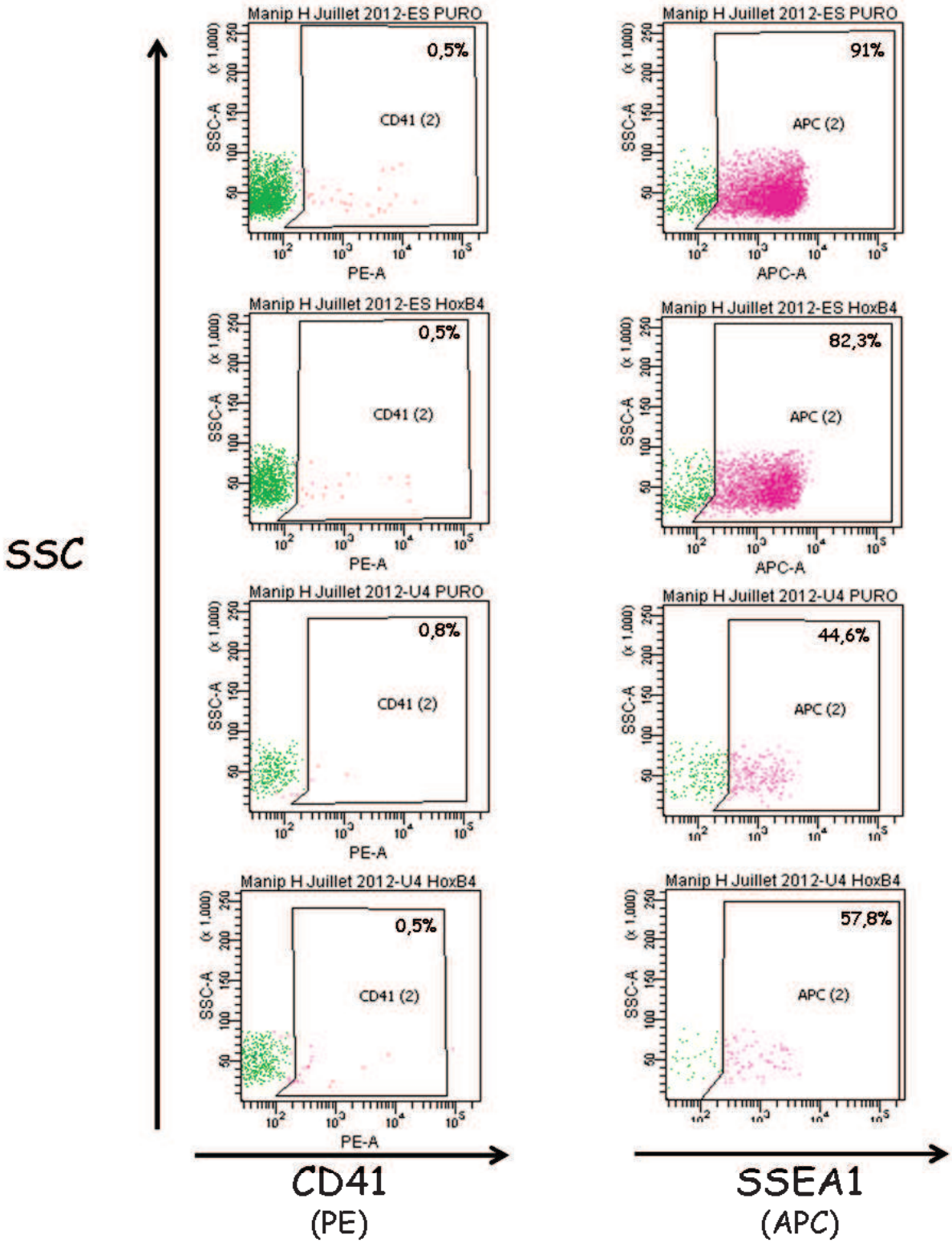


Figure 42. Marquage des antigènes CD41 et SSEA1 après 13 jours de différenciation (protocole n°2). Les lignées ES ou iPS n'expriment que peu le marqueur CD41. En comparaison, l'antigène SSEA1 est toujours fortement exprimé dans les cellules ES et par 50% des cellules U4. Beaucoup moins de cellules iPS sont détectables par cytométrie à cause d'une faible prolifération.

Ces résultats ne permettent pas de sélectionner une population de progéniteurs hématopoïétiques pour une transplantation dans des souris porphyriques, quelque soit le protocole de différenciation utilisé. Les expériences de greffe de cellules iPS différenciées seront donc faites à partir d'un tri cellulaire basé sur l'expression du facteur HoxB4 ($ZsGreen^{+}$) et l'arrêt de l'expression du facteur embryonnaire ($SSEA1^{-}$) tout comme dans le protocole de Hanna et collaborateurs pour tester leur capacité à proliférer et à recoloniser la moelle osseuse *in vivo*. Les greffes se feront par voie intraveineuse (sinus rétro-orbital) ou par voie intrafémorale afin de déterminer si la différenciation en cellule hématopoïétique est facilitée par l'environnement médullaire.

Résultats 4 :

Approche pharmacologique de la porphyrie érythropoïétique congénitale

Le déficit en UROS caractérisant la PEC peut résulter de mutations différentes. Les mutations affectant le gène de l'UROS peuvent être localisées au niveau du promoteur (diminuant ainsi l'expression du gène, Solis *et al*. 2001) ou dans la séquence codante elle-même (affectant dans ce cas, la protéine en elle –même, Ged *et al*. 2009). La plus commune des mutations (retrouvée chez un tiers des patients) est une mutation faux sens remplaçant la cystéine en position 73 par une arginine (C73R). Cette mutation est responsable d'un phénotype sévère avec un vaste tableau clinique : anémie hémolytique importante, photosensibilité cutanée entraînant des lésions graves pouvant conduire à la mutilation de la zone exposée (extrémités et visage généralement). Cette mutation est également la cause de décès *in utero*.

Or, il a récemment été montré que cette mutation, comme beaucoup d'autres mutations faux sens retrouvées dans la PEC, affecte la structure tertiaire de l'enzyme mais pas son site actif (Fortian *et al*. 2009). La mutation n'est donc pas la cause directe de la déficience fonctionnelle car l'enzyme est toujours active. Le changement de séquence primaire bouleverse les interactions inter-acides aminés et donc la structure tertiaire de la protéine. Celle-ci, mal conformée, induit un stress dans le réticulum endoplasmique qui augmente sa dégradation par le système ubiquitine ligase-protéasome (réponse UPR : Unfolded Protein Response, Klausner et Sitia, 1990 ; Ellgaard et Helenius, 2003). L'accumulation intracellulaire de cette enzyme par une inhibition du protéasome prouve que ce changement de structure entraîne sa reconnaissance rapide par les ubiquitines ligases et sa dégradation précoce (Fortian *et al*. 2011). L'inhibition des lysosomes n'aboutit pas à l'accumulation des protéines mutées confirmant la spécificité d'une dégradation par le protéasome. Cette expérience montre également que son activité enzymatique est partiellement restaurée grâce à cette accumulation (50% de l'activité enzymatique de la protéine WT).

La mutation P248Q, une mutation faux sens fréquente dans la PEC, présentant une activité similaire à la mutation C73R, nous avons essayé d'extrapoler les résultats obtenus sur la mutation C73R à cette mutation. Pour cela, nous avons travaillé sur un modèle de cellules

érythroïde humaines (K562) et *in vivo* sur un modèle de souris PEC présentant la mutation P248Q. L'ADNc des protéines UROS C73R ou UROS P248Q fusionnées à la GFP, transfecté de manière stable dans les K562, ne permet pas de détecter les protéines par cytométrie en condition de culture classique contrairement à la protéine UROS WT-GFP. L'inhibition du protéasome dans ces cellules par des inhibiteurs spécifiques (bortezomib ou MG132) entraîne la stabilisation et l'accumulation des protéines UROS C73R-GFP et UROS P248Q-GFP dans les cellules, détectable par cytométrie. Pour les expériences i*n vivo*, nous avons dans un premier temps déterminé la demi-vie de l'inhibiteur du protéasome (Velcade®) utilisé. L'inhibition du protéasome est maximale 2 heures après injection et nulle 48 heures après injection. Les souris *Uros*^{P248Q} ont été traitées avec 2 doses différentes de Velcade® tous les 2 jours par une injection par voie intrapéritonéale. Le taux de fluorocytes est suivi par prélèvement sanguin hebdomadaire. Chez les souris traitées, le pourcentage moyen de fluorocytes diminue dès la première semaine jusqu'à se stabiliser à 50% du taux de fluorocytes retrouvé chez les souris non traitées, après 5 semaines de traitement. Les souris traitées présentent également une amélioration significative de leur photosensibilité. En revanche, les paramètres hématologiques ne sont que peu ou pas améliorés (anémie, hématocrite). Ces résultats préliminaires semblent montrer une accumulation de la protéine mutée ce qui restaurerait partiellement son activité. Ceci démontrerait que l'UROS-P248Q est, tout comme la protéine UROS-C73R, déstabilisée par sa mutation et qu'une approche pharmacologique visant à inhiber le protéasome dans les cellules des patients porteurs de cette mutation pourrait être thérapeutique (**Résultats 4 : Article 3 en préparation**).

Résultats 4 :

Potentiel thérapeutique d'inhibiteurs du protéasome dans la porphyrie érythropoïétique congénitale

Therapeutic potential of proteasome inhibitors in congenital erythropoietic porphyria.

Jean-Marc Blouin[1,2*], Yann Duchartre[1,2*], Pierre Costet[3], Magalie Lalanne[1,2], Cécile Ged[1,2], Hubert de Verneuil[1,2] and Emmanuel Richard[1,2].

1. Université de Bordeaux, Biothérapies des Maladies Génétiques et Cancers, U1035, F-33000 Bordeaux, France

2. INSERM, Biothérapies des Maladies Génétiques et Cancers, U1035, F-33000 Bordeaux, France

3. Université de Bordeaux, Animalerie Spécialisée (Specialized Animal Housing), F-33076 Bordeaux, France.

[*] These two authors contributed equally to this work.

Address correspondence to:

Dr. Emmanuel Richard, Université Victor Segalen Bordeaux 2, INSERM U1035, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France. Email: Emmanuel.Richard@u-bordeaux2.fr

Phone: 33 5 57 57 13 78

Fax: 33 5 57 57 13 74

Run title: Proteasome inhibition in Gunther's Disease

Key words: proteasome inhibitor, congenital erythropoietic porphyria, misfolding protein, bortezomib.

ABSTRACT.

Congenital erythropoietic porphyria (CEP) is a rare autosomal-recessive disorder characterized by a deficiency in uroporphyrinogen III synthase (UROS) resulting to massive porphyrin accumulation in blood cells, responsible for haemolytic anemia and skin photosensitivity. Among the 25 missense mutations actually described in CEP patients, C73R and P248Q mutations are responsible for a profound UROS deficiency and are usually associated with a sever clinical phenotype. Through the analysis of EGFP-tagged versions of UROS enzyme we showed that both UROS mutants are equally destabilized and triggers premature degradation in mammalian cells via the proteasome but not the lysosome pathway. Congenital erythropoietic porphyria mice (*UROS* $^{P248Q/P248}$) were treated with bortezomib, a clinically approved proteasome inhibitor. We observed a reduced porphyrin accumulation in circulating red blood cells and reversion of the skin photosensitivity. These results suggest that the stabilization of several UROS mutants by proteasome inhibitors or chaperone therapy may significantly improve the disease phenotype in CEP patients.

INTRODUCTION.

Congenital erythropoietic porphyria (CEP, [MIM 263700]) or Günther's disease, is a rare autosomal recessive disease resulting from markedly deficient uroporphyrinogen III synthase enzymatic activity (UROS, EC 4.2.1.75). UROS catalyse the cyclization of the linear tetrapyrrole hydroxymethylbilane to produce uroporphyrin III. UROS deficiency results in a specific and massive overproduction of nonphysiologic and pathogenic type I isomers of uroporphyrin (URO I) and coproporphyrin (COPRO I) in bone marrow and erythroid cells. URO I is a highly photocatalytic molecule that cannot be converted to heme and accumulate in erythrocytes inducing hemolysis (Andreson et al, 2001). The released type I porphyrins are distributed throughout the body and especially in skin where it is responsible for skin lesions after sunlight exposure. The clinical severity of the anemia and cutaneous lesions is highly variable, and for some patients, prognosis is poor, with death in early life or in neonatal period (Katugampola et al, 2012). Classical treatments are only symptomatic and unsatisfactory. General recommendations include minimal exposure to the sun, avoidance of trauma to the skin and careful treatment of infection. Severely affected patients are transfusion-dependent (Anderson et al, 2001; Katugampola et al, 2012). Because the predominant site of metabolic expression of the disease is the erythropoietic system, bone marrow transplantation (BMT) represents a curative treatment for patients with severe phenotypes, as long as human leucocyte antigen (HLA)-compatible donor is available (Richard et al, 2008). As interesting alternative strategy, we have successfully used autologous hematopoietic stem cells (HSC) gene therapy with integrative lentivectors in a murine model of CEP (Robert-Richard et al, 2008). However, serious oncogenic and abnormal proliferation events were observed in several gene therapy clinical trials (Wu et al, 2011). Pharmacological therapeutic approaches are actively pursued for many genetic diseases, based on the understanding of the protein dysfunction mechanism. The molecular study of the *UROS* gene in CEP patients highlighted a

variety of mutations, spreading along the 10 exons, including missense or nonsense mutations, splicing defects and large deletions/insertions. Mutations in the erythroid-specific promoter region of the *UROS* gene were also described (Solis et al, 2009). In disease related to protein dysfunction, it is diagnostically and therapeutically essential to understand the multiple mechanisms that relate the specific mutants with the pathology. The degree of impairment of UROS activity with the concomitant accumulation of photoreactive UROI and derived porphyrins may correlate with the severity of the CEP disease (To-Figueras et al, 2011). However, striking deviations to the genotype/phenotype correlation were observed in CEP, suggesting additional mechanisms in the pathophysiological process (Ged et al, 2004). Recently, additional ALAS2 gain-of-function mutations in CEP patients presenting the same UROS genotype was demonstrated to exacerbate the disease phenotype by amplifying the URO I and COPRO I accumulation in erythrocytes (To-Figueras et al, 2011). Considering abnormal UROS enzymatic activity levels in CEP patients, we considered the mechanisms of protein alterations due to inherited mutations. At the protein level, some of the defects may alter the catalytic machinery of the enzyme, whereas other mutations can undermine the stability of the folded conformation. In a recent study, wild-type and 25 misense UROS mutants previously described in CEP patients were expressed in Escherichia *Coli* and specific enzymatic activities as well as unfolding kinetics wer measured (Fortian et al, 2009). Interestingly, most of the mutants showed a reduction in protein yield recovery as compared with WT UROS, probably due to altered protein stability. A functional analysis of the UROS mutants indicated that the very low enzymatic values are mainly due to a drop in the expression (and purification) yield instead of alterations in intrinsic specific enzymatic activity of the mutants. Some mutant subset (ex. S47P) retaining a near complete UROS enzymatic activity. Genetic mutations can lead to mis or unfolded protein harboring reduced thermodynamic stability. Furthermore, unfolded protein accumulation is responsible for a reticulum endoplasmic (RE) stress and induces an unfolded protein response (UPR) that attenuates protein translation and enhances proteasomal degradation of abnormal proteins

(Ellgaard and Helenius, 2003). These results suggest that recovery of protein stability *in vivo* should be considered as a possible therapy because it would also imply an increase in intracellular enzymatic activity. The two missense C73R and P248Q UROS mutants are retrieved with a higher frequency in CEP patients (Ged et al, 2009). The C73R mutant is found in approximately 30% of disease alleles found in CEP patients from Caucasian origin. Structural studies and modeled complexes indicate that Cys-73 is far from the enzyme-substrate interaction site, suggesting that it does not play a critical role in catalyses (Schubert et al, 2008). Consistent with this idea, it was shown recently that, *in vitro*, purified recombinant human C73R-UROS partially retains its catalytic activity (30% versus WT) but suffer from rapid irreversible unfolding aggregation (Fortian et al 2009, 2011). In a cellular reporter assay, it was demonstrated that the mis-folded C73R mutant is targeted to the proteasomal degradation pathway, and becomes undetectable in human cells (Fortian et al 2011). Interestingly, the treatment with proteasome inhibitor (MG132) could restore the C73R protein level. In the present paper, we have extended these promising results to the P248Q UROS mutant *in vitro* and *in vivo* using in a knock-in CEP mouse model (*Uros*$^{P248Q/P248Q}$ CEP mice). Using EGFP-tagged versions of UROS, we showed that both C73R and P248Q mutants are unstable proteins that become rapidly degraded in K562 cells. We rescued both C73R and P248Q UROS mutant expression after treatment with proteasome but not lysosome inhibitors in transfected human erythroleukemic cells. Furthermore *Uros*$^{P248Q/P248Q}$ CEP mice were treated with the clinically qualified drug bortezomib (Velcade®) to evaluate the therapeutic potential of proteasomal inhibition *in vivo*. Following a 9-week period of repeated bortezomib injection, we observed a significant decrease of uroporphyrin accumulation in circulating red blood cells (RBC) and urine accompanied with the disappearance of skin photosensitivity in CEP mice. We demonstrate here for the first time that a pharmacological approach could be successfully used to modulate the expression of the CEP disease phenotype *in vivo*. These results pave the way for the development of pharmacological drugs (ex.

chemical chaperones) that would stabilize UROS mutants in order to improve the clinical phenotype, and especially skin lesions in CEP patients.

RESULTS.

C73R and P248Q UROS mutations lead to enhanced protein degradation by the proteasome pathway in mammalian cells.

In a recent study, the C73R mutation was associated with enhanced UROS degradation in mammalian cells, accounting for the almost undetectable UROS activity observed in CEP patients with the *UROS*$^{C73R/C73R}$ genotype (Fortian et al, 2011). In order to compare the consequences of C73R and P248Q mutation on intracellular UROS stability, we have generated C-terminal EGFP-tagged versions of WT, C73R and P248Q mutants (named here after EGFP-WT, EGFP-C73R and EGFP-P248Q). The mammalian vector pEGFP-C3 was used as a control for transfection and all vectors carried the gene encoding neomycin phosphotransferase II (NPTII). We developed human erythroleukemic cells (K562) stably expressing EGFP-tagged UROS after neomycin selection and the level of ectopically expressed proteins was analysed by flow cytometry (Figure 1). A significant EGFP expression was observed in control pEGFP-C3 or EGFP-WT (47% and 31% EGFP^{+} cells respectively) as compared with untransfected cells (Figure 1). A slight decrease of EGFP fluorescence intensity was observed with EGFP-WT as compared with pEGFP-C3, probably due the conformational modification bring related to the fusion with the UROS protein. The introduction of C73R or P248Q misense mutation in the UROS constructs led to a massive drop of EGFP expression in stably transfected K562 cells. We then investigated the contribution of several protein degradation pathways on intracellular P248Q behaviour. K562 cells stably expressing EGFP-UROS (WT, C73R or P248Q UROS), were incubated during 18 hours with proteasome (MG132, bortezomib) or lysosome (bafilomycin, chloroquine) inhibitors (Figure 1). Treatment with chloroquine or bafilomycin, potent inhibitors of the endosomal-lysosomal pathways, does not significantly improve EGFP-WT expression in stably transfected K562 cells (Figure 1). On the contrary, proteasome inhibitors moderately

increased EGFP-WT expression (1.5 fold increase as compared with DMSO treated cells), suggesting that normal UROS degradation is at least partially mediated by the proteasome pathway. On the other hand, proteasome inhibitors (bortezomib or MG132) increased EGFP-C73R and EGFP-P248Q expression in a dose-dependent manner in K562 stably transfected cells (up to 53-fold and 30-fold increase as compared with DMSO for C73R and P248Q respectively) (Figure 1).

Then, human fibroblasts were transiently transfected with EGFP-UROS plasmids to evaluate UROS mutant protein behaviour in epithelial cells. As observed in K562 cells, no EGFP signal was detected for EGFP-C73R and EGFP-P248Q (1% and 1.5% $EGFP^+$ cells for C73R and P248Q mutants respectively) whereas 30 to 40% EGFP positive cells were observed for WT-EGFP and pEGFP-C3 constructs (Figure 2A). As expected, EGFP-UROS mutants were partially rescued after treatment with 0.1nM bortezomib (9 and 12% $EGFP^+$ cells for C73R and P248Q mutants respectively). Because proteasome inhibitors could lead to abnormal protein aggregation in cells, we analysed the intracellular localization of EGFP-tagged UROS (WT, C73R and P248Q) in human fibroblasts by fluorescence microscopy (Figure 2B). A cytosolic staining was observed for EGFP-WT whereas a partial aggregated pattern was observed for both EGFP-C73R and EGFP-P248Q UROS in epithelial cells.

Taken together, these results indicated that C73R and P248Q mutations lead to unstable mutant UROS that is quickly degraded in the cell, in agreement with the results suggested by previous thermodynamical and structural analysis (Fortian et al, 2009).

Treatment with bortezomib significantly improves porphyrin accumulation in $UROS^{P248Q/P248Q}$ CEP mice.

We then sought to determine whether bortezomib delivery affects porphyrin accumulation and rescue the porphyric phenotype in CEP *UROS* $^{P248Q/P248Q}$ mice. First, we performed a dose-

response analysis of proteasome inhibition *in vivo* following bortezomib injection in congenic BalbC WT mice. Previous studies from oncogenic research had shown in different mouse models that the therapeutic window is quite narrow and is comprised between 0.7 and 1.3 mg/kg bortezomib. After a single bortezomib injection (from 0.2 to 2 mg/kg i.p.) we observed a dose-dependent proteasome inhibition in red blood cells (RBCs), reaching a maximum of 70% inhibition (Supplementary figure 1). A kinetic analysis of proteasome inhibition revealed that the 26S proteasome recover rapidly after administration and returned to normal values in 48h (Supplementary figure 1). Based on these results and considering the potential neuronal toxicity of chronic bortezomib administration, 6 to 10 weeks-old CEP and normal mice were given 0.5 or 1mg/kg every 48h for 9 consecutive weeks. The body weight was measured every week to detect a potential drug side effect on mice development (Supplementary figure 2). We did not observed any growth differences between BTZ-treated and untreated mice during the 9-weeks period, suggesting an absence of toxic adverse effect due to long-term bortezomib administration in mice.

Uroporphyrin I accumulation is a hallmark of the disease and lead to as spontaneous fluorescence of RBCs (fluorocytes) that can be monitored by flow cytometry analysis. We observed a progressive decrease of porphyrin accumulation in peripheral RBCs after serial bortezomib injection as revealed by the drop of fluorocytes over time (Figure 3A). Finally, a 50% correction level was obtained after a 9-weeks period of treatment using both doses (0.5 mg/kg or 1mg/kg). Nine weeks after starting bortezomid injection, we obtained a 63% and 43% reduction of porphyrin accumulation in RBCs of CEP mice treated with 0.5 mg/kg and 1 mg/kg respectively as compared with untreated mice (Figure 3B and Table 1). Uroporphyrin accumulates also in bone marrow (BM) and liver tissues of CEP mice (Table 1). A X to Y % decrease of porphyrin accumulation was observed in the liver and BM cells from CEP mice treated with bortezomib. Interestingly, bortezomib administration did induce heme biosynthesis pathway modification as indicated by normal porphyrin values in WT mice (Figure 3 and Table 1). We next analysed the UROS enzymatic activity recovery in RBCs,

BM and liver from bortezomib treated mice. These results demonstrate that partial proteasome inhibition *in vivo* is able to significantly decrease circulating porphyrin accumulation in CEP *UROS*$^{P248Q/P248Q}$ mice.

Bortezomib administration improves skin photosensitivity but not haemolytic anemia in UROS$^{P24Q/P248Q}$ deficient mice.

The massive URO I porphyrin accumulation results in haemolytic anemia and skin photosensitivity features in CEP *UROS* $^{P248Q/P248Q}$ mice (Robert-Richard et al, 2008). We then investigated the consequences of bortezomib administration on skin photosensitivity in porphyric mice. We previously demonstrated that UVA light exposure (8J/cm^2) results in a severe skin photosensitivity with macroscopic lesions of the cutaneous barrier in CEP *UROS*$^{P248Q/P248Q}$ mice (Robert-Richard et al, 2008). Skin photosensitivity was evaluated in untreated and bortezomib-treated WT and CEP mice (Figure 4). A skin photosensitivity assay revealed macroscopic lesions on depilated dorsal skin of untreated CEP mouse while no alteration could be observed in bortezomib-treated and untreated WT mice. The skin photosensitivity was correlated to massive accumulation of porphyrin in peripheral RBCs (Figure 4). The treatment with bortezomib resulted in a significant improvement of the skin photosensitivity in CEP *UROS* $^{P248Q/P248Q}$ (Figure 4). Some CEP *UROS* $^{P248Q/P248Q}$ treated mice were found completely free of macroscopic skin lesions. These results correlated to a drop of porphyrin accumulation in RBCs, with up to 4-fold reduction in fluorocyte level as compared with untreated CEP mice (Figure 4A).

We then investigated the effects of long-term proteasome inhibitors administration on haematological parameters. CEP mice presented with regenerative haemolytic anemia characterized by a drop of haemoglobin level, haematocrit, RBC number and spleen enlargement (Table 2) (Ged et al, 2006). Bortezomib administrated during a 9-week period did not induce toxicity on the hematopoietic system as indicated by peripheral blood hematopoietic cell count in Bortezomib-treated versus saline-treated mice (Table 2).

However, bortezomib administration failed to improve anemia in CEP *Uros* $^{P248Q/P248Q}$ mice (Table 2). This result probably relies to the moderate metabolic correction obtained in erythroid cells. As described previously, a 40 to 60% reduction of porphyrin accumulation in RBCs did not improved anemia in CEP *Uros* $^{P248Q/P248Q}$ mice treated by hematopoietic stem cell transplantation (Robert-Richard et al, 2008).

DISCUSSION.

Congenital erythropoietic porphyria is a genetic disease characterized by uroporphyrinogen III synthase (UROS) deficiency leading to heme biosynthesis impairment and accumulation of toxic porphyrins in the erythroid lineage. So far 43 disease-causing mutants were reported in CEP and most of them (25/43) are missense mutations (Ged et al, 2009). Misense mutations often result in the inability of protein to fold efficiently into their native conformation, that is the most energetically favorable state, thus leading to either accumulation of toxic aggregates (with a gain of function effect) or to increased degradation (with loss of metabolic or cellular functions) (Chaudhuri et al 2006, Arakawa et al, 2006). It has been shown that UROS is a thermolabile enzyme whose suffer from irreversible denaturation over time (Fortian et al, 2012). Biophysical analysis of the mutants has clearly shown that thermodynamic destabilization is the main mechanism by which the enzyme loss its activity upon mutation (Fortian et al, 2009). The p.Cys73Arg is a recurrent misense mutation representing 30% of the mutant alleles in CEP (Ged et al, 2009). In a recent study, it was demonstrated that the sever C73R enzymatic deficiency was due associated with a folding defect and premature intracellular degradation by the proteasome pathway (Fortian et al, 2009 and 2010). This study based on reporter gene assays analysed EGFP or c-Myc-fused C73R mutant expression *in vitro* in stably-transfected epithelial cell lines. In the present study, we extended the analysis to the P248Q UROS mutant using both transfection of reporter gene assays in erythroleukemic cells and *in vivo* in a murine model of the disease (CEP *Uros* $^{P248Q/P248Q}$ mice). We showed that both C73R and P248Q mutations are associated with enhanced proteasome degradation in human erythoid K562 cells. Treatment of stably-transfected cells with two different proteasome inhibitors (bortezomib and MG132) but not lysosmal inhibitors (bafilomycin and chloroquine) could restore C73R and P248R expression *in vitro*. When performed with lysosome inhibitors, CT3R and P248Q could not be rescued and these results explain that such treatments failed to improve the disease in CEP patients (Moore et al, 1978).

We have previously generated a knock-in CEP mouse model by introducing the P248Q mutation in ES cells using homologous recombination (Ged et al, 2006). As a proof of concept, we then evaluated the therapeutic potential of proteasomal inhibition in *UROS*$^{P248Q/P248Q}$ CEP mice. We used Velcade® (bortezomib, PS-341), a proteasome inhibitor that belongs to the family of a reversible peptide boronate blocking the chymotrypsin-like activity of the proteasome. Velcade® is already approved by the Food and Drug Administration and the European Medicines Agency for treatment of multiple myeloma and mantle cell lymphoma and its side effects have been already explored and managed. We first performed preliminary experiments on WT mice to determine the optimal dose and timing of Velcade® injection to reach optimal proteasome inhibition *in vivo* in the erythroid lineage. As described previously, we found a transient proteasome inhibition in RBCs after a single administration of Velcade® *in vivo*. While a maximum inhibition was obtained during the two first hours after injection, proteasome activity returns to basal levels at 48h. Because the BM erythroid lineage and mature RBCs express high level of cytoplasmic UROS protein, these results highlighted the challenge of preventing long-term UROS degradation *in vivo* using proteasome inhibitors. In order to mimic a clinical trial, Velcade® was administrated into *UROS* $^{P248Q/P248Q}$ CEP every two days at a dose of 0.5 or 1 mg/kg. Considering the relatively long half-life of RBCs *in vivo* (60 days), Velcade® was administrated during a 9-weeks period. This is to our knowledge the longest period of uninterrupted proteasome inhibitor administration in mice for the therapeutic purpose of a genetic disease. Proteasome inhibition was successfully used to correct protein misfolding in several genetic diseases such as Osteogeneis Imperfecta, Hyaline Fibromatosis Syndrome and muscular myopathies (Gioia et al, 2010; Deuquet et al, 2011; Azakir et al, 2012). Several structural abnormalities of the sarcolemma are characterized by muscle dystrophy and could be salvaged in primary cultures or in mouse models upon treatment with proteasomal inhibitors (Gazzero et al, 2010; Kwon et al, 2011). Gazzero and collaborators injected Velcade® every 72h during a 2 consecutive weeks in MDX mice, and could restore the membrane expression of dystrophin as well as

dystrophin glycoprotein complex members and improve the dystrophic phenotype (Gazzerro et al, 2010). In a spinal muscular atrophy (SMA) mouse model, a daily injection of Velcade® (0.15 mg/kg), from day 5 to day 13 of life increased the level of survival motoneuron 1 protein (SMN) and improved motor function (Kwon et al, 2011).

We observed a progressive decrease of porphyrin accumulation in peripheral RBCs of CEP mice treated with 0.5 mg/kg Velcade®. However, we failed to improve the therapeutic efficiency by increasing the dose of proteasome inhibitors (1 mg/kg), and a threshold of 40 to 60% decreased porphyrin accumulation was reached. This result probably relies to the transient effect of proteasome inhibition *in vivo*, in association with the sustained erythroid cells production in mice. However, this partial metabolic correction allowed a significant skin photosensitivity phenotype improvement in CEP mice, with some animal exempt of skin damages in skin photosensitivity assay. These results are in accordance with our previous results of hematopoietic stem cell gene therapy in CEP mice (Robert-Richard et al, 2008). We have previously determined that at least 50% reduction of fluorocytes was required to convert a severe to a mild or moderate skin photosensitivity phenotype in this mouse model of CEP.

However, we failed to improve the feature of haemolytic anemia by proteasome inhibition in *UROS*$^{P248Q/P248Q}$ CEP. This is probably relies to the moderate reduction level of porphyrin accumulation observed in peripheral RBCs after Velcade® administration in CEP mice. We have previously determined that at least 75% decrease of RBCs-porphyrin content should be obtained to moderately improve the haemolytic anemia pathological process (Robert-Richard et al, 2008).

As a proof of principle, we demonstrated here that a treatment aiming at reversing the stability defect of UROS mutants could constitute a new therapeutic option for CEP. However, we showed that efficient and long-term proteasome inhibition is difficult to obtain *in vivo*, especially in the erythroid lineage, even with clinical grade drugs. Furthermore, such unspecific inhibition of abnormal protein degradation could lead to serious adverse toxic effects, especially in central nervous system, and would not constitute the treatment of choice

for CEP (Mujtaba and Dou, 2011). Therapeutic strategies aiming at modulate protein folding using pharmacological chaperones has emerged for many genetic diseases. The endoplasmic reticulum (ER) has a quality control for newly synthesized proteins based on both molecular chaperones that facilitate a correct protein conformation and sensors that recognize and tag incompletely folded proteins. Incorrectly folded proteins are retro-translocated in the cytosol and degraded by the ER-associated degradation (ERAD) machinery (Allgaard and Helenius, 2003). Pharmacological chaperone therapy (PCT) is based on the concept that ligands may assist the folding of mutated enzymes that retain some catalytic activity and prevent their recognition by the quality control system. PCT-based therapeutic approaches have been proposed for a number of loss-of-function genetic disorders such as cystic fibrosis (Wang et al, 2008), phenylketonuria (Pey et al, 2008), hyperoxaluria type I (Hopper et al, 2008) and lysosomal storage disorders (Parenti et al, 2009). A number of therapeutic discovery and developments efforts are underway to develop drugs that repair the underlying molecular defects in CFTR caused by different mutations in cystic fibrosis. Recently, a CFTR potentiator agent (ex. Ivacaftor) was described that improve chloride transport by potentiating the open probability of the G551D-CFTR channel (Van Goor et al, 2009). In phase II clinical trials, Ivacaftor was associated with marked improvements in lung function at 2 weeks that were sustained through 48 weeks (Ramsey et al, 2011). The discovery of pharmacological molecules able at stabilizing UROS mutants *in vivo* would represent a promising therapeutic approach for most patients with congenital erythropoietic porphyria.

MATERIAL AND METHODS.

Mice and bortezomib injection.

Wild-type BALB/cByJCrl mice (hereafter BALB/c) were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). Congenital erythropoietic porphyria (CEP) *knock-in* mice (*Uros*$^{P248Q/P248Q}$) were previously described (Ged et al, 2006). Congenic heterozygous *Uros*$^{P248Q/N}$ mice strains were backcrossed to the BALB/c inbred background for more than 10 generations. Mutant mice were maintained in the Animal Facility of the university Bordeaux Segalen. According to standard husbandry procedure, they were maintained in filter-top cages with artificial fluorescent light, under a 12-hour light/dark cycle. They received unlimited amounts of autoclaved water and irradiated food pellets. Mice (6 to 10 weeks-old) were treated with intraperitoneal (i.p.) injection of 0.5 or 1 mg/kg bortezomib (Velcade®) (or saline) diluted in phosphate buffer saline. Velcade was administrated every 48h for 9 consecutive weeks and the mice were weighted before each injection.

DNA constructs.

We generated mammalian expression plasmids encoding human UROS (wild type, C73R and P248Q mutants) fused at the C terminus end of EGFP protein (pEGFP-C3 vector backbone, Promega). The complete open reading frame was amplified by PCR from bacterial plasmids pBSK expressing WT, C73R or P248Q versions of the UROS and cloned into TEasy vector for DNA sequencing (Promega). Primers were designed to append an EcoRI endonuclease restriction site upstream of the kozak sequence and a SalI site directly after the stop codon of the UROS cDNA. The PCR products were gel-purified and cloned in the EcoRI-SalI sites of the pEGFP-C3 vector.

Cell culture and reagents.

Alll media and reagents for cell culture were purchased from Invitrogen. Primary fibroblasts were derived from a CEP patient (*UROS*$^{P248Q/P248Q}$) skin biopsy and grown in DMEM medium supplemented with fetal calf serum (10%), penicillin 100 U/ml and streptomycin (0.1mg/ml). Normal fibroblasts were derived from skin biopsy obtained after breast reduction surgery and used as a control in the experiments. Human erythroleukemic cells (K562) were maintained in RMI medium supplemented with fetal calf serum (10%) and penicillin/streptomycin. When indicated, cells were cultured during 16h in the presence of appropriate concentration of MG132 (Sigma-Aldrich), Bortezomib (Velcade®), bafilomycin (Sigma-Aldrich) or chloroquine (Sigma-Aldrich).

Transfection and generation of stably transfected mammalian cell lines.

For stable transfection, 1.10^6 K562 cells were electroporated (Amaxa™ Nucleofector™ Technology, Lonza, USA), with 5µg of control pEGFP-C3 or N-terminal EGFP-tagged UROS (WT, C73R or P248 mutant) encoding plasmids. Fourty-eight hours after transfection, the medium was changed to complete RPMI medium containing 1g/l G418. About 3 weeks later, G418-resistant K562 cells expressing EGFP or EGFP-tagged UROS (WT, C73R or P248Q) were selected to perform this study.

Normal fibroblasts were transiently transfected by electroporation with EGFP-tagged UROS (WT, C73R or P248Q) encoding plasmids. Thirty-six hours after transfection the medium was changed and fibroblasts were treated with 0.1nM bortezomib or saline for additional 16 hours. EGFP expression was analysed by fluorescence microscopy (Nikon Eclipse Ti, Japan).

Flow cytometry analysis.

FACS analyses were performed on the FACS Canto II (BD Biosciences, France). Peripheral blood porphyrin-accumulating RBCs (fluorocytes) were excited at and emitted fluorescence was detected at in the FL-3 channel. EGFP expression was detected after excitation at and fluorescence emission at.

Hematologic Analysis

Blood was collected by puncture of the orbital sinus. Total hemoglobin, red cell counts, and hematocrit were measured on an Animal Blood Counter (vetABC, SCIL, France).

Biochemical Measurements

The quantification of the different porphyrins and the uroporphyrin isomers in urines were done by reverse-phase highperformance liquid chromatograph (HPLC).

Skin photosensitivity assay.

Reversal of skin photosensitivity was assayed as previously described after a 9-weeks period of Velcade administration in mice (Robert-Richard et al, 2008, Richard E et al, 2001). Dorsal mouse skin was depilated to render mouse skin accessible to irradiation, and the skin was irradiated at total dose of 8J/cm^2 UVA irradiation (materiel).

AUTHORS CONTRIBUTION

JMB, YD and ER designed and performed the research; PC performed animal experiments, ML performed biochemical analysis, CG and HDV provide expertise and discuss the results, ER supervised the project and wrote the manuscript.

AKNOWLEDGMENTS

We would like to thanks the personal of URC (unit for reconstitution of chemotherapy agents) at the CHU Bordeaux for providing us Velcade. Our laboratory is supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM), the Agence Nationale de la Recherche (ANR), the LABEX “Globule rouge”, and the Institut national de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM).

The authors declare that they have no conflict of interest.

FOR MORE INFORMATION.

Portal for rare disease and orphan drugs.

http://www.orpha.net/

European porphyria initiative

http://www.porphyria-europe.com/

FIGURE LEGENDS

Figure 1. P248Q and C73T UROS mutants trigger premature degradation by the proteasome pathway in human erythroid K562 cells.

Human erythroleukemic K562 cells were stably transfected with plasmids expressing EGFP fused at the N-terminus of WT, C73R or P248Q UROS cDNA. The pEGFP-C3 plasmid was used as a control. Stably-transfected cells were treated with DMSO or the indicated concentration of lysosome (Bafilomycine, chloroquine) or proteasome (MG132, bortezomib) inhibitors for 18 hours. EGFP expression was monitored by flow cytometry analysis. Results are expressed as mean of 3 independent experiments and error bars represent the standard deviation.

Figure 2. Subcellular localization of EGFP-UROS in human fibroblasts after proteasome inhibition.

A. Flow cytometry analysis of EGFP-UROS expression in human fibroblasts transiently transfected with EGFP-UROS plasmids. Twenty four hours after transfection, cells were incubated with bortezomib (0.1 nM) or DMSO during 18 hours and analysed by flow cytometry.
B. Confocal microscopy analysis of EGFP-UROS distribution in transiently-transfected fibroblasts treated with 0.1 nM bortezomib. GFP fluorescence (green) and DAPI nuclear staining (blue) of representative cells are shown.

Figure 3. Reduced porphyrin accumulation in CEP *Uros*$^{P248Q/P248Q}$ mice treated with bortezomib.

A. Porphyrin-accumulating red blood cells (named fluorocytes) were analysed by flow cytometry in wild type and CEP *Uros*$^{P248Q/P248Q}$ mice treated with 0.5 or 1mg/kg bortezomib (BTZ). Bortezomib was injected every 48h over a 9-weeks period and

control mice received saline. Results are expressed as mean of individual mice and error bars represent the standard deviation. Asterisks represent significant difference with respect to control CEP mice ($p<0.01$).

B. Porphyrin accumulation was quantified in the peripheral blood of wild type and CEP *Uros*$^{P248Q/P248Q}$ mice treated with 0.5 or 1mg/kg bortezomib (BTZ). Results are expressed as mean of individual mice and error bars represent the standard deviation. Significant difference versus WT (*, $p<0.0001$) or control CEP mice (#, $p<0.001$).

Figure 4. Reversion of the skin photosensitivity in CEP *Uros*$^{P248Q/P248Q}$ mice treated with bortezomib.

A. Porphyrin-accumulating red blood cells (named fluorocytes) were analysed by flow cytometry in wild type and CEP *Uros*$^{P248Q/P248Q}$ mice treated with 0.5 or 1mg/kg bortezomib (BTZ). Individual mice are represented by a circle.

B. Mice were depilated and subjected to UVA irradiation (8J/cm^2). Macroscopic observations of representative primary mice 5 days following UVA irradiation.

Supplementary figure 1. Dose-dependent inhibition of proteasome activity was evaluated in RBCs from normal mice following a single bortezomib injection.

A. The proteasome activity was quantified in peripheral RBCs from mice previously (2h) injected with a single dose of bortezomib (0.2 to 2 mg/kg). A dose-dependent inhibition of the proteasome activity was observed *in vivo*.

B. The proteasome activity was quantified over time (from 2h to 48h) in peripheral RBCs from mice injected with a single dose of bortezomib (0.5 mg/kg). Proteasome activity completely recovers within 2 days following injection of bortezomib.

Supplementary figure 2. Bortezomib injection does not induce toxicity in WT and CEP mice.

Wild type and CEP mice were treated with bortezomib (0.5 or 1 mg/kg) every 2-days and weighted over a 9-weeks period. We did not observe toxicity such as cachexia in mice treated with proteasome inhibitors.

Table 1. Metabolic and skin photosensitivity parameters in WT and CEP mice treated with proteasome inhibitors.

Table 2. Hematological parameters in WT and CEP mice treated with proteasome inhibitors.

REFERENCES.

Anderson K, Sassa S, Bishop D, Desnick R. The porphyrias. In: Eds Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS and Valle D (2001) The Metabolic Basis of Inherited Diseases (8th edition). New York, McGraw-Hill pp 2991-3062.

Arakawa T, Ejima D, Kita Y, Tsumoto K (2006) Small molecule pharmacological chaperones: From thermodynamic stabilization to pharmaceutical drugs. Biochim Biophys Acta, 1764 :1677-1687

Azakir BA, Di Fulvio S, Kinter J, Sinnreich M (2012) Proteasomal inhibition restores biological function of mis-sense mutated dysferlin in patient-derived muscle cells. J Biol Chem 287: 10344-10354

Chaudhuri TK, Paul S (2006) Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches. FEBS J 273: 1331-1349

Deuquet J, Lausch E, Guex N, Abrami L, Salvi S, Lakkaraju A, Ramirez MC, Martignetti JA, Rokicki D, Bonafe L, Superti-Furga A, van der Goot FG (2011) Hyaline fibromatosis syndrome inducing mutations in the ectodomain of anthrax toxin receptor 2 can be rescued by proteasome inhibitors. EMBO Mol Med 3 :208-221

Ellgaard L, Helenius A (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. Nat Rev Mol Cell Biol 4: 181-191. Review.

Figueras J, Ducamp S, Clayton J, Badenas C, Delaby C, Ged C, Lyoumi S, Gouya L, de Verneuil H, Beaumont C, Ferreira GC, Deybach JC, Herrero C, Puy H (2011) ALAS2 acts as a modifier gene in patients with congenital erythropoietic porphyria. Blood 118: 1443-1451

Fortian A, Castaño D, Ortega G, Laín A, Pons M, Millet O (2009) Uroporphyrinogen III synthase mutations related to congenital erythropoietic porphyria identify a key helix for protein stability. Biochemistry 48: 454-461

Fortian A, González E, Castaño D, Falcon-Perez JM, Millet O (2011) Intracellular rescue of the uroporphyrinogen III synthase activity in enzymes carrying the hotspot mutation C73R. J Biol Chem 286, 13127-13133

Fortian A, Castaño D, Gonzalez E, Laín A, Falcon-Perez JM, Millet O (2011). Structural, thermodynamic, and mechanistical studies in uroporphyrinogen III synthase: molecular basis of congenital erythropoietic porphyria. Adv Protein Chem Struct Biol 83: 43-74

Ged C, Mégarbané H, Chouery E, Lalanne M, Mégarbané A, de Verneuil H. J (2004) Congenital erythropoietic porphyria: report of a novel mutation with absence of clinical manifestations in a homozygous mutant sibling. Invest Dermatol 123 : 589-591

Ged C, Mendez M, Robert E, Lalanne M, Lamrissi-Garcia I, Costet P, Daniel JY, Dubus P, Mazurier F, Moreau-Gaudry F, de Verneuil H (2006) A knock-in mouse model of congenital erythropoietic porphyria.Genomics 87, 84-92.

Ged C, Moreau-Gaudry F, Richard E, Robert-Richard E, de Verneuil H (2009) Congenital erythropoietic porphyria: mutation update and correlations between genotype and phenotype. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 55: 53-60

Gioia R, Panaroni C, Besio R, Palladini G, Merlini G, Giansanti V, Scovassi IA, Villani S, Villa I, Villa A, Vezzoni P, Tenni R, Rossi A, Marini JC, Forlino A (2012) Impaired osteoblastogenesis in a murine model of dominant osteogenesis imperfecta: a new target for osteogenesis imperfecta pharmacological therapy. Stem Cells, 30: 1465-1476

Hopper ED, Pittman AM, Fitzgerald MC, Tucker CL (2008) In vivo and in vitro examination of stability of primary hyperoxaluria-associated human alanine:glyoxylate aminotransferase. J Biol Chem 283: 30493-30502

Katugampola RP, Anstey AV, Finlay AY, Whatley S, Woolf J, Mason N, Deybach JC, Puy H, Ged C, de Verneuil H, Hanneken S, Minder E, Schneider-Yin X, Badminton MN (2012) A management algorithm for congenital erythropoietic porphyria derived from a study of 29 cases. Br J Dermatol 167: 888-900.

Moreau-Gaudry F, Mazurier F, Bensidhoum M, Ged C, de Verneuil H (1995) Metabolic correction of congenital erythropoietic porphyria by retrovirus-mediated gene transfer into Epstein-Barr virus-transformed B-cell lines. Blood 85: 1449-1453

Mujtaba T, Dou QP (2011) Advances in the understanding of mechanisms and therapeutic use of bortezomib. Discov Med 12: 471-480.

Parenti G (2009) Treating lysosomal storage diseases with pharmacological chaperones: from concept to clinics. EMBO Mol Med 1: 268-279

Pey AL, Ying M, Cremades N, Velazquez-Campoy A, Scherer T, Thöny B, Sancho J, Martinez A (2008) Identification of pharmacological chaperones as potential therapeutic agents to treat phenylketonuria. J Clin Invest 118: 2858-2867

Richard E, Robert-Richard E, Ged C, Moreau-Gaudry F, de Verneuil H (2008) Erythropoietic porphyrias: animal models and update in gene-based therapies. Curr Gene Ther 8: 176-186

Robert-Richard E, Moreau-Gaudry F, Lalanne M, Lamrissi-Garcia I, Cario-André M, Guyonnet-Dupérat V, Taine L, Ged C, de Verneuil H (2008) Effective gene therapy of mice with congenital erythropoietic porphyria is facilitated by a survival advantage of corrected erythroid cells. Am J Hum Genet 82, 113-124

Schubert HL, Phillips JD, Heroux A, Hill CP (2008) Structure and mechanistic implications of a uroporphyrinogen III synthase-product complex. Biochemistry 47, 8648-8655

Solis C, Aizencang GI, Astrin KH, Bishop DF, Desnick RJ (2001) Uroporphyrinogen III synthase erythroid promoter mutations in adjacent GATA1 and CP2 elements cause congenital erythropoietic porphyria. J Clin Invest 107: 753-762

Moore MR, Thompson GG, Goldberg A, Ippen H, Seubert A, Seubert S (1978). The biosynthesis of haem in congenital (erythropoietic) porphyria. Int J Biochem 9: 933-938

Wang X, Koulov AV, Kellner WA, Riordan JR, Balch WE (2008) Chemical and biological folding contribute to temperature-sensitive DeltaF508 CFTR trafficking. Traffic 9: 1878-1893

Wu C, Dunbar CE (2011) Stem cell gene therapy: the risks of insertional mutagenesis and approaches to minimize genotoxicity. Front Med 5: 356-371

Discussion
-
Perspectives

I – Protoporphyrie érythropoïétique et greffe de moelle osseuse

La protoporphyrie érythropoïétique (PPE) est une maladie modèle étudiée au laboratoire depuis plusieurs années. Elle est caractérisée par une photosensibilité cutanée et une atteinte hépatique sévère liée au dépôt de protoporphyrine IX intrahépatique (hépatocytes et canaux biliaires) entraînant une cholestase puis une fibrose hépatique (chez 1 à 10% des patients environ). Dans les cas les plus sévères, les patients nécessitent une greffe de foie.

A- Thérapie cellulaire dans un modèle murin de PPE

De considérables avancées dans la compréhension de la transmission de la maladie ont été réalisées ces dernières années par la découverte d'un allèle sauvage hypomorphe qui, si il est associé à un allèle délétère, entraîne l'apparition la maladie (Gouya *et al*. 2002). La modélisation de protocoles de thérapies cellulaire et génique, au laboratoire comme ailleurs, s'est faite grâce à l'établissement d'un modèle murin généré par mutagenèse aléatoire (Tutois *et al*. 1991). Ce modèle déclare une fibrose hépatique et donc un tableau clinique complet de la maladie humaine. Des études thérapies cellulaire et génique ont démontré l'efficacité de ces approches thérapeutiques dans le modèle murin de la maladie (augmentation de l'activité enzymatique dans la moelle osseuse et dans les érythrocytes, diminution des fluorocytes et de la protoporphyrine IX dans le plasma, diminution ou disparition de la photosensibilité cutanée (Pawliuk *et al*. 1999 ; Fontanellas *et al*. 2000 ; Richard *et al*. 2001 ; Richard *et al*. 2003)). Cependant, aucune réversion complète du phénotype hépatique n'a pu être réalisée malgré la mise en évidence d'une amélioration des paramètres hépatiques dans certaines études de thérapie cellulaire pratiquées chez le jeune animal (Fontanellas *et al*. 2000 ; Garcia-Bravo *et al*. 2009). Dans ces travaux, une greffe de moelle osseuse a été pratiquée sur des animaux de 3-4 et 8 semaines respectivement (Fontanellas *et al*. 2000 ; Garcia-Bravo *et al*. 2009). Les taux de transaminases ainsi que les dépôts hépatiques de PPIX observés chez les souris traitées sont significativement plus faibles que ceux du modèle PPE mais sans revenir à la normale. Ces études suggèrent que l'atteinte hépatique s'installe précocement et que la greffe de moelle osseuse a été pratiquée de manière trop tardive. Une greffe de moelle osseuse précoce serait donc peut-être capable de corriger le déficit enzymatique avant l'apparition de l'atteinte hépatique.

Dans ce contexte, nous avons développé un protocole de thérapie cellulaire chez le nouveau-né, afin de corriger le déficit enzymatique avant l'apparition de la fibrose hépatique.

Pour cela, nous avons dans un premier temps déterminé la cinétique d'apparition des lésions hépatiques en sacrifiant des nouveau-nés à différents temps et en pratiquant une analyse histopathologique. De façon surprenante, les nouveau-nés accumulent de la protoporphyrine IX dans leurs globules rouges mais cette accumulation n'est pas détectable dans les hépatocytes malgré une activité enzymatique hépatique aussi faible que dans les globules rouges. La PPIX produite dans les érythrocytes du fœtus pourrait potentiellement gagner le plasma maternel en traversant la barrière placentaire et être éliminée par la mère. Ceci expliquerait l'accumulation de PPIX dans les érythrocytes (la PPIX y est synthétisée perpétuellement) et son absence dans le foie où la synthèse est beaucoup moins importante, les dépôts de PPIX nécessitant un apport de la PPIX provenant des érythrocytes. Les dépôts de PPIX dans le foie apparaissent vers le 12ème jour de vie. A partir de cet âge, l'accumulation hépatique de protoporphyrine IX débute et entraîne des changements architecturaux de plus en plus visibles avec le temps (dépôts de PPIX importants, fibrose, réaction ductulaire).

Ayant déterminé la cinétique d'apparition de l'atteinte hépatique, nous nous sommes demandé si une greffe de moelle osseuse précoce, pratiquée avant le 12ème jour de vie, permettrait d'empêcher le dépôt de PPIX dans le foie. Plusieurs protocoles de myélosuppression chez les nouveau-nés sont décrits dans la littérature. Le traitement de la mère avec une dose de busulfan de 15mg/kg injectée par voie sous-cutanée entraîne une mortalité importante des nouveaux nés (Askmyr *et al*. 2009). Une dose de 7,5mg/kg est mieux tolérée et permet la survie des nouveau-nés au détriment du chimérisme qui ne dépasse pas les 10% (Askmyr *et al*. 2009). Ces protocoles de conditionnement présentent l'inconvénient de devoir sacrifier les reproducteurs myélosupprimés à chaque portée. Nous nous sommes donc intéressés à un conditionnement chez le nouveau-né. Yoder et collaborateurs décrivent qu'une irradiation totale des nouveau-nés par une irradiation totale avec une dose importante (>7Gy - gray) entraîne une mortalité importante, un retard de croissance et un problème développemental du système nerveux central (Yoder *et al*. 1996). Si la dose est réduite à 5Gy, les nouveau-nés ont un développement normal et présentent un chimérisme au moins égal à 50%. Dans une autre étude, Carbonaro et collaborateurs montrent que des doses croissantes de 1 Gy à 4Gy chez des nouveau-nés augmentent le chimérisme mais également la mortalité de façon dose-dépendante (Carbonaro *et al*. 2008). Le traitement au busulfan semble mieux toléré par les nouveau-nés qu'une irradiation totale et permet d'observer des chimérismes importants (Carbonaro et al. 2008 ; Yoder *et al*. 1996). Pour nos travaux, nous avons donc mis au point un protocole de myéloablation chez le nouveau-né par un traitement à base de busulfan (Busilvex®) injecté par voie intrapéritonéale. Plusieurs dosages ont été testés afin d'obtenir le meilleur rapport entre une myélosuppression efficace et une faible mortalité. Le chimérisme,

très faible sans préconditionnement, augmente de manière dose dépendante avec le busulfan. La dose la plus élevée (25mg/kg) n'est pas satisfaisante de part la forte mortalité associée (50% des nouveau-nés sont morts 48 heures après traitement). La condition 2x10mg/kg s'est révélée la plus efficace permettant une greffe sur le long terme avec un très bon chimérisme et une faible mortalité. Les nouveau-nés présentant un chimérisme élevé (>80%) ont développé une hématopoïèse complète dérivée des cellules du donneur. Ils n'accumulent que peu de protoporphyrine IX dans leurs érythrocytes preuve d'une activité enzymatique de la ferrochélatase restaurée dans les cellules érythroïdes. Les souris, 21 semaines après la greffe, ne présentent aucune photosensibilité. De plus, les paramètres hépatiques sont normaux (taille du foie, transaminases, bilirubine totale) bien que l'activité de la ferrochélatase hépatique des souris greffées soient toujours très faible (pas de différence significative avec l'activité retrouvée chez des souris PPE non greffées). Ceci confirme d'une part que les dépôts de protoporphyrine conduisant à l'atteinte hépatique sont essentiellement dus à la protoporphyrine érythroïde et prouve d'autre part, que la greffe de moelle osseuse précoce suffit pour prévenir la fibrose et les lésions hépatiques.

B- Thérapie cellulaire et PPE : Aspect clinique

Les équipes ayant démontré une amélioration partielle du foie dans le modèle murin de PPE (*Fech*^{m1Pas}/*Fech*^{m1Pas}) n'ont pas pu corriger totalement la fonction hépatique car la greffe s'est pratiquée trop tardivement. Ce modèle murin reflétant la maladie humaine dans son ensemble (photosensibilité et atteinte cutanée), il est possible que les résultats de cinétique d'apparition des lésions hépatiques soient transposables à la pathologie humaine dans les cas où elle présenterait une atteinte du foie. Dans ce cas, l'éventualité d'une transplantation de moelle osseuse se discuterait en fonctions des différents scénarios de complications hépatiques (Figure 43) : la majorité des patients ne présentant pas de complication hépatique (A), la transplantation de moelle osseuse paraît inutile (1). Une minorité développe une fibrose hépatique progressive (B) qui peut conduire à une insuffisance hépatique rapide nécessitant un traitement ou parfois une greffe de foie (C). Ces patients peuvent également présenter une nouvelle cholestase sur le foie traité entraînant une insuffisance hépatique (D). Le taux de récidive élevé de l'atteinte hépatique dans la PPE suggère qu'une transplantation de moelle osseuse après correction hépatique pourrait empêcher la réapparition des lésions (2). Une greffe médullaire pourrait également prévenir une nouvelle atteinte hépatique progressive après une greffe de foie (3). La greffe de moelle osseuse est particulièrement indiquée chez les jeunes patients ayant subit une greffe de

foie compte tenu de leur importante espérance de vie et de la forte récidive de l'atteinte hépatique (4). Un faible nombre de malades développent très jeune une fibrose hépatique de progression rapide (E). Dans ce dernier cas, le traitement est intéressant si la fibrose hépatique est détectée précocement et n'est pas trop étendue (5) (Wahlin et Harper, 2010). Nos travaux accréditent ce dernier cas, en démontrant qu'une transplantation de moelle osseuse précoce peut permettre d'empêcher l'apparition des lésions.

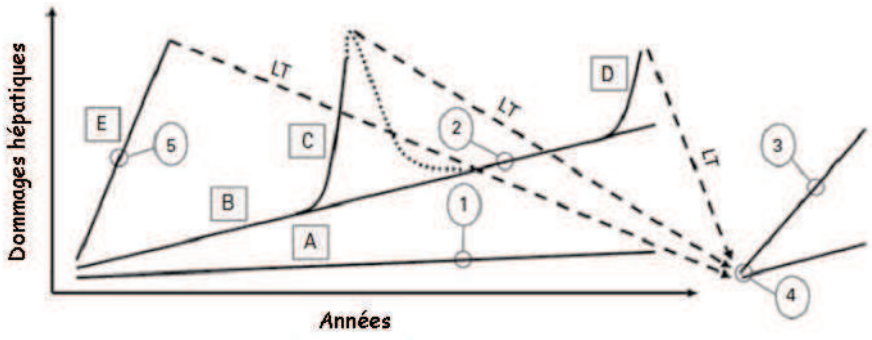


Figure 43. Schéma des différents scénarios de complications hépatiques et possibles indications pour une transplantation de moelle osseuse. Les lettres et chiffres sont expliqués dans le texte. (D'après Wahlin et Harper, 2010).

C- Relation génotype/phénotype et atteinte hépatique de la PPE

Il est donc important de suivre les patients pour juger au plus tôt de la nécessité d'une transplantation de moelle osseuse. Minder et collaborateurs ont émis l'hypothèse en 2002 d'une corrélation entre la présence d'allèles nuls et le développement d'une atteinte hépatique mais l'étude d'autres cas montrent que ces mutations sont également présentes dans des familles asymptomatiques ou déclarant une PPE sans altération du foie (Minder *et al*. 2002 ; Chen *et al*. 2002 ; Schoenfeld *et al*. 2003). La présence d'allèles nuls ne peut donc servir de marqueur pronostic de l'atteinte hépatique. L'évolution de la maladie, bien que non corrélée à la mutation en elle-même, pourrait être sous l'influence d'autres facteurs génétiques ou épigénétiques. En effet, la mutation entraîne des phénotypes de sévérités différentes selon le fond génétique de la souris modèle (Abitbol *et al*. 2005). Il est observé, chez les souris de fond génétique BALB/c et C57BL/6 portant la mutation, un retard de croissance et une diminution de la fertilité. Sur le plan physiopathologique, les souris des 3 fonds génétiques (C57BL/6JCrl, BALB/cByJCrl et SJL/JOrlCrl nommés respectivement C57BL/6, BALB/c et SJL) présentent un plasma et des urines ictériques à 3 mois (plus important chez les souris BALB/c). Bien que les SJL présentent un taux de PPIX érythrocytaire significativement plus élevé que les BALB/c et les C57BL/6, ce sont les souris BALB/c qui présentent l'anémie la

plus élevée. Cette anémie est causée par une lyse des érythrocytes engendrant une splénomégalie retrouvée essentiellement dans ce fond génétique. Le taux de bilirubine totale est plus élevé dans les souris BALB/c qui présentent vraisemblablement un catabolisme plus important de l'hème, ceci expliquant la jaunisse importante chez les souris BALB/c et moins développée chez les C57BL/6 et les SJL (Figure 44). Sur le plan hépatique, les souris présentent toutes une élévation des taux sériques de phosphatase alcaline (ALP) et des transaminases ALAT et ASAT souvent de manière plus importante dans les souris BALB/c. Ceci reflète une dysfonction hépatocytaire pour les taux de transaminases et des cellules canalaires biliaires pour la phosphatase alcaline. A 6 mois de vie, les souris BALB/c présentent une élévation des taux de bilirubine totale, d'ALP et une diminution de l'excrétion de la PPIX significativement plus importante que dans les souris des 2 autres fonds génétiques. Les souris des fonds C57BL/6 et BALB/c présentent des dépôts de PPIX plus importants que ceux observés dans les souris SJL. Le nombre de dépôts diminue au cours du temps chez les BALB/c ce qui n'est pas le cas des souris C57BL/6. Ils sont très peu nombreux dans le cas des souris SJL et diminue avec le temps. La cholestase est plus importante chez les souris BALB/c et l'hépatite chronique engendrées par ces dépôts est sévère très tôt (3 mois) chez les souris C57BL/6 et dans les souris des fonds génétiques BALB/c et C57BL/6 à 6 mois. Parallèlement, la cholestase et l'hépatite sont modérées voire faible dans le cas des souris SJL. Ces expériences montrent une différence de phénotype importante dans les trois fonds génétiques. Une analyse fonctionnelle discriminante basée sur 6 critères (nombre de globules rouges, volume moyen de la cellule, taux d'hémoglobine, de bilirubine totale, d'ALP et de fluorocytes) permet de séparer les souris en 3 groupes distincts représentant les 3 fonds génétiques étudiés démontrant ainsi que le phénotype est forment corrélé au fond génétique (Abitbol *et al*. 2005).

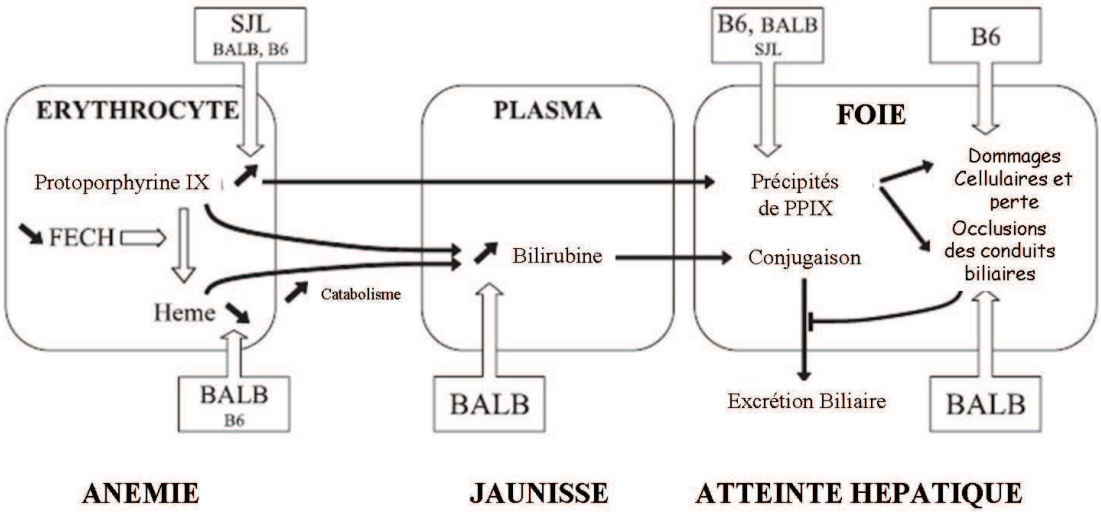


Figure 44. Schéma récapitulatif des variations de phénotypes observés entre 3 fonds génétiques murins différents porteurs de la même mutation sur le gène *Fech*.

Une explication fonctionnelle de ces différences de phénotypes est donnée par Lyoumi et collaborateurs (Lyoumi *et al*. 2011 et figure 45). Ils ont remarqué que la rétention de la PPIX dans les hépatocytes est plus importante dans les souris C57BL/6 que dans les souris BALB/c et que cette rétention était inversement corrélée avec le degré d'atteinte hépatique observée dans ces souris. Une étude préliminaire a montré que la sécrétion de sels biliaires était plus importante chez les souris BALB/c et contribuait au développement de l'atteinte hépatique dans ces souris (Meerman *et al*. 1999). En effet, la formation de micelles composées du cholestérol, des phospholipides et des sels biliaires permet d'empêcher une atteinte des cellules épithéliales biliaires par les sels biliaires libres cytotoxiques. Dans les souris BALB/c, l'augmentation du flux des sels biliaires n'est pas corrélée à une augmentation de la sécrétion de cholestérol et de phospholipides ce qui conduit à une augmentation du ratio sels biliaires/phospholipides dans les souris BALB/c comparé aux souris C57BL/6. De plus, *in vitro*, la PPIX se lie aux phospholipides et les souris BALB/c présentent une sécrétion de PPIX plus importante que les C57BL/6. Ce phénomène participerait donc à la déplétion intracanaliculaire des phospholipides par une association de ces derniers avec la PPIX. Les phospholipides ne seraient donc plus disponibles pour former des micelles, augmentant encore ainsi la proportion de sels biliaires libres cytotoxiques (Lyoumi *et al*. 2011 et figure 45). La protection contre la toxicité hépatique est également à mettre au crédit d'une diminution de la réabsorption des acides biliaires par les hépatocytes et à une augmentation de l'export des acides biliaires vers la circulation sanguine dans les souris C57BL/6. Ces modifications physiologiques sont dues respectivement à une diminution de l'expression des gènes codant pour les transporteurs permettant la réabsorption des acides biliaires et à une élévation de l'expression des gènes codant pour les transporteurs permettant l'export des acides biliaires vers le sang. Les souris C57BL/6 présentent également une diminution de la synthèse des sels biliaires ainsi que de leur sécrétion canaliculaire permettant de réguler la proportion de sels biliaires dans le ratio sels biliaires/phospholipides-cholestérol, phénomène adaptatif non retrouvé chez les souris BALB/c (Figure 45).

Ces travaux, dans le cas où ils seraient adaptables à la pathologie humaine, permettraient de détecter précocement les patients susceptibles de déclarer une atteinte hépatique (par dosage des lipoprotéines sériques et détermination de la composition de la bile des patients). La détection précoce de ces patients, avant fibrose hépatique, pourrait permettre leur traitement par greffe de moelle osseuse et ainsi éviter une insuffisance hépatique. L'étude des relations génotype/phénotype dans la PPE est à poursuivre pour découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques pouvant servir au traitement de la dysfonction hépatique ou comme

marqueur pronostic (comme dans le cas du récepteur PPARα dont l'expression est retrouvée diminuée chez les souris BALB/c et qui aurait un rôle protecteur contre la cholestase, Hays *et al*. 2005).

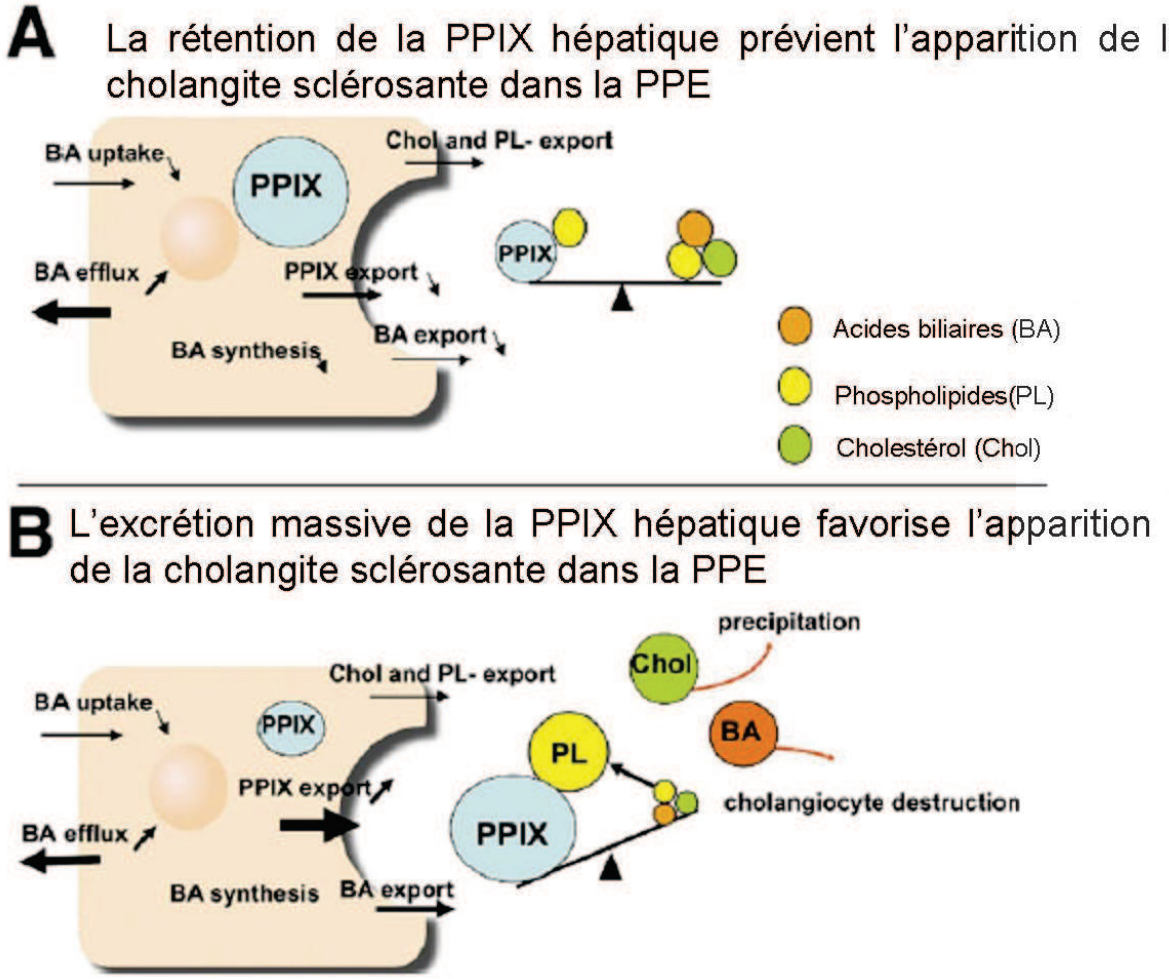


Figure 45. Schéma proposant une explication aux différences de phénotypes observés entre les souris développant une atteinte hépatique sévère (B) ou une relative protection (A). PPIX : Protoporphyrine IX. Modifié d'après Lyoumi *et al*. 2011.

II – Cellules souches pluripotentes induites et thérapie génique des porphyries érythropoïétiques

Les porphyries érythropoïétiques sont dues à un déficit de l'une des enzymes de la voie de biosynthèse de l'hème. Le déficit en UROS cause la PEC et la majorité des cas de PPE sont dus à un défaut en FECH. La transplantation médullaire est curative pour ces deux pathologies mais elle est handicapée par un manque de donneurs HLA-compatibles. La

thérapie génique est une alternative envisagée et explorée depuis plusieurs années. Les études de thérapies géniques *in vitro* et *in vivo* publiées montrent l'efficacité de ce traitement dans les deux maladies et suggèrent une potentielle application à l'homme (Mazurier *et al*. 1994 ; Kauppinen *et al*. 1998 ; Géronimi *et al*. 2003 ; Robert-Richard *et al*. 2008 pour la PEC et Pawliuk *et al*. 1999 ; Fontanellas *et al*. 2001 ; Richard *et al*. 2001, 2003, 2004 pour la PPE). Or, dans les protocoles de thérapie génique classiques, deux inconvénients majeurs freinent l'efficacité du traitement : le nombre de cellules à corriger et l'impossibilité d'analyser les cellules transduites à l'échelon clonal et donc de sélectionner une population caractérisée pour son intégration provirale. Le patient est alors traité avec des cellules qui possèdent une intégration du vecteur thérapeutique pouvant potentiellement activer la surexpression de proto-oncogènes (comme cela a été montré lors de la thérapie génique de l'immunodéficience sévère combinée liée à l'X (SCID-X, Hacein-Bey-Abina *et al*. 2003, Hacein-Bey-Abina *et al*. 2008).

Les cellules souches pluripotentes induites (iPS) sont des cellules provenant de la dédifférenciation de cellules matures. Ces cellules iPS possèdent des propriétés d'autorenouvellement et de pluripotence. Elles sont en effet capables de se différencier en tissus provenant des 3 feuillets embryonnaires et pourraient donc être une source de cellules souches hématopoïétiques autologues corrigées. Elles permettraient donc de s'affranchir du problème d'histocompatibilité en injectant ses propres cellules au patient. De plus, leur capacité d'autorenouvellement permettrait de générer suffisamment de progéniteurs hématopoïétiques pour traiter efficacement un patient. Les cellules iPS permettraient également une approche clonale de la correction génique. Il serait donc possible d'analyser différentes lignées cellulaires corrigées par un vecteur thérapeutique et de sélectionner celle possédant une intégration sûre. Des études ont montré la faisabilité d'une thérapie génique utilisant des cellules iPS dans le cadre du traitement de plusieurs maladies génétiques : anémie de Fanconi (Raya *et al*. 2009), drépanocytose (Ye *et al*. 2009 ; Hanna *et al*. 2007), thalassémie (Papapetrou *et al*. 2011) et hémophilie A (Xu *et al*. 2009). Nous avons donc voulu appliquer ce type de protocoles à la thérapie génique des porphyries érythropoïétiques, notre premier protocole utilisant des cellules humaines de patients PEC et le second à partir de cellules de souris modèles de la PEC et de la PPE.

Des kératinocytes de patients PEC ont été transduits avec deux vecteurs de reprogrammation, l'un exprimant les facteurs de transcription OCT3/4, SOX2 et KLF4, l'autre exprimant c-MYC et un ARN interférent dirigé contre l'ARNm de p53 (ARNsh anti p53). La reprogrammation de cellules humaines est fortement freinée par la protéine p53 (Kawamura *et al*. 2009). L'inhibition de p53 de manière transitoire a ainsi augmenté le taux de cellules reprogrammées jusqu'à 1,4% des cellules infectées. Cette efficacité de reprogrammation s'explique également par le fait que les kératinocytes expriment faiblement de manière endogène les facteurs de transcription OCT3/4, NANOG, KLF4 et la protéine c-MYC (Aasen *et al*. 2008 ; Bedel *et al*. 2012). Les clones iPS sont ensuite infectés avec le vecteur thérapeutique exprimant l'UROS sous contrôle d'un promoteur HS40-promoteur ankyrine permettant l'expression du transgène dans le compartiment érythroïde spécifiquement.

Les lignées iPS corrigées sont caractérisées pour l'expression de marqueurs de pluripotence et infectées avec un vecteur adénoviral permettant une expression transitoire de la recombinase CRE. Cette enzyme catalyse l'excision des vecteurs lentiviraux de reprogrammation, étape essentielle pour la correcte différenciation des iPS par la suite et pour le maintien de l'intégrité génomique (l'inhibition de p53 ne doit être que transitoire). Même si plusieurs protocoles n'ont pas inclus l'excision des vecteurs de reprogrammation dans leurs protocoles, nous avons choisi de retirer les cassettes rétrovirales afin de perturber le moins possible l'expression génomique de nos lignées iPS (Raya *et al*. 2009 ; Xu *et al*. 2009). L'excision et la dilution limite permettant l'approche clonale entraîne une forte mortalité des cellules iPS humaines. La culture cellulaire, lors de ces étapes, nécessite un inhibiteur d'apoptose afin de conserver les cellules excisées (Rho-associated kinase (Rock) inhibitor, Claassen *et al*. 2009). Les lignées iPS excisées et corrigées expriment toujours les différents marqueurs de pluripotence testés et présentent un caryotype normal. Leur capacité de différenciation est évaluée par la formation de tératomes *in vivo*. La plupart des protocoles pratiqués utilisent la LAM-PCR pour connaître les sites d'intégrations provirales (Cartier *et al*. 2009). Nous avons donc analysé nos lignées par LAM-PCR ce qui a permis d'écarter celles dont les sites d'intégrations étaient trop proches de proto-oncogènes. Une lignée présente une intégration unique et aucun oncogène n'est présent dans les régions flanquant l'intégration (300 kb de part et d'autre de l'intégration). La différenciation hématopoïétique s'est effectuée selon un protocole en trois étapes : la formation de corps embryoïdes, leur culture en milieu complémenté en cytokines hématopoïétiques sur un stroma OP9 et enfin un passage en milieu

d'expansion sans sérum. La faible concentration en VEGF est primordiale pour ce protocole. Woods et collaborateurs ont en effet montré qu'une trop forte concentration inhibait la différenciation hématopoïétique (Woods *et al*. 2011). Contrairement à ce qui avait précédemment été décrit, aucune différence significative n'est observée entre l'efficacité de différenciation hématopoïétique à partir de cellules iPS humaines issues de kératinocytes ou de progéniteurs hématopoïétiques $CD34^+$ issus de sang de cordon ombilical (Kim *et al*. 2011). Nos lignées iPS présentent peut-être une pluripotence plus importante que d'autres lignées grâce à la combinaison de l'inhibition de p53 et la surexpression de c-MYC au moment de leur génération qui aurait « effacé la signature épigénétique » de nos lignées épidermiques (Araki *et al*. 2011). Ceci leur confèrerait le même potentiel de différenciation hématopoïétique que les cellules $CD34^+$ de sang de cordon. La différenciation érythroïde s'est faite en 3 semaines dans un milieu complémenté avec de l'érythropoïétine. Les cellules différenciées présentent en majorité une hémoglobine fœtale vraisemblablement due au caractère immature des cellules obtenues (Lapillonne *et al*. 2010 ; Papapetrou *et al*. 2011).

Récemment, Robert-Richard et collaborateurs ont démontré que la correction de la PEC pouvait être complète par transduction de 40% des cellules hématopoïétiques au minimum (Robert-Richard *et al*. 2008). Ce « faible » pourcentage de cellules corrigées est suffisant par l'avantage sélectif qu'il donne aux cellules corrigées qui ne sont plus hémolysées (survie des cellules corrigées accrue). D'autres études ont démontré qu'un avantage sélectif améliorait la correction (comme dans le cas de la drépanocytose : Pawliuk *et al*. 2001). De plus, l'approche clonale du protocole passant par l'utilisation de cellules iPS garantit la greffe de cellules corrigées à 100%. Ceci permettra, dans une perspective d'essai clinique, de réduire la myélosuppression diminuant ainsi les risques liés à cette opération. Ici, les cellules iPS ayant reçues le vecteur thérapeutique et différenciées en cellules érythroïdes, présentent significativement moins de porphyrines de types I (~3% de fluorocytes contre 35% pour les cellules iPS non corrigées). La correction observée *in vitro* est complète.

Thérapie génique de modèles murins de PEC et PPE

Les expériences de thérapie génique des porphyries érythropoïétiques sur les modèles murins de ces maladies permettraient de compléter ces études *in vitro* avant une potentielle utilisation clinique. C'est pour cela que nous avons expérimenté un protocole de thérapie génique des porphyries érythropoïétiques proche de celui utilisé pour les cellules de patients. Nous avons tout d'abord cultivé des fibroblastes issus de fragments de la peau dorsale de

souris nouveau-nés PEC et PPE. Ils sont transduits avec un vecteur lentiviral thérapeutique. Comme dans le cas des cellules humaines, ce transgène est sous contrôle d'un promoteur permettant son expression spécifique dans la lignée érythroïde de la moelle osseuse. La transduction d'un unique vecteur de reprogrammation exprimant les trois facteurs de reprogrammation OCT3/4, SOX2 et KLF4 (flanqué de séquences LoxP) suffit pour générer des cellules iPS avec une efficacité retrouvée classiquement dans les publications et suffisante étant donné le nombre de cellules d'origine (entre 0,05% et 0,1% - Robinton *et al*. 2012). Les cellules iPS sont caractérisées pour l'expression de différents marqueurs caractéristiques des cellules ES pluripotentes. Les lignées PEC et PPE obtenues expriment tous les marqueurs testés (y compris les protéines Nanog et Oct3/4 endogènes). L'excision des facteurs de reprogrammation a ensuite été pratiquée par la transduction de nos lignées iPS avec un vecteur adénoviral exprimant de manière transitoire de la recombinase CRE. Même si ce protocole présente l'avantage d'avoir un seul vecteur à exciser, l'excision fut laborieuse et nécessita plusieurs transductions adénovirales. Une mortalité cellulaire importante est observée jusqu'à 3-4 jours après la transduction. Il semble que l'excision fasse entrer les cellules en apoptose en les privant des voies de signalisation exogènes de survie et de pluripotence/autorenouvellement. Les clones excisés sont à nouveau caractérisés pour l'expression des marqueurs de pluripotence. Toutes les lignées continuent à exprimer ces gènes. Ceci démontre que les voies endogènes impliquées dans le maintien de la pluripotence ont bien été activées par notre vecteur de reprogrammation. Ces lignées sont capables de former des corps embryoïdes et des tératomes pleinement différenciés (présence de tissus différenciés provenant des trois feuillets embryonnaires). La différenciation hématopoïétique s'est révélée difficile à réaliser. Aucun des trois protocoles utilisés n'a permis de générer des progéniteurs hématopoïétiques en quantité suffisante dans le cadre d'une transplantation de moelle à des souris.

L'effet du facteur de transcription HoxB4 est, dans nos protocoles, sujet à contradiction. Des études montrent qu'une expression même transitoire de HoxB4 permet d'améliorer le potentiel de différenciation hématopoïétique de cellules ES ou iPS et la survie des progéniteurs hématopoïétiques qu'elles génèrent (Bonde *et al*. 2008 ; Tashiro *et al*. 2012). Nous n'avons pas observé une meilleure survie des cellules transduites contrairement à ce qui fut publié par Chan et collaborateurs (Chan *et al*. 2008). Plusieurs lignées transduites avec HoxB4 ne sont pas analysables aux derniers temps des deux principaux protocoles utilisés contrairement aux lignées infectées avec le vecteur contrôle. Il ne semble pas non plus participer à la différenciation (générale ou hématopoïétique). Les lignées HoxB4 expriment le marqueur hématopoïétique CD41 dans les mêmes proportions que les lignées contrôles (sauf

la lignée U3 lors du protocole 2). Lors de l'étude du marqueur de pluripotence, seule la lignée ES HoxB4 du protocole 1 présente une différenciation qui pourrait être attribuée à l'expression du transgène (38,6% contre 81,9% sans HoxB4). Les autres lignées utilisées lors de ce protocole ne sont pas analysables car très peu de cellules ont survécu jusqu'à la fin du protocole. Dans le deuxième protocole de différenciation, les lignées iPS expriment autant l'antigène SSEA1 qu'elles aient été transduites avec le vecteur exprimant HoxB4 ou non.

Ce résultat peut potentiellement s'expliquer par le choix des cellules d'origine et par la méthode de reprogrammation. En effet, de nombreuses études montrent que la « signature épigénétique » de la cellule d'origine joue un rôle important non pas dans la génération de lignées iPS mais dans leurs potentiels de différenciation (Kim *et al*. 2011). Ainsi, la différenciation hématopoïétique est beaucoup plus efficace à partir de cellules iPS issues de progéniteurs hématopoïétiques que de fibroblastes (Pfaff *et al*. 2011). Mais une importante variation du potentiel de différenciation est également observée entre lignées issues du même tissu : les fibroblastes embryonnaires possédant des capacités supérieures que leurs homologues adultes (Kulkeaw *et al*. 2010). L'utilisation de cellules hématopoïétiques et à fortiori de progéniteurs hématopoïétiques, aurait peut-être facilité la différenciation de nos lignées.

Dans un souci de biosécurité, nous avions choisi d'utiliser un vecteur dépourvu du transgène c-Myc car il n'est pas nécessaire à la génération de cellules iPS et qu'il était connu pour être fortement oncogénique (Wernig *et al*. 2007 ; Okita *et al*. 2007). Or, il semble maintenant indispensable à la génération de cellules iPS de haute qualité ayant des capacités de différenciation plus importantes que les cellules iPS générées sans ce facteur (Araki *et al*. 2011). Il serait intéressant de tester la pluripotence de nos lignées iPS en vérifiant leur capacité à former des chimères une fois injectées dans des blastocystes. De plus, Seiler et collaborateurs mettent en exergue la difficulté de générer des progéniteurs hématopoïétique à partir d'iPS murines (Seiler *et al*. 2011). Cette difficulté est corrélée au fait qu'une seule étude démontre la faisabilité d'un protocole de thérapie génique utilisant des iPS murines différenciées en cellules souches hématopoïétiques (correction de souris drépanocytaires, Hanna *et al*. 2007). Dans ce cas, les cellules iPS différenciées ont été triées sur l'expression de la GFP (reliée à celle du facteur de transcription HoxB4) et la disparition du marqueur embryonnaire SSEA1. Aucun marqueur hématopoïétique n'est considéré suggérant que la sélection sur ce type d'antigène est difficilement réalisable par manque de cellules différenciées.

La thérapie génique des porphyries érythropoïétiques via l'utilisation des cellules iPS semble conceptuellement possible mais de nombreux points méritent une étude plus approfondie visant à améliorer la sécurité du protocole :

- La génération des cellules iPS devrait être réalisée sans addition génique. Ici, les transgènes ont été excisés mais une cicatrice des différents provirus de reprogrammation persiste dans le génome (une séquence LTR comportant une séquence LoxP) pouvant déréguler l'expression d'un ou de plusieurs gènes. Il est maintenant possible de générer des iPS par des méthodes d'expression transitoire des facteurs de reprogrammation (protéines, microARN, ARNm stabilisés, piggyBac…) parfois même de manière plus efficace qu'avec des vecteurs intégratifs et permettant d'obtenir une pluripotence d'un niveau équivalent (Woltjen *et al*. 2009 ; Warren *et al*. 2010). Ces méthodes sont à privilégier.
- Les iPS doivent être caractérisées de manière exhaustive : l'étude du caryotype n'est qu'une étape dans la sélection des iPS sûres pour ce type de thérapies. Ces cellules développent des anomalies génétiques de part leur méthode de génération et leur culture *in vitro* (Mayshar *et al*. 2010 ; Gore *et al*. 2011 ; Samer *et al*. 2011 ; Lister *et al*. 2011). Le séquençage à très haut débit des lignées devra être effectué avant toute thérapie afin d'étudier les variations génétiques mais aussi épigénétiques (étude possible des sites de méthylations par les nouveaux séquenceurs - http://curie.fr/fr/recherche/sequencage-adn-haut-debit?prehome=0 ; Morozova et Marra, 2008).
- La délétion du promoteur rétroviral U3 et la présence de séquences isolatrices dans les LTR permet d'éliminer ou de réduire les interactions du provirus avec le génome et donc les phénomènes d'oncogenèse insertionnelle. L'utilisation d'un promoteur tissu-spécifique est une garantie supplémentaire d'une expression ciblée dans le tissu d'intérêt (Lavenu-Bombled *et al*. 2007 ; Richard *et al*. 2001).
- Récemment, le développement des méthodes de correction génique ciblée par recombinaison homologue permet d'envisager une diminution des risques liés à l'insertion d'une séquence d'ADN exogène dans le génome. En effet, l'intégration aléatoire des vecteurs viraux est un important handicap pour la thérapie génique. Il est maintenant possible de choisir le site d'intégration de la séquence thérapeutique. Les nucléases à doigt de zinc (ZFN pour Zinc Finger nucleases) et les TALEN (Transcription Activator- Like Effector Nucleases) sont des protéines artificielles composées d'un domaine capable de se lier à l'ADN et d'un domaine pouvant cliver l'ADN double brin (nucléase). Par ingénierie, il est possible de modifier la protéine pour qu'elle reconnaisse un site génomique spécifique (Zou *et al*. 2009). L'apport d'un ADN exogène d'intérêt avec des extrémités complémentaires aux régions flanquant le site de coupure entraîne l'intégration de cet ADN par recombinaison homologue

lors de la réparation de la cassure double brin. Les ZFN et les TALEN permettent d'obtenir une efficacité de recombinaison beaucoup plus importante qu'avec une recombinaison homologue classique (jusqu'à 20% d'efficacité d'après Porteus et Carroll, 2005). Cette modification génomique a permis la correction de pathologies y compris *in vivo* démontrant l'efficacité de cette technique (Urnov *et al*. 2005 ; Wood *et al*. 2011 ; Li *et al*. 2011). Sadelain et collaborateurs définissent le site d'intégration idéal afin d'éviter toute interaction avec le génome hôte (Sadelain *et al*. 2012). Le site doit se trouver à une distance :

- supérieure à 50kb d'un gène (quel qu'il soit),
- supérieure à 300kb s'il s'agit d'un gène connu pour son implication dans un cancer,
- supérieure à 300kb d'un microARN (quel qu'il soit),
- le site doit également se situer en dehors d'une unité de transcription génique,
- et en dehors de régions génomiques ultra-conservées.

Plusieurs stratégies de correction génique ciblée existent (Figure 46) : les premières études portent sur l'apport d'un transgène entier dans un locus spécifique comme le site AAVS1 (le site d'intégration des adénovirus dans les cellules humaines -adeno-associated virus site 1- localisé entre l'exon 1 et l'intron 1 du gène de la sous-unité régulatrice de la protéine phosphatase 1 (*PPP1R12C*) en position 19q13). Le site AAVS1 est souvent cité comme permettant l'expression de transgènes sans perturber l'expression du génome hôte (Lombardo *et al*. 2011). Il est nécessaire d'apporter un promoteur avec le transgène qui devra être exprimé spécifiquement dans le tissu selon l'application. Le locus CCR5 (Chemokine (motif CC) receptor 5) et le locus humain Rosa26 (chromosome 3 en position 3p21.31 et 3p25.3 respectivement) sont également des locus ciblés lors de ce type de stratégies. La protéine CCR5 est un des cofacteurs permettant l'entrée du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Des patients possédant une mutation sur ce gène à l'état homozygote présentaient une résistance importante à l'infection par le VIH-1. Un autre patient, traité par greffe de moelle osseuse pour une leucémie myéloïde aiguë et déjà infecté par le VIH, a été totalement débarrassé du virus par ce traitement (Hütter *et al*. 2009). Le donneur était homozygote pour la mutation Δ32 générant une protéine CCR5 tronquée et ne participant plus au maintien du virus. Les patients portant des mutations dans ce gène à l'état hétérozygote ou homozygote ne montrent aucun phénotype particulier. Ce site a également été choisi pour un essai clinique de phase I visant à traiter le VIH (Sangamo Biosciences). Dans ce cas, la stratégie consiste à supprimer une partie du gène afin de créer un codon STOP et générer une protéine tronquée et non fonctionnelle. Les essais cliniques consistent à injecter aux patients des lymphocytes $CD4^+$ dont le gène CCR5 aurait été partiellement délété par l'action de ZFN délivrées par un vecteur adénoviral (Urnov *et al*. 2010 ; Cannon, 2011).

Les locus sont cependant localisés près d'autres gènes (dont certains sont reliés à des cancers dans le cas de CCR5) et peuvent donc potentiellement déréguler leur expression (Sadelain *et al*. 2012). L'utilisation de ces locus comme sites d'intégration sûrs (« safe harbours ») est encore à l'étude.

Une troisième stratégie consiste à placer la séquence d'intérêt dans l'intron d'un gène déficient. La génération d'un site accepteur d'épissage sur l'ADN d'intérêt permet, une fois intégré au génome, de transcrire toute la séquence exogène. Cette séquence peut couvrir un exon ou la totalité du gène. Si plusieurs mutations différentes, présentes sur toute la longueur du gène, génèrent une seule maladie (comme c'est le cas pour les porphyries érythropoïétiques), cette technique permettrait leur correction avec un seul couple de nucléases. Ainsi Li et collaborateurs ont ciblé une séquence intronique du gène exprimant un facteur 9 humain déficient dans l'hémophilie (Li *et al*. 2011). L'apport des séquences WT des exons 2 à 8 placées en amont des séquences génomiques permet une correction de la maladie dans un modèle murin d'hémophilie B. De plus, dans ce type de stratégie, le transgène possède une expression stable et régulée car il est sous le contrôle du promoteur du gène endogène.

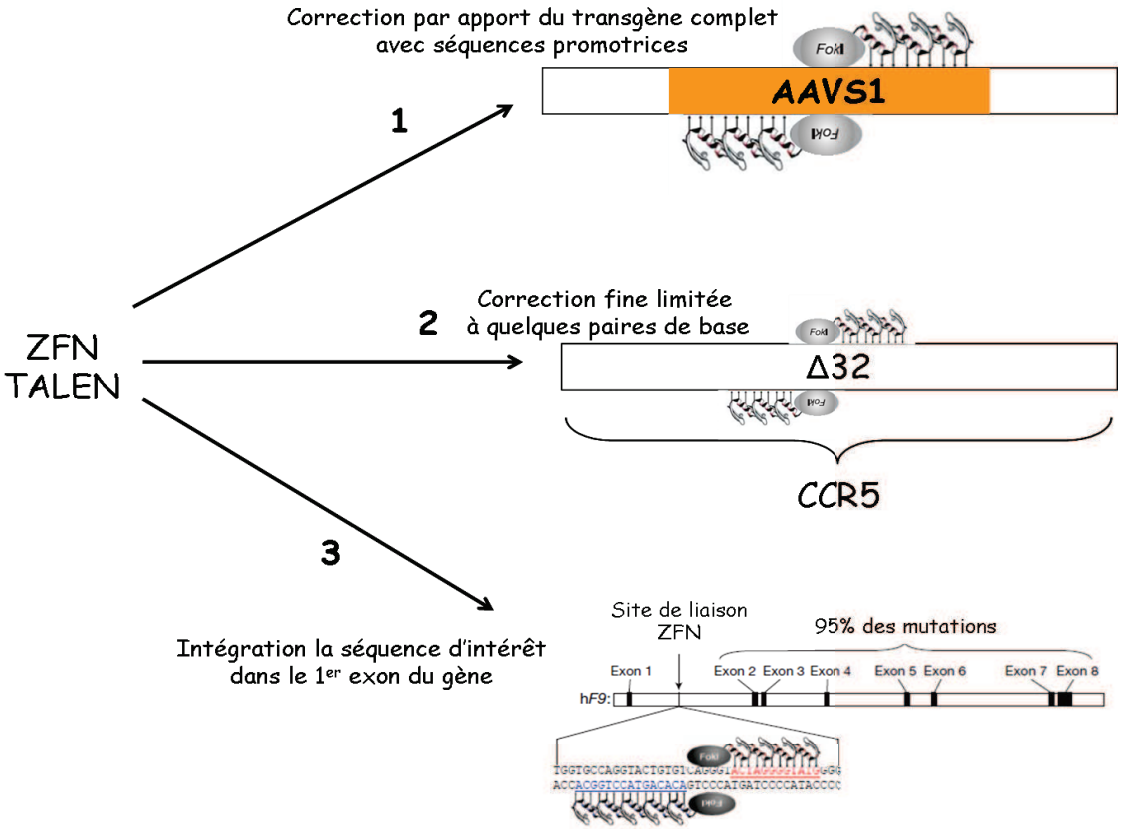


Figure 46. Stratégies de correction génique ciblée à partir de ZFN/TALEN. Les ZFN permettent l'apport d'un transgène et de son promoteur dans un locus précis (par exemple AAVS1) (1) ou la correction fine pouvant corriger une mutation ponctuelle, introduire une délétion…(2). Enfin, il est possible d'introduire le transgène dans l'intron du gène d'intérêt sous contrôle du promoteur endogène. L'ajout d'un site accepteur d'épissage permet de transcrire le transgène et plus la séquence génomique comportant les mutations (3). La régulation de l'expression du transgène sera alors identique à celle du gène endogène.

La haute spécificité et l'efficacité de cette technologie font d'elle une potentielle voie thérapeutique notamment pour les porphyries érythropoïétiques qui présentent le même profil de mutations (distribuées sur la totalité du gène) même si des études restent à faire pour prouver leur innocuité.

III – Biothérapie de la porphyrie érythropoïétique congénitale : une nouvelle approche thérapeutique

De nombreuses mutations à l'origine de la porphyrie érythropoïétique congénitale ont été recensées dont la majorité sont des mutations faux sens (25/43 mutations, Ged *et al*. 2009). Ces mutations sont responsables d'une modification de la structure primaire de la protéine. Or, une modification de cette séquence est responsable de variations dans les interactions inter-acides aminés lors de la synthèse et de la maturation de la protéine qui peut perdre sa fonction et causer un phénotype pathologique (Ellis et Pinheiro, 2002). Lors d'une étude fonctionnelle de ces différents mutants, Fortian et collaborateurs démontrent en 2009 que plusieurs de ces mutations ne font pas toutes parties du site actif de l'enzyme. Les activités des différents mutants sont plus importantes que celles retrouvées chez les patients. Ils posent l'hypothèse d'un mécanisme différent à l'origine du déficit enzymatique : l'analyse de la structure protéique révèle la présence d'une région en forme d'hélice indispensable au maintien d'une conformation stable de l'UROS et de sa fonctionnalité. La mutation C73R, retrouvée dans 1/3 des cas de PEC, est située dans cette hélice (Fortian *et al*. 2009). L'étude de la protéine montre que la cystéine en position 73 ne participe pas directement à l'action de la protéine (elle n'est pas située dans le site actif) mais que sa mutation en arginine entraîne un changement de la structure tertiaire de la protéine causant une instabilité thermodynamique et sa destruction prématurée (Fortian *et al*. 2011). Pour comprendre ce phénomène, les auteurs ont transfecté des cellules avec des constructions exprimant l'UROS sauvage ou mutée fusionnée avec la GFP ou un épitope myc. La protéine sauvage est synthétisée et la GFP est détectée par fluorescence et western blot contrairement à la protéine mutée. Des RT-PCR prouvent que l'UROS-C73R est bien transcrite : la régulation de l'expression de la protéine mutée est donc post-transcriptionnelle. L'inhibition du protéasome par du MG132 (inhibiteur spécifique) permet d'accumuler la protéine mutée détectable par western blot. Les images de fluorescence montrent que la protéine mutée s'agrège et forme des amas protéiques. Or, la protéine conserve une activité enzymatique mesurable et équivalente à 50% de l'activité de l'enzyme sauvage (Fortian *et al*. 2011). L'inhibition du protéasome suffirait donc à accumuler

la protéine mutée dans les cellules pour qu'elle accomplisse sa fonction. L'inhibition du protéasome semble avoir plusieurs applications en cancérologie (en sensibilisant les cellules leucémiques de patients aux effets apoptotiques engendrés par un traitement à base d'anthracyclines - Pigneux *et al*. 2007), en traitement des maladies neurodégénératives (amélioration de l'état de souris d'un modèle de maladie neurodégénérative associée au maintien de complexes SNARE fonctionnels – Sharma *et al*. 2012) ou dans le cadre de maladies génétiques comme le syndrome de la fibromatose hyaline, de l'ostéogenèse imparfaite dominante ou de dystrophies musculaires (Deuquet *et al*. 2011 ; Azakir *et al*. 2012 ; Gioia *et al*. 2012 ; Gazzerro *et al*. 2010 ; Kwon *et al*. 2011).

La mutation faux sens P248Q entraîne, comme la mutation C73R, une diminution très importante de l'activité enzymatique chez les patients PEC (Ged *et al*. 2009). L'étude fonctionnelle révèle également une similitude dans les activités enzymatiques *in vitro* des protéines mutées UROS-C73R et UROS-P248Q (Fortian *et al*. 2009). Comme nous disposions du modèle murin de PEC (*Uros*$^{P248Q/P248Q}$), nous avons cherché à déterminer si la mutation P248Q perturbait également la stabilité de l'UROS (Ged *et al*. 2006). Pour cela, nous avons étendu l'étude de l'inhibition du protéasome *in vitro* aux deux mutations C73R et P248Q et *in vivo* dans le modèle murin de PEC. Pour cela, nous avons transfecté de manière stable des cellules érythroleucémiques humaines (K562) avec des constructions exprimant la GFP fusionnée à l'UROS sauvage (WT) ou portant la mutation C73R ou P248Q. Par cytométrie, l'UROS WT est facilement observable grâce à la GFP alors que les deux protéines mutées sont indétectables. L'inhibition du protéasome par du bortezomib ou du MG132 dans ces cellules permet de détecter des cellules GFP$^+$ pour les deux mutations, suggérant une accumulation de ces protéines. L'inhibition des lysosomes par un traitement à la chloroquine ou la bafilomycine n'a aucun effet sur la dégradation protéique (aucune accumulation de GFP n'a été observée comme démontré précédemment) démontrant ainsi que la dégradation de la protéine est assurée majoritairement par le protéasome (Fortian *et al*. 2011). Le traitement avec un inhibiteur de protéasome de fibroblastes humains transfectés avec ces constructions, révèle une agrégation des protéines mutées contrairement à la protéine sauvage répartie équitablement dans le cytosol. Les deux protéines étant fusionnées à la GFP de la même façon (par leur extrémité C-Terminale), l'agrégation de l'UROS-P248Q observée est attribuée à un changement de conformation induit par la mutation. Lors des études *in vivo*, un inhibiteur du protéasome (Velcade® dont la molécule active est le bortezomib), a été injecté aux souris du modèle de PEC porteur de la mutation P248Q. Ce composé est un inhibiteur spécifique et réversible de l'activité chymotrypsine du protéasome 26S. Il est déjà utilisé en clinique (approuvé par la FDA et l'agence de médecine européenne) pour le traitement de myélomes

multiples et de rechute après traitement d'un lymphome à cellules du manteau. La dose optimale et la répartition dans le temps d'injections du Velcade® ont été déterminées dans la lignée érythroïde de souris sauvages. L'inhibition maximale du protéasome est observée 2 heures après injection pour un retour à un niveau basal 48 heures après injection. Les souris PEC ont ensuite été traitées par voie intrapéritonéale avec 0,5 à 1mg/kg de Velcade® tous les 2 jours pendant 9 semaines. Des prélèvements sanguins hebdomadaires permettent de suivre la quantité de fluorocytes circulants. La toxicité du produit est vérifiée par la mesure hebdomadaire du poids des souris qui ne montre aucune différence entre les souris traitées et non traitées. Les souris ne présentent pas de comportement anormal qui aurait pu être associé à une neurotoxicité déjà observé lors de l'utilisation de ce médicament (Badros *et al*. 2007). Dès la première semaine de traitement, la proportion de fluorocytes dans les souris traitées diminue. Cet effet est observé dans les deux conditions de traitement. La diminution se poursuit pendant 5 semaines jusqu'à atteindre un palier identique pour les deux conditions de traitement (~11,5% de fluorocytes contre ~23% pour les souris non traitées). Le dosage des porphyrines érythrocytaires confirment les analyses de cytométrie (entre 30,5 et 45,8 µmol/l de porphyrines dans les globules rouges des souris PEC traitées contre 80,8 µmol/l en moyenne dans les souris non traitées). Cette diminution est vraisemblablement à mettre au crédit d'une augmentation de l'activité enzymatique que nous devons doser prochainement. La chute du pourcentage de fluorocytes circulants, bien qu'incomplète (~50%), a pour principal conséquence de réduire significativement la photosensibilité des souris traitées. Comme publié précédemment, la correction d'au moins 40% à 50% des fluorocytes permet de corriger la photosensibilité (Robert-Richard *et al*. 2008). Les paramètres hématologiques (anémie et hématocrite) restent par contre inchangés par rapport aux souris PEC non traitées. Les taux de porphyrines érythrocytaires dans les souris traitées, bien que réduits de 40 à 60%, doivent contribuer à la destruction des globules rouges par la rate expliquant ainsi la splénomégalie persistante (bien que faiblement réduite).

Même si le projet n'est pas encore terminé, nous démontrons ici que l'inhibition du protéasome est une thérapeutique efficace permettant d'augmenter la quantité d'UROS et son activité dans les cellules porteuses des deux mutations faux sens les plus recensées chez les patients (C73R et P248Q). La courte demi-vie du bortezomib est un inconvénient majeur dans ce type de traitement. L'inhibition du protéasome nécessite des injections répétées car elle n'est plus effective après 48 heures. De plus, l'inhibition complète des protéasomes cellulaires ne peut être une solution thérapeutique durable. La toxicité de ce traitement, ayant déjà subit des essais cliniques, est avérée. Il provoque des effets secondaires parfois graves. 30% des patients ont déjà développé des neuropathies, une hypotension, des problèmes cardiaques,

pulmonaires (parfois fatals), hépatiques, une neutropénie et thrombocytopénie,… (Orlowski *et al*. 2005 et http://www.velcade.com/). Une approche thérapeutique plus ciblée serait préférable : des analogues du bortezomib ont déjà été développés (le carfilzomib et le marizomib sont capables d'induire une inhibition du protéasome plus importante et de traiter même les cellules résistantes au bortezomib. Des études cliniques sont en cours afin de déterminer de la toxicité de ces composés (Kuhn *et al*. 2011 ; Yang *et al*. 2009).

Malgré le développement des ces analogues, une approche basée sur l'utilisation de chaperonnes pharmacologiques serait préférable car plus ciblée. Les chaperonnes sont des protéines présentes généralement dans le réticulum endoplasmique permettant de prévenir une mauvaise conformation des protéines nouvellement formées en les aidant à atteindre une structure tertiaire opérationnelle. L'accumulation de protéines mal configurées génère un stress dans le réticulum endoplasmique. La réponse à ce stress (appelée UPR : Unfolded Protein Response) passe dans un premier temps par une diminution de la synthèse générale des protéines autres que les chaperonnes dont l'expression est stimulée afin de diminuer le taux de protéines mal conformées. L'entrée de protéines dans le réticulum endoplasmique est également réduite et une partie des protéines mal conformées est exclue du réticulum endoplasmique pour être dégradée par le protéasome (voie ERAD : Endoplasmic Reticulum Associated-Degradation). Dans un second temps, si l'accumulation de protéines persiste, la cellule déclenche un programme d'apoptose (Hiller *et al*. 1996 ; Wiertz *et al*. 1996 ; Meusser *et al*. 2005 ; Römisch, 2005). L'efficacité de chaperonnes pharmacologiques a déjà été étudiée et observée dans plusieurs modèles de maladies génétiques : la phénylcétonurie (Pey *et al*. 2008), la mucoviscidose (Wang *et al*, 2008), l'hyperoxalurie de type I (Hopper *et al*, 2008) et les maladies lysosomales (Flanagan *et al*. 2009 ; Porto *et al*. 2009 ; Parenti *et al*. 2009). Une étude porte notamment sur la mutation G551D à l'origine de la mucoviscidose. Cette mutation affecte l'adressage du canal chlorure CFTR à la membrane plasmique. Un agent pharmacologique VX-770 récemment synthétisé augmente la probabilité d'ouverture du canal CFTR permettant une meilleure sécrétion des ions chlorure (van Goor *et al*. 2009). Un essai clinique a été conduit sur 167 patients âgés de 12 ans et plus atteints de mucoviscidose causée par la mutation G551D et traités avec cette molécule (Ivacaftor®). La chaperonne permet une amélioration des fonctions pulmonaires dès la deuxième semaine de traitement et ce, pendant 48 semaines (Ramsey *et al*. 2011). Des chaperonnes pharmacologiques ont également été découverte pour le traitement de la maladie de Pompe. Cette maladie est caractérisée par une atteinte neuromusculaire causée des mutations du gène codant pour l'acide α-glucosidase (GAA), une hydrolase lysosomale. Un déficit en GAA conduit à une accumulation de glycogène dans les lysosomes et une dysfonction cellulaire dans de nombreux tissus,

notamment les muscles squelettiques et cardiaques. Deux chaperonnes ont montré une efficacité de traitement *in vitro* en augmentant le nombre et l'activité protéique et l'adressage au lysosome de la GAA mutée (Flanagan *et al*. 2009). Une autre étude révèle que la combinaison d'une thérapie de remplacement de l'enzyme (apport de l'enzyme purifiée) et d'un traitement pharmacologique (chaperonne moléculaire) permet de potentialiser les effets de ces traitements (Porto *et al*. 2009).

Dans un protocole similaire, des chaperonnes pharmacologiques pourraient être criblées par un test fonctionnel visant à stabiliser l'UROS mutée fusionnée à une protéine fluorescente. La détection par cytométrie ou immunofluorescence des plus fortes concentrations permettrait de sélectionner les molécules ayant la meilleure efficacité de stabilisation de l'UROS pour une caractérisation plus approfondie. Une chaperonne moléculaire est spécifique d'une conformation protéique spécifique, ce qui signifie qu'une chaperonne ne peut vraisemblablement pas permettre l'amélioration de conformation de plusieurs protéines portant une mutation différente. Mais l'utilisation d'une telle molécule assurerait une approche ciblée qui ne perturberait pas la dégradation protéique dans son ensemble et présenterait donc potentiellement moins d'effets secondaires.

Références

Aasen, T., Raya, A., Barrero, M. J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilic, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., *et al.* (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. Nature biotechnology *26*, 1276-1284.

Abitbol, M., Bernex, F., Puy, H., Jouault, H., Deybach, J. C., Guenet, J. L., and Montagutelli, X. (2005). A mouse model provides evidence that genetic background modulates anemia and liver injury in erythropoietic protoporphyria. American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology *288*, G1208-1216.

Aizencang, G., Solis, C., Bishop, D. F., Warner, C., and Desnick, R. J. (2000). Human uroporphyrinogen-III synthase: genomic organization, alternative promoters, and erythroid-specific expression. Genomics *70*, 223-231.

Alper, J. (2009). Geron gets green light for human trial of ES cell-derived product. Nature biotechnology *27*, 213-214.

Anokye-Danso, F., Trivedi, C. M., Juhr, D., Gupta, M., Cui, Z., Tian, Y., Zhang, Y., Yang, W., Gruber, P. J., Epstein, J. A., and Morrisey, E. E. (2011). Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. Cell stem cell *8*, 376-388.

Anstey, A. V., and Hift, R. J. (2007). Liver disease in erythropoietic protoporphyria: insights and implications for management. Gut *56*, 1009-1018.

Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. Science *321*, 699-702.

Araki, R., Hoki, Y., Uda, M., Nakamura, M., Jincho, Y., Tamura, C., Sunayama, M., Ando, S., Sugiura, M., Yoshida, M. A., *et al.* (2011). Crucial role of c-Myc in the generation of induced pluripotent stem cells. Stem cells *29*, 1362-1370.

Askmyr, M., Holmberg, J., Flores, C., Ehinger, M., Hjalt, T., and Richter, J. (2009). Low-dose busulphan conditioning and neonatal stem cell transplantation preserves vision and restores hematopoiesis in severe murine osteopetrosis. Experimental hematology *37*, 302-308.

Assady, S., Maor, G., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., Skorecki, K. L., and Tzukerman, M. (2001). Insulin production by human embryonic stem cells. Diabetes *50*, 1691-1697.

Astrin, K. H., Warner, C. A., Yoo, H. W., Goodfellow, P. J., Tsai, S. F., and Desnick, R. J. (1991). Regional assignment of the human uroporphyrinogen III synthase (UROS) gene to chromosome 10q25.2----q26.3. Human genetics *87*, 18-22.

Atkin, N. B., Baker, M. C., Robinson, R., and Gaze, S. E. (1974). Chromosome studies on 14 near-diploid carcinomas of the ovary. European journal of cancer *10*, 144-146.

Aubry, L., Bugi, A., Lefort, N., Rousseau, F., Peschanski, M., and Perrier, A. L. (2008). Striatal progenitors derived from human ES cells mature into DARPP32 neurons in vitro and in quinolinic acid-lesioned rats. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *105*, 16707-16712.

Aubry, L., Peschanski, M., and Perrier, A. L. (2009). [Human embryonic-stem-cell-derived striatal graft for Huntington's disease cell therapy]. Medecine sciences : M/S *25*, 333-335.

Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. Genes & development *17*, 126-140.

Azakir, B. A., Di Fulvio, S., Kinter, J., and Sinnreich, M. (2012). Proteasomal inhibition restores biological function of mis-sense mutated dysferlin in patient-derived muscle cells. The Journal of biological chemistry *287*, 10344-10354.

Badros, A., Goloubeva, O., Dalal, J. S., Can, I., Thompson, J., Rapoport, A. P., Heyman, M., Akpek, G., and Fenton, R. G. (2007). Neurotoxicity of bortezomib therapy in multiple myeloma: a single-center experience and review of the literature. Cancer *110*, 1042-1049.

Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J. E., and Gottlieb, D. I. (1995). Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. Developmental biology *168*, 342-357.

Baker, D. E., Harrison, N. J., Maltby, E., Smith, K., Moore, H. D., Shaw, P. J., Heath, P. R., Holden, H., and Andrews, P. W. (2007). Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. Nature biotechnology *25*, 207-215.

Bar-Nur, O., Russ, H. A., Efrat, S., and Benvenisty, N. (2011). Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells. Cell stem cell *9*, 17-23.

Bedel, A., Taillepierre, M., Guyonnet-Duperat, V., Lippert, E., Dubus, P., Dabernat, S., Mautuit, T., Cardinaud, B., Pain, C., Rousseau, B.*, et al.* (2012). Metabolic correction of congenital erythropoietic porphyria with iPSCs free of reprogramming factors. American journal of human genetics *91*, 109-121.

Bernales, S., Papa, F. R., and Walter, P. (2006). Intracellular signaling by the unfolded protein response. Annual review of cell and developmental biology *22*, 487-508.

Bishop, D. F., Clavero, S., Mohandas, N., and Desnick, R. J. (2011). Congenital erythropoietic porphyria: characterization of murine models of the severe common (C73R/C73R) and later-onset genotypes. Molecular medicine *17*, 748-756.

Bishop, D. F., Johansson, A., Phelps, R., Shady, A. A., Ramirez, M. C., Yasuda, M., Caro, A., and Desnick, R. J. (2006). Uroporphyrinogen III synthase knock-in mice have the human congenital erythropoietic porphyria phenotype, including the characteristic light-induced cutaneous lesions. American journal of human genetics *78*, 645-658.

Bishop, T. R., Miller, M. W., Beall, J., Zon, L. I., and Dierks, P. (1996). Genetic regulation of delta-aminolevulinate dehydratase during erythropoiesis. Nucleic acids research *24*, 2511-2518.

Blasco, M. A. (2007). Telomere length, stem cells and aging. Nature chemical biology *3*, 640-649.

Blin, G., Nury, D., Stefanovic, S., Neri, T., Guillevic, O., Brinon, B., Bellamy, V., Rucker-Martin, C., Barbry, P., Bel, A.*, et al.* (2010). A purified population of multipotent cardiovascular progenitors derived from primate pluripotent stem cells engrafts in postmyocardial infarcted nonhuman primates. The Journal of clinical investigation *120*, 1125-1139.

Bloomer, J. R. (1979). Pathogenesis and therapy of liver disease in protoporphyria. The Yale journal of biology and medicine *52*, 39-48.

Bloomer, J. R., Morton, K. O., Reuter, R. J., and Ruth, G. R. (1982). Bovine protoporphyria: documentation of autosomal recessive inheritance and comparison with the human disease through measurement of heme synthase activity. American journal of human genetics *34*, 322-330.

Bloomer, J. R., Straka, J. G., Hill, H., Weimer, M. K., and Ruth, G. R. (1990). Comparison of bile porphyrin concentrations in cattle and human beings with protoporphyria. American journal of veterinary research *51*, 1144-1146.

Boheler, K. R., Czyz, J., Tweedie, D., Yang, H. T., Anisimov, S. V., and Wobus, A. M. (2002). Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. Circulation research *91*, 189-201.

Bonde, S., Dowden, A. M., Chan, K. M., Tabayoyong, W. B., and Zavazava, N. (2008). HOXB4 but not BMP4 confers self-renewal properties to ES-derived hematopoietic progenitor cells. Transplantation *86*, 1803-1809.

Bongso, A., Fong, C. Y., Ng, S. C., and Ratnam, S. (1994). Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. Human reproduction *9*, 2110-2117.

Bottomley, S. S., May, B. K., Cox, T. C., Cotter, P. D., and Bishop, D. F. (1995). Molecular defects of erythroid 5-aminolevulinate synthase in X-linked sideroblastic anemia. Journal of bioenergetics and biomembranes *27*, 161-168.

Boulechfar, S., Lamoril, J., Montagutelli, X., Guenet, J. L., Deybach, J. C., Nordmann, Y., Dailey, H., Grandchamp, B., and de Verneuil, H. (1993). Ferrochelatase structural mutant (Fechm1Pas) in the house mouse. Genomics *16*, 645-648.

Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H., and Robertson, E. (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. Nature *309*, 255-256.

Braun, B. C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P. M., Finley, D., and Schmidt, M. (1999). The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. Nature cell biology *1*, 221-226.

Brenner, D. A., Didier, J. M., Frasier, F., Christensen, S. R., Evans, G. A., and Dailey, H. A. (1992). A molecular defect in human protoporphyria. American journal of human genetics *50*, 1203-1210.

Bruni, S., Loschi, L., Incerti, C., Gabrielli, O., and Coppa, G. V. (2007). Update on treatment of lysosomal storage diseases. Acta myologica : myopathies and cardiomyopathies : official journal of the Mediterranean Society of Myology / edited by the Gaetano Conte Academy for the study of striated muscle diseases *26*, 87-92.

Brustle, O., Jones, K. N., Learish, R. D., Karram, K., Choudhary, K., Wiestler, O. D., Duncan, I. D., and McKay, R. D. (1999). Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. Science *285*, 754-756.

Cannon, P., and June, C. (2011). Chemokine receptor 5 knockout strategies. Current opinion in HIV and AIDS *6*, 74-79.

Carbonaro, D. A., Jin, X., Cotoi, D., Mi, T., Yu, X. J., Skelton, D. C., Dorey, F., Kellems, R. E., Blackburn, M. R., and Kohn, D. B. (2008). Neonatal bone marrow transplantation of ADA-deficient SCID mice results in immunologic reconstitution despite low levels of engraftment and an absence of selective donor T lymphoid expansion. Blood *111*, 5745-5754.

Carroll, D. (2011). Genome engineering with zinc-finger nucleases. Genetics *188*, 773-782.

Cartier, N., Hacein-Bey-Abina, S., Bartholomae, C. C., Veres, G., Schmidt, M., Kutschera, I., Vidaud, M., Abel, U., Dal-Cortivo, L., Caccavelli, L.*, et al.* (2009). Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. Science *326*, 818-823.

Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K., and Dalton, S. (2005). LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. Development *132*, 885-896.

Case, S. S., Price, M. A., Jordan, C. T., Yu, X. J., Wang, L., Bauer, G., Haas, D. L., Xu, D., Stripecke, R., Naldini, L.*, et al.* (1999). Stable transduction of quiescent CD34(+)CD38(-) human hematopoietic cells by HIV-1-based lentiviral vectors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *96*, 2988-2993.

Cavazzana-Calvo, M., Payen, E., Negre, O., Wang, G., Hehir, K., Fusil, F., Down, J., Denaro, M., Brady, T., Westerman, K.*, et al.* (2010). Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. Nature *467*, 318-322.

Chadwick, K., Wang, L., Li, L., Menendez, P., Murdoch, B., Rouleau, A., and Bhatia, M. (2003). Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. Blood *102*, 906-915.

Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. Cell *113*, 643-655.

Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L., and Smith, A. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. Nature *450*, 1230-1234.

Chan, K. M., Bonde, S., Klump, H., and Zavazava, N. (2008). Hematopoiesis and immunity of HOXB4-transduced embryonic stem cell-derived hematopoietic progenitor cells. Blood *111*, 2953-2961.

Chang, C. W., Lai, Y. S., Pawlik, K. M., Liu, K., Sun, C. W., Li, C., Schoeb, T. R., and Townes, T. M. (2009). Polycistronic lentiviral vector for "hit and run" reprogramming of adult skin fibroblasts to induced pluripotent stem cells. Stem cells *27*, 1042-1049.

Chau, V., Tobias, J. W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D. J., Gonda, D. K., and Varshavsky, A. (1989). A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. Science *243*, 1576-1583.

Chen, F. P., Risheg, H., Liu, Y., and Bloomer, J. (2002). Ferrochelatase gene mutations in erythropoietic protoporphyria: focus on liver disease. Cellular and molecular biology *48*, 83-89.

Childs, S., Weinstein, B. M., Mohideen, M. A., Donohue, S., Bonkovsky, H., and Fishman, M. C. (2000). Zebrafish dracula encodes ferrochelatase and its mutation provides a model for erythropoietic protoporphyria. Current biology : CB *10*, 1001-1004.

Chin, M. H., Mason, M. J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsumyan, G., Aimiuwu, O., Richter, L., Zhang, J.*, et al.* (2009). Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. Cell stem cell *5*, 111-123.

Chng, Z., Vallier, L., and Pedersen, R. (2011). Activin/nodal signaling and pluripotency. Vitamins and hormones *85*, 39-58.

Claassen, D. A., Desler, M. M., and Rizzino, A. (2009). ROCK inhibition enhances the recovery and growth of cryopreserved human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. Molecular reproduction and development *76*, 722-732.

Coulombel, L. (2009). [Stem cell therapy: an update]. Bulletin de l'Academie nationale de medecine *193*, 535-536.

Crooks, D. R., Ghosh, M. C., Haller, R. G., Tong, W. H., and Rouault, T. A. (2010). Posttranslational stability of the heme biosynthetic enzyme ferrochelatase is dependent on iron availability and intact iron-sulfur cluster assembly machinery. Blood *115*, 860-869.

Crosby, J. S., Chefalo, P. J., Yeh, I., Ying, S., London, I. M., Leboulch, P., and Chen, J. J. (2000). Regulation of hemoglobin synthesis and proliferation of differentiating erythroid cells by heme-regulated eIF-2alpha kinase. Blood *96*, 3241-3248.

Crouse, B. R., Sellers, V. M., Finnegan, M. G., Dailey, H. A., and Johnson, M. K. (1996). Site-directed mutagenesis and spectroscopic characterization of human ferrochelatase: identification of residues coordinating the [2Fe-2S] cluster. Biochemistry *35*, 16222-16229.

Dailey, H. A., Finnegan, M. G., and Johnson, M. K. (1994). Human ferrochelatase is an iron-sulfur protein. Biochemistry *33*, 403-407.

Dailey, H. A., Jr., and Lascelles, J. (1974). Ferrochelatase activity in wild-type and mutant strains of Spirillum itersonii. Solubilization with chaotropic reagents. Archives of biochemistry and biophysics *160*, 523-529.

Dani, C., Smith, A. G., Dessolin, S., Leroy, P., Staccini, L., Villageois, P., Darimont, C., and Ailhaud, G. (1997). Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. Journal of cell science *110 (Pt 11)*, 1279-1285.

Davis, R. L., Weintraub, H., and Lassar, A. B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. Cell *51*, 987-1000.

de Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. Genes & development *19*, 2100-2110.

de Verneuil, H., Moreau-Gaudry, F., Ged, C., Bensidhoum, M., Hombrados, I., Tricoire, J., and Rolland, M. (1995). [Congenital erythropoietic porphyria. Apropos of a fatal case in the neonatal period due to acute hemolysis with hepatic failure]. Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie *2*, 755-761.

de Verneuil, H., Robert-Richard, E., Ged, C., Mazurier, F., Richard, E., and Moreau-Gaudry, F. (2008). [Successful gene therapy of mice with congenital erythropoietic porphyria]. Medecine sciences : M/S *24*, 615-620.

Desnick, R. J., and Astrin, K. H. (2002). Congenital erythropoietic porphyria: advances in pathogenesis and treatment. British journal of haematology *117*, 779-795.

Deuquet, J., Lausch, E., Guex, N., Abrami, L., Salvi, S., Lakkaraju, A., Ramirez, M. C., Martignetti, J. A., Rokicki, D., Bonafe, L.*, et al.* (2011). Hyaline fibromatosis syndrome inducing mutations in the ectodomain of anthrax toxin receptor 2 can be rescued by proteasome inhibitors. EMBO molecular medicine *3*, 208-221.

Doetschman, T. C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., and Kemler, R. (1985). The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. Journal of embryology and experimental morphology *87*, 27-45.

Dubart, A., Mattei, M. G., Raich, N., Beaupain, D., Romeo, P. H., Mattei, J. F., and Goossens, M. (1986). Assignment of human uroporphyrinogen decarboxylase (URO-D) to the p34 band of chromosome 1. Human genetics *73*, 277-279.

Duchartre, Y., Petit, N., Moya, C., Lalanne, M., Dubus, P., Verneuil, H., Moreau-Gaudry, F., and Richard, E. (2011). Neonatal bone marrow transplantation prevents liver disease in a murine model of erythropoietic protoporphyria. Journal of hepatology *55*, 162-170.

Dunbar, C. E., Kohn, D. B., Schiffmann, R., Barton, N. W., Nolta, J. A., Esplin, J. A., Pensiero, M., Long, Z., Lockey, C., Emmons, R. V.*, et al.* (1998). Retroviral transfer of the glucocerebrosidase gene into CD34+ cells from patients with Gaucher disease: in vivo detection of transduced cells without myeloablation. Human gene therapy *9*, 2629-2640.

Dupuis-Girod, S., Akkari, V., Ged, C., Galambrun, C., Kebaili, K., Deybach, J. C., Claudy, A., Geburher, L., Philippe, N., de Verneuil, H., and Bertrand, Y. (2005). Successful match-unrelated donor bone marrow transplantation for congenital erythropoietic porphyria (Gunther disease). European journal of pediatrics *164*, 104-107.

Ebert, A. D., Yu, J., Rose, F. F., Jr., Mattis, V. B., Lorson, C. L., Thomson, J. A., and Svendsen, C. N. (2009). Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. Nature *457*, 277-280.

Egawa, N., Kitaoka, S., Tsukita, K., Naitoh, M., Takahashi, K., Yamamoto, T., Adachi, F., Kondo, T., Okita, K., Asaka, I.*, et al.* (2012). Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. Science translational medicine *4*, 145ra104.

Ellgaard, L., and Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. Nature reviews Molecular cell biology *4*, 181-191.

Ellis, R. J., and Pinheiro, T. J. (2002). Medicine: danger--misfolding proteins. Nature *416*, 483-484.

Eriksen, L., and Eriksen, N. (1974). Porphyrin distribution and porphyrin excretion in human congenital erythropoietic porphyria. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation *33*, 323-332.

Evans, J. T., Kelly, P. F., O'Neill, E., and Garcia, J. V. (1999). Human cord blood CD34+CD38- cell transduction via lentivirus-based gene transfer vectors. Human gene therapy *10*, 1479-1489.

Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature *292*, 154-156.

Faraci, M., Morreale, G., Boeri, E., Lanino, E., Dallorso, S., Dini, G., Scuderi, F., Cohen, A., and Cappelli, B. (2008). Unrelated HSCT in an adolescent affected by congenital erythropoietic porphyria. Pediatric transplantation *12*, 117-120.

Ferreira, G. C. (1995). Heme biosynthesis: biochemistry, molecular biology, and relationship to disease. Journal of bioenergetics and biomembranes *27*, 147-150.

Flanagan, J. J., Rossi, B., Tang, K., Wu, X., Mascioli, K., Donaudy, F., Tuzzi, M. R., Fontana, F., Cubellis, M. V., Porto, C.*, et al.* (2009). The pharmacological chaperone 1-deoxynojirimycin increases the activity and lysosomal trafficking of multiple mutant forms of acid alpha-glucosidase. Human mutation *30*, 1683-1692.

Fontanellas, A., Bensidhoum, M., Enriquez de Salamanca, R., Moruno Tirado, A., de Verneuil, H., and Ged, C. (1996). A systematic analysis of the mutations of the uroporphyrinogen III synthase gene in congenital erythropoietic porphyria. European journal of human genetics : EJHG *4*, 274-282.

Fontanellas, A., Mazurier, F., Landry, M., Taine, L., Morel, C., Larou, M., Daniel, J. Y., Montagutelli, X., de Salamanca, R. E., and de Verneuil, H. (2000). Reversion of hepatobiliary alterations By bone marrow transplantation in a murine model of erythropoietic protoporphyria. Hepatology *32*, 73-81.

Fontanellas, A., Mendez, M., Mazurier, F., Cario-Andre, M., Navarro, S., Ged, C., Taine, L., Geronimi, F., Richard, E., Moreau-Gaudry, F.*, et al.* (2001). Successful therapeutic effect in a mouse model of erythropoietic protoporphyria by partial genetic correction and fluorescence-based selection of hematopoietic cells. Gene therapy *8*, 618-626.

Fortian, A., Castano, D., Gonzalez, E., Lain, A., Falcon-Perez, J. M., and Millet, O. (2011a). Structural, thermodynamic, and mechanistical studies in uroporphyrinogen III synthase: molecular basis of congenital erythropoietic porphyria. Advances in protein chemistry and structural biology *83*, 43-74.

Fortian, A., Castano, D., Ortega, G., Lain, A., Pons, M., and Millet, O. (2009). Uroporphyrinogen III synthase mutations related to congenital erythropoietic porphyria identify a key helix for protein stability. Biochemistry *48*, 454-461.

Fortian, A., Gonzalez, E., Castano, D., Falcon-Perez, J. M., and Millet, O. (2011b). Intracellular rescue of the uroporphyrinogen III synthase activity in enzymes carrying the hotspot mutation C73R. The Journal of biological chemistry *286*, 13127-13133.

Fritsch, C., Bolsen, K., Ruzicka, T., and Goerz, G. (1997). Congenital erythropoietic porphyria. Journal of the American Academy of Dermatology *36*, 594-610.

Fritsch, C., Lang, K., Bolsen, K., Lehmann, P., and Ruzicka, T. (1998). Congenital erythropoietic porphyria. Skin pharmacology and applied skin physiology *11*, 347-357.

Fujita, H., Yamamoto, M., Yamagami, T., Hayashi, N., Bishop, T. R., De Verneuil, H., Yoshinaga, T., Shibahara, S., Morimoto, R., and Sassa, S. (1991). Sequential activation of genes for heme pathway enzymes during erythroid differentiation of mouse Friend virus-transformed erythroleukemia cells. Biochimica et biophysica acta *1090*, 311-316.

Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., and Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and biological sciences *85*, 348-362.

Garcia-Bravo, M., Moran-Jimenez, M. J., Quintana-Bustamante, O., Mendez, M., Gutierrez-Vera, I., Bueren, J., Salido, E., Segovia, J. C., Fontanellas, A., and de Salamanca, R. E. (2009). Bone marrow-derived cells promote liver regeneration in mice with erythropoietic protoporphyria. Transplantation *88*, 1332-1340.

Gazzerro, E., Assereto, S., Bonetto, A., Sotgia, F., Scarfi, S., Pistorio, A., Bonuccelli, G., Cilli, M., Bruno, C., Zara, F*., et al.* (2010). Therapeutic potential of proteasome inhibition in Duchenne and Becker muscular dystrophies. The American journal of pathology *176*, 1863-1877.

Ged, C., Megarbane, H., Chouery, E., Lalanne, M., Megarbane, A., and de Verneuil, H. (2004). Congenital erythropoietic porphyria: report of a novel mutation with absence of clinical manifestations in a homozygous mutant sibling. The Journal of investigative dermatology *123*, 589-591.

Ged, C., Mendez, M., Robert, E., Lalanne, M., Lamrissi-Garcia, I., Costet, P., Daniel, J. Y., Dubus, P., Mazurier, F., Moreau-Gaudry, F., and de Verneuil, H. (2006). A knock-in mouse model of congenital erythropoietic porphyria. Genomics *87*, 84-92.

Ged, C., Moreau-Gaudry, F., Richard, E., Robert-Richard, E., and de Verneuil, H. (2009). Congenital erythropoietic porphyria: mutation update and correlations between genotype and phenotype. Cellular and molecular biology *55*, 53-60.

Geronimi, F., Richard, E., Lamrissi-Garcia, I., Lalanne, M., Ged, C., Redonnet-Vernhet, I., Moreau-Gaudry, F., and de Verneuil, H. (2003a). Lentivirus-mediated gene transfer of uroporphyrinogen III synthase fully corrects the porphyric phenotype in human cells. Journal of molecular medicine *81*, 310-320.

Geronimi, F., Richard, E., Redonnet-Vernhet, I., Lamrissi-Garcia, I., Lalanne, M., Ged, C., Moreau-Gaudry, F., and De Verneuil, H. (2003b). Highly efficient lentiviral gene transfer in CD34+ and CD34+/38-/lin- cells from mobilized peripheral blood after cytokine prestimulation. Stem cells *21*, 472-480.

Gerrits, A., Dykstra, B., Otten, M., Bystrykh, L., and de Haan, G. (2008). Combining transcriptional profiling and genetic linkage analysis to uncover gene networks operating in hematopoietic stem cells and their progeny. Immunogenetics *60*, 411-422.

Giddens, W. E., Jr., Labbe, R. F., Swango, L. J., and Padgett, G. A. (1975). Feline congenital erythropoietic porphyria associated with severe anemia and renal disease. Clinical, morphologic, and biochemical studies. The American journal of pathology *80*, 367-386.

Gioia, R., Panaroni, C., Besio, R., Palladini, G., Merlini, G., Giansanti, V., Scovassi, I. A., Villani, S., Villa, I., Villa, A.*, et al.* (2012). Impaired osteoblastogenesis in a murine model of dominant osteogenesis imperfecta: a new target for osteogenesis imperfecta pharmacological therapy. Stem cells *30*, 1465-1476.

Glenn, B. L., Glenn, H. G., and Omtvedt, I. T. (1968). Congenital porphyria in the domestic cat (Felis catus): preliminary investigations on inheritance pattern. American journal of veterinary research *29*, 1653-1657.

Goldberg, A. L., Cascio, P., Saric, T., and Rock, K. L. (2002). The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. Molecular immunology *39*, 147-164.

Goldstein, B. D., and Harber, L. C. (1972). Erythropoietic protoporphyria: lipid peroxidation and red cell membrane damage associated with photohemolysis. The Journal of clinical investigation *51*, 892-902.

Gore, A., Li, Z., Fung, H. L., Young, J. E., Agarwal, S., Antosiewicz-Bourget, J., Canto, I., Giorgetti, A., Israel, M. A., Kiskinis, E.*, et al.* (2011). Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. Nature *471*, 63-67.

Gouya, L., Deybach, J. C., Lamoril, J., Da Silva, V., Beaumont, C., Grandchamp, B., and Nordmann, Y. (1996). Modulation of the phenotype in dominant erythropoietic protoporphyria by a low expression of the normal ferrochelatase allele. American journal of human genetics *58*, 292-299.

Gouya, L., Martin-Schmitt, C., Robreau, A. M., Austerlitz, F., Da Silva, V., Brun, P., Simonin, S., Lyoumi, S., Grandchamp, B., Beaumont, C.*, et al.* (2006). Contribution of a common single-nucleotide polymorphism to the genetic predisposition for erythropoietic protoporphyria. American journal of human genetics *78*, 2-14.

Gouya, L., Puy, H., Lamoril, J., Da Silva, V., Grandchamp, B., Nordmann, Y., and Deybach, J. C. (1999). Inheritance in erythropoietic protoporphyria: a common wild-type ferrochelatase allelic variant with low expression accounts for clinical manifestation. Blood *93*, 2105-2110.

Gouya, L., Puy, H., Robreau, A. M., Bourgeois, M., Lamoril, J., Da Silva, V., Grandchamp, B., and Deybach, J. C. (2002). The penetrance of dominant erythropoietic protoporphyria is modulated by expression of wildtype FECH. Nature genetics *30*, 27-28.

Gouya, L., Puy, H., Robreau, A. M., Lyoumi, S., Lamoril, J., Da Silva, V., Grandchamp, B., and Deybach, J. C. (2004). Modulation of penetrance by the wild-type allele in dominantly inherited erythropoietic protoporphyria and acute hepatic porphyrias. Human genetics *114*, 256-262.

Greaves, D. R., Fraser, P., Vidal, M. A., Hedges, M. J., Ropers, D., Luzzatto, L., and Grosveld, F. (1990). A transgenic mouse model of sickle cell disorder. Nature *343*, 183-185.

Greber, B., Lehrach, H., and Adjaye, J. (2007). Fibroblast growth factor 2 modulates transforming growth factor beta signaling in mouse embryonic fibroblasts and human ESCs (hESCs) to support hESC self-renewal. Stem cells *25*, 455-464.

Guarini, L., Piomelli, S., and Poh-Fitzpatrick, M. B. (1994). Hydroxyurea in congenital erythropoietic porphyria. The New England journal of medicine *330*, 1091-1092.

Gurdon, J. B., and Uehlinger, V. (1966). "Fertile" intestine nuclei. Nature *210*, 1240-1241.

Gutman, A., Gilthorpe, J., and Rigby, P. W. (1994). Multiple positive and negative regulatory elements in the promoter of the mouse homeobox gene Hoxb-4. Molecular and cellular biology *14*, 8143-8154.

Hacein-Bey-Abina, S., de Saint Basile, G., and Cavazzana-Calvo, M. (2003a). Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency. Methods in molecular biology *215*, 247-259.

Hacein-Bey-Abina, S., Fischer, A., and Cavazzana-Calvo, M. (2002a). Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency. International journal of hematology *76*, 295-298.

Hacein-Bey-Abina, S., Garrigue, A., Wang, G. P., Soulier, J., Lim, A., Morillon, E., Clappier, E., Caccavelli, L., Delabesse, E., Beldjord, K.*, et al.* (2008). Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. The Journal of clinical investigation *118*, 3132-3142.

Hacein-Bey-Abina, S., Hauer, J., Lim, A., Picard, C., Wang, G. P., Berry, C. C., Martinache, C., Rieux-Laucat, F., Latour, S., Belohradsky, B. H.*, et al.* (2010). Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. The New England journal of medicine *363*, 355-364.

Hacein-Bey-Abina, S., Le Deist, F., Carlier, F., Bouneaud, C., Hue, C., De Villartay, J. P., Thrasher, A. J., Wulffraat, N., Sorensen, R., Dupuis-Girod, S.*, et al.* (2002b). Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. The New England journal of medicine *346*, 1185-1193.

Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., Radford, I., Villeval, J. L., Fraser, C. C., Cavazzana-Calvo, M., and Fischer, A. (2003b). A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. The New England journal of medicine *348*, 255-256.

Hanna, J., Saha, K., Pando, B., van Zon, J., Lengner, C. J., Creyghton, M. P., van Oudenaarden, A., and Jaenisch, R. (2009). Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. Nature *462*, 595-601.

Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C. W., Meissner, A., Cassady, J. P., Beard, C., Brambrink, T., Wu, L. C., Townes, T. M., and Jaenisch, R. (2007). Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. Science *318*, 1920-1923.

Harada, F. A., Shwayder, T. A., Desnick, R. J., and Lim, H. W. (2001). Treatment of severe congenital erythropoietic porphyria by bone marrow transplantation. Journal of the American Academy of Dermatology *45*, 279-282.

Harley, C. B. (1991). Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? Mutation research *256*, 271-282.

Hays, T., Rusyn, I., Burns, A. M., Kennett, M. J., Ward, J. M., Gonzalez, F. J., and Peters, J. M. (2005). Role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) in bezafibrate-induced hepatocarcinogenesis and cholestasis. Carcinogenesis *26*, 219-227.

He, J. Q., Ma, Y., Lee, Y., Thomson, J. A., and Kamp, T. J. (2003). Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. Circulation research *93*, 32-39.

Heo, I., Joo, C., Cho, J., Ha, M., Han, J., and Kim, V. N. (2008). Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. Molecular cell *32*, 276-284.

Herbert, A., Corbin, D., Williams, A., Thompson, D., Buckels, J., and Elias, E. (1991). Erythropoietic protoporphyria: unusual skin and neurological problems after liver transplantation. Gastroenterology *100*, 1753-1757.

Hernandez, F., and Avila, J. (2007). Tauopathies. Cellular and molecular life sciences : CMLS *64*, 2219-2233.

Hiller, M. M., Finger, A., Schweiger, M., and Wolf, D. H. (1996). ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. Science *273*, 1725-1728.

Hogeling, M., Nakano, T., Dvorak, C. C., Maguiness, S., and Frieden, I. J. (2011). Severe neonatal congenital erythropoietic porphyria. Pediatric dermatology *28*, 416-420.

Hole, N., Graham, G. J., Menzel, U., and Ansell, J. D. (1996). A limited temporal window for the derivation of multilineage repopulating hematopoietic progenitors during embryonal stem cell differentiation in vitro. Blood *88*, 1266-1276.

Holme, S. A., Worwood, M., Anstey, A. V., Elder, G. H., and Badminton, M. N. (2007). Erythropoiesis and iron metabolism in dominant erythropoietic protoporphyria. Blood *110*, 4108-4110.

Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Kanagawa, O., Nakagawa, M., Okita, K., and Yamanaka, S. (2009). Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. Nature *460*, 1132-1135.

Hopper, E. D., Pittman, A. M., Fitzgerald, M. C., and Tucker, C. L. (2008). In vivo and in vitro examination of stability of primary hyperoxaluria-associated human alanine:glyoxylate aminotransferase. The Journal of biological chemistry *283*, 30493-30502.

Hu, Q., Friedrich, A. M., Johnson, L. V., and Clegg, D. O. (2010). Memory in induced pluripotent stem cells: reprogrammed human retinal-pigmented epithelial cells show tendency for spontaneous redifferentiation. Stem cells *28*, 1981-1991.

Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A. E., and Melton, D. A. (2008). Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. Nature biotechnology *26*, 795-797.

Hussein, S. M., Batada, N. N., Vuoristo, S., Ching, R. W., Autio, R., Narva, E., Ng, S., Sourour, M., Hamalainen, R., Olsson, C*., et al.* (2011). Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. Nature *471*, 58-62.

Hutter, G., Nowak, D., Mossner, M., Ganepola, S., Mussig, A., Allers, K., Schneider, T., Hofmann, J., Kucherer, C., Blau, O*., et al.* (2009). Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. The New England journal of medicine *360*, 692-698.

Ichida, J. K., Blanchard, J., Lam, K., Son, E. Y., Chung, J. E., Egli, D., Loh, K. M., Carter, A. C., Di Giorgio, F. P., Koszka, K*., et al.* (2009). A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. Cell stem cell *5*, 491-503.

Ieda, M., Fu, J. D., Delgado-Olguin, P., Vedantham, V., Hayashi, Y., Bruneau, B. G., and Srivastava, D. (2010). Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. Cell *142*, 375-386.

Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, M., Soreq, H., and Benvenisty, N. (2000). Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. Molecular medicine *6*, 88-95.

Ivanovic, Z., Bartolozzi, B., Bernabei, P. A., Cipolleschi, M. G., Rovida, E., Milenkovic, P., Praloran, V., and Dello Sbarba, P. (2000). Incubation of murine bone marrow cells in hypoxia ensures the maintenance of marrow-repopulating ability together with the expansion of committed progenitors. British journal of haematology *108*, 424-429.

Jackson, K. A., Mi, T., and Goodell, M. A. (1999). Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *96*, 14482-14486.

Jacobson, S. G., Cideciyan, A. V., Ratnakaram, R., Heon, E., Schwartz, S. B., Roman, A. J., Peden, M. C., Aleman, T. S., Boye, S. L., Sumaroka, A.*, et al.* (2012). Gene therapy for leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years. Archives of ophthalmology *130*, 9-24.

James, D., Levine, A. J., Besser, D., and Hemmati-Brivanlou, A. (2005). TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. Development *132*, 1273-1282.

Janousek, V. (1970). The early changes in experimental porphyria of mice induced by griseofulvin. Transactions of the St John's Hospital Dermatological Society *56*, 14-18.

Jordan, C. T., and Lemischka, I. R. (1990). Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse. Genes & development *4*, 220-232.

Jura, N., Scotto-Lavino, E., Sobczyk, A., and Bar-Sagi, D. (2006). Differential modification of Ras proteins by ubiquitination. Molecular cell *21*, 679-687.

Kadish KM, Smith KM and Guilard R, (2003). The Porphyrin Handbook. Volume 14, Medical Aspects of Porphyrins, Academic Press.

Kahan, B. W., and Ephrussi, B. (1970). Developmental potentialities of clonal in vitro cultures of mouse testicular teratoma. Journal of the National Cancer Institute *44*, 1015-1036.

Katugampola, R. P., Anstey, A. V., Finlay, A. Y., Whatley, S., Woolf, J., Mason, N., Deybach, J. C., Puy, H., Ged, C., de Verneuil, H.*, et al.* (2012a). A management algorithm for congenital erythropoietic porphyria derived from a study of 29 cases. The British journal of dermatology *167*, 888-900.

Katugampola, R. P., Badminton, M. N., Finlay, A. Y., Whatley, S., Woolf, J., Mason, N., Deybach, J. C., Puy, H., Ged, C., de Verneuil, H.*, et al.* (2012b). Congenital erythropoietic porphyria: a single-observer clinical study of 29 cases. The British journal of dermatology *167*, 901-913.

Kauffman, L., Evans, D. I., Stevens, R. F., and Weinkove, C. (1991). Bone-marrow transplantation for congenital erythropoietic porphyria. Lancet *337*, 1510-1511.

Kaufman, D. S., Hanson, E. T., Lewis, R. L., Auerbach, R., and Thomson, J. A. (2001). Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *98*, 10716-10721.

Kauppinen, R., Glass, I. A., Aizencang, G., Astrin, K. H., Atweh, G. F., and Desnick, R. J. (1998). Congenital erythropoietic porphyria: prolonged high-level expression and correction of the heme biosynthetic defect by retroviral-mediated gene transfer into porphyric and erythroid cells. Molecular genetics and metabolism *65*, 10-17.

Kawamura, T., Suzuki, J., Wang, Y. V., Menendez, S., Morera, L. B., Raya, A., Wahl, G. M., and Izpisua Belmonte, J. C. (2009). Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. Nature *460*, 1140-1144.

Kehat, I., Amit, M., Gepstein, A., Huber, I., Itskovitz-Eldor, J., and Gepstein, L. (2003). Development of cardiomyocytes from human ES cells. Methods in enzymology *365*, 461-473.

Keirstead, H. S., Nistor, G., Bernal, G., Totoiu, M., Cloutier, F., Sharp, K., and Steward, O. (2005). Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *25*, 4694-4705.

Kim, D., Kim, C. H., Moon, J. I., Chung, Y. G., Chang, M. Y., Han, B. S., Ko, S., Yang, E., Cha, K. Y., Lanza, R., and Kim, K. S. (2009). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. Cell stem cell *4*, 472-476.

Kim, J. B., Zaehres, H., Wu, G., Gentile, L., Ko, K., Sebastiano, V., Arauzo-Bravo, M. J., Ruau, D., Han, D. W., Zenke, M., and Scholer, H. R. (2008). Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. Nature *454*, 646-650.

Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M. J., Ji, H., Ehrlich, L. I.*, et al.* (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. Nature *467*, 285-290.

Kleinsmith, L. J., and Pierce, G. B., Jr. (1964). Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. Cancer research *24*, 1544-1551.

Klug, M. G., Soonpaa, M. H., Koh, G. Y., and Field, L. J. (1996). Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embronic stem cells form stable intracardiac grafts. The Journal of clinical investigation *98*, 216-224.

Komatsu, H., Sajima, Y., Imamura, K., Masuda, H., Yonei, Y., Dohmori, K., Kokutoh, M., Ishii, K., and Ishii, H. (2000). An ultrastructural study of the liver in erythropoietic protoporphyria. Medical electron microscopy : official journal of the Clinical Electron Microscopy Society of Japan *33*, 32-38.

Konrad, K., Honigsmann, H., Gschnait, F., and Wolff, K. (1975). Mouse model for protoporphyria. II. Cellular and subcellular events in the photosensitivity flare of the skin. The Journal of investigative dermatology *65*, 300-310.

Kosenow, W., and Treibs, A. (1953). [Light hypersensitivity and porphyrinemia]. Zeitschrift fur Kinderheilkunde *73*, 82-92.

Kruger, E., Kloetzel, P. M., and Enenkel, C. (2001). 20S proteasome biogenesis. Biochimie *83*, 289-293.

Kuhn, D. J., Orlowski, R. Z., and Bjorklund, C. C. (2011). Second generation proteasome inhibitors: carfilzomib and immunoproteasome-specific inhibitors (IPSIs). Current cancer drug targets *11*, 285-295.

Kulkeaw, K., Horio, Y., Mizuochi, C., Ogawa, M., and Sugiyama, D. (2010). Variation in hematopoietic potential of induced pluripotent stem cell lines. Stem cell reviews *6*, 381-389.

Kurihara, K., Takamura, N., Imaizumi, S., Yamashita, S., and Kondo, M. (2001). Ocular involvement caused by the accumulation of porphyrins in a patient with congenital erythropoietic porphyria. The British journal of ophthalmology *85*, 1265-1266.

Kwon, S. H., Florens, L., Swanson, S. K., Washburn, M. P., Abmayr, S. M., and Workman, J. L. (2010). Heterochromatin protein 1 (HP1) connects the FACT histone chaperone complex to the phosphorylated CTD of RNA polymerase II. Genes & development *24*, 2133-2145.

Kyba, M., Perlingeiro, R. C., and Daley, G. Q. (2002). HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. Cell *109*, 29-37.

Lagarde, C., Hamel-Teillac, D., De Prost, Y., Blanche, S., Thomas, C., Fischer, A., Nordmann, Y., Ged, C., and De Verneuil, H. (1998). [Allogeneic bone marrow transplantation in congenital erythropoietic porphyria. Gunther's disease]. Annales de dermatologie et de venereologie *125*, 114-117.

Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I. L., and Grompe, M. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. Nature medicine *6*, 1229-1234.

Lam, Y. A., Lawson, T. G., Velayutham, M., Zweier, J. L., and Pickart, C. M. (2002). A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. Nature *416*, 763-767.

Lamoril, J., Boulechfar, S., de Verneuil, H., Grandchamp, B., Nordmann, Y., and Deybach, J. C. (1991). Human erythropoietic protoporphyria: two point mutations in the ferrochelatase gene. Biochemical and biophysical research communications *181*, 594-599.

Lapillonne, H., Kobari, L., Mazurier, C., Tropel, P., Giarratana, M. C., Zanella-Cleon, I., Kiger, L., Wattenhofer-Donze, M., Puccio, H., Hebert, N.*, et al.* (2010). Red blood cell generation from human induced pluripotent stem cells: perspectives for transfusion medicine. Haematologica *95*, 1651-1659.

Lartillot, N., Lespinet, O., Vervoort, M., and Adoutte, A. (2002). Expression pattern of Brachyury in the mollusc Patella vulgata suggests a conserved role in the establishment of the AP axis in Bilateria. Development *129*, 1411-1421.

Laurent, L. C., Ulitsky, I., Slavin, I., Tran, H., Schork, A., Morey, R., Lynch, C., Harness, J. V., Lee, S., Barrero, M. J.*, et al.* (2011). Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. Cell stem cell *8*, 106-118.

Lavenu-Bombled, C., Izac, B., Legrand, F., Cambot, M., Vigier, A., Masse, J. M., and Dubart-Kupperschmitt, A. (2007). Glycoprotein Ibalpha promoter drives megakaryocytic lineage-restricted expression after hematopoietic stem cell transduction using a self-inactivating lentiviral vector. Stem cells *25*, 1571-1577.

Lazebnik, N., and Lazebnik, R. S. (2004). The prenatal presentation of congenital erythropoietic porphyria: report of two siblings with elevated maternal serum alpha-fetoprotein. Prenatal diagnosis *24*, 282-286.

Lebreuilly-Sohyer, I., Morice, A., Acher, A., Dompmartin, A., Clement, C., de Verneuil, H., Ged, C., Leroy, D., and Verneuil, L. (2010). [Congenital erythropoeietic porphyria treated by haematopoietic stem cell allograft]. Annales de dermatologie et de venereologie *137*, 635-639.

Lecha, M., Puy, H., and Deybach, J. C. (2009). Erythropoietic protoporphyria. Orphanet journal of rare diseases *4*, 19.

Lengerke, C., Grauer, M., Niebuhr, N. I., Riedt, T., Kanz, L., Park, I. H., and Daley, G. Q. (2009). Hematopoietic development from human induced pluripotent stem cells. Annals of the New York Academy of Sciences *1176*, 219-227.

Levenberg, S., Golub, J. S., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., and Langer, R. (2002). Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *99*, 4391-4396.

Levenberg, S., Huang, N. F., Lavik, E., Rogers, A. B., Itskovitz-Eldor, J., and Langer, R. (2003). Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *100*, 12741-12746.

Levenstein, M. E., Ludwig, T. E., Xu, R. H., Llanas, R. A., VanDenHeuvel-Kramer, K., Manning, D., and Thomson, J. A. (2006). Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. Stem cells *24*, 568-574.

Levin, E. Y. (1968). Uroporphyrinogen 3 cosynthetase in bovine erythropoietic porphyria. Science *161*, 907-908.

Levin, E. Y., and Flyger, V. (1973). Erythropoietic porphyria of the fox squirrel Sciurus niger. The Journal of clinical investigation *52*, 96-105.

Li, H., Collado, M., Villasante, A., Strati, K., Ortega, S., Canamero, M., Blasco, M. A., and Serrano, M. (2009a). The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. Nature *460*, 1136-1139.

Li, H., Haurigot, V., Doyon, Y., Li, T., Wong, S. Y., Bhagwat, A. S., Malani, N., Anguela, X. M., Sharma, R., Ivanciu, L.*, et al.* (2011). In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. Nature *475*, 217-221.

Li, J., Wang, G., Wang, C., Zhao, Y., Zhang, H., Tan, Z., Song, Z., Ding, M., and Deng, H. (2007). MEK/ERK signaling contributes to the maintenance of human embryonic stem cell self-renewal. Differentiation; research in biological diversity *75*, 299-307.

Li, L., and Bhatia, R. (2011). Stem cell quiescence. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *17*, 4936-4941.

Li, M., Husic, N., Lin, Y., Christensen, H., Malik, I., McIver, S., LaPash Daniels, C. M., Harris, D. A., Kotzbauer, P. T., Goldberg, M. P., and Snider, B. J. (2010). Optimal promoter usage for lentiviral vector-mediated transduction of cultured central nervous system cells. Journal of neuroscience methods *189*, 56-64.

Li, W., Wei, W., Zhu, S., Zhu, J., Shi, Y., Lin, T., Hao, E., Hayek, A., Deng, H., and Ding, S. (2009b). Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. Cell stem cell *4*, 16-19.

Li, Y., McClintick, J., Zhong, L., Edenberg, H. J., Yoder, M. C., and Chan, R. J. (2005). Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. Blood *105*, 635-637.

Lin, S. L., Chang, D. C., Lin, C. H., Ying, S. Y., Leu, D., and Wu, D. T. (2011). Regulation of somatic cell reprogramming through inducible mir-302 expression. Nucleic acids research *39*, 1054-1065.

Lister, R., Pelizzola, M., Kida, Y. S., Hawkins, R. D., Nery, J. R., Hon, G., Antosiewicz-Bourget, J., O'Malley, R., Castanon, R., Klugman, S.*, et al.* (2011). Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. Nature *471*, 68-73.

Liu, H., Zhu, F., Yong, J., Zhang, P., Hou, P., Li, H., Jiang, W., Cai, J., Liu, M., Cui, K.*, et al.* (2008). Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. Cell stem cell *3*, 587-590.

Liu, S., Qu, Y., Stewart, T. J., Howard, M. J., Chakrabortty, S., Holekamp, T. F., and McDonald, J. W. (2000). Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *97*, 6126-6131.

Lombardo, A., Cesana, D., Genovese, P., Di Stefano, B., Provasi, E., Colombo, D. F., Neri, M., Magnani, Z., Cantore, A., Lo Riso, P.*, et al.* (2011). Site-specific integration and tailoring of cassette design for sustainable gene transfer. Nature methods *8*, 861-869.

Lowry, W. E., Richter, L., Yachechko, R., Pyle, A. D., Tchieu, J., Sridharan, R., Clark, A. T., and Plath, K. (2008). Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *105*, 2883-2888.

Lu, B., Malcuit, C., Wang, S., Girman, S., Francis, P., Lemieux, L., Lanza, R., and Lund, R. (2009). Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. Stem cells *27*, 2126-2135.

Lyoumi, S., Abitbol, M., Rainteau, D., Karim, Z., Bernex, F., Oustric, V., Millot, S., Letteron, P., Heming, N., Guillmot, L.*, et al.* (2011). Protoporphyrin retention in hepatocytes and

Kupffer cells prevents sclerosing cholangitis in erythropoietic protoporphyria mouse model. Gastroenterology *141*, 1509-1519, 1519 e1501-1503.

Magness, S. T., Maeda, N., and Brenner, D. A. (2002). An exon 10 deletion in the mouse ferrochelatase gene has a dominant-negative effect and causes mild protoporphyria. Blood *100*, 1470-1477.

Magnus, I. A., Jarrett, A., Prankerd, T. A., and Rimington, C. (1961). Erythropoietic protoporphyria. A new porphyria syndrome with solar urticaria due to protoporphyrinaemia. Lancet *2*, 448-451.

Maherali, N., Ahfeldt, T., Rigamonti, A., Utikal, J., Cowan, C., and Hochedlinger, K. (2008). A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. Cell stem cell *3*, 340-345.

Maherali, N., and Hochedlinger, K. (2009). Tgfbeta signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. Current biology : CB *19*, 1718-1723.

Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R.*, et al.* (2007). Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. Cell stem cell *1*, 55-70.

Marcellini, S., Technau, U., Smith, J. C., and Lemaire, P. (2003). Evolution of Brachyury proteins: identification of a novel regulatory domain conserved within Bilateria. Developmental biology *260*, 352-361.

Marion, R. M., Strati, K., Li, H., Murga, M., Blanco, R., Ortega, S., Fernandez-Capetillo, O., Serrano, M., and Blasco, M. A. (2009). A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. Nature *460*, 1149-1153.

Marro, S., Pang, Z. P., Yang, N., Tsai, M. C., Qu, K., Chang, H. Y., Sudhof, T. C., and Wernig, M. (2011). Direct lineage conversion of terminally differentiated hepatocytes to functional neurons. Cell stem cell *9*, 374-382.

Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *78*, 7634-7638.

Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A. A.*, et al.* (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. Nature cell biology *9*, 625-635.

Mathews-Roth, M. M. (1984). Treatment of erythropoietic protoporphyria with beta-carotene. Photo-dermatology *1*, 318-321.

Mathews-Roth, M. M. (1993). Carotenoids in erythropoietic protoporphyria and other photosensitivity diseases. Annals of the New York Academy of Sciences *691*, 127-138.

Mathews-Roth, M. M., Drouin, G. L., and Duffy, L. (1987). Isolation of human ferrochelatase. Archives of dermatology *123*, 429-430.

Mathews-Roth, M. M., Michel, J. L., and Wise, R. J. (1995). Amelioration of the metabolic defect in erythropoietic protoporphyria by expression of human ferrochelatase in cultured cells. The Journal of investigative dermatology *104*, 497-499.

Mayer, M. P., and Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. Cellular and molecular life sciences : CMLS *62*, 670-684.

Mayshar, Y., Ben-David, U., Lavon, N., Biancotti, J. C., Yakir, B., Clark, A. T., Plath, K., Lowry, W. E., and Benvenisty, N. (2010). Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. Cell stem cell *7*, 521-531.

Mazurier, F., Geronimi, F., Lamrissi-Garcia, I., Morel, C., Richard, E., Ged, C., Fontanellas, A., Moreau-Gaudry, F., Morey, M., and de Verneuil, H. (2001). Correction of deficient CD34+ cells from peripheral blood after mobilization in a patient with congenital erythropoietic porphyria. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy *3*, 411-417.

Mazurier, F., Moreau-Gaudry, F., Salesse, S., Barbot, C., Ged, C., Reiffers, J., and de Verneuil, H. (1997). Gene transfer of the uroporphyrinogen III synthase cDNA into haematopoietic progenitor cells in view of a future gene therapy in congenital erythropoietic porphyria. Journal of inherited metabolic disease *20*, 247-257.

McCullough, A. J., Barron, D., Mullen, K. D., Petrelli, M., Park, M. C., Mukhtar, H., and Bickers, D. R. (1988). Fecal protoporphyrin excretion in erythropoietic protoporphyria: effect of cholestyramine and bile acid feeding. Gastroenterology *94*, 177-181.

McGuire, B. M., Bonkovsky, H. L., Carithers, R. L., Jr., Chung, R. T., Goldstein, L. I., Lake, J. R., Lok, A. S., Potter, C. J., Rand, E., Voigt, M. D.*, et al.* (2005). Liver transplantation for erythropoietic protoporphyria liver disease. Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society *11*, 1590-1596.

Meerman, L., Haagsma, E. B., Gouw, A. S., Slooff, M. J., and Jansen, P. L. (1999). Long-term follow-up after liver transplantation for erythropoietic protoporphyria. European journal of gastroenterology & hepatology *11*, 431-438.

Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E., and Sommer, T. (2005). ERAD: the long road to destruction. Nature cell biology *7*, 766-772.

Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R. A., and McKercher, S. R. (2000). Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. Science *290*, 1779-1782.

Michalczyk, K., and Ziman, M. (2005). Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. Histology and histopathology *20*, 665-671.

Minder, E. I. (2010). Afamelanotide, an agonistic analog of alpha-melanocyte-stimulating hormone, in dermal phototoxicity of erythropoietic protoporphyria. Expert opinion on investigational drugs *19*, 1591-1602.

Minder, E. I., Gouya, L., Schneider-Yin, X., and Deybach, J. C. (2002). A genotype-phenotype correlation between null-allele mutations in the ferrochelatase gene and liver complication in patients with erythropoietic protoporphyria. Cellular and molecular biology *48*, 91-96.

Miranda, M., and Sorkin, A. (2007). Regulation of receptors and transporters by ubiquitination: new insights into surprisingly similar mechanisms. Molecular interventions *7*, 157-167.

Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. Cell *113*, 631-642.

Miyoshi, H., Smith, K. A., Mosier, D. E., Verma, I. M., and Torbett, B. E. (1999). Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. Science *283*, 682-686.

Miyoshi, N., Ishii, H., Nagano, H., Haraguchi, N., Dewi, D. L., Kano, Y., Nishikawa, S., Tanemura, M., Mimori, K., Tanaka, F.*, et al.* (2011). Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. Cell stem cell *8*, 633-638.

Moreau-Gaudry, F., Barbot, C., Mazurier, F., Mahon, F. X., Reiffers, J., Ged, C., and de Verneuil, H. (1996). Correction of the enzyme deficit of bone marrow cells in congenital erythropoietic porphyria by retroviral gene transfer. Hematology and cell therapy *38*, 217-220.

Moreau-Gaudry, F., Ged, C., Barbot, C., Mazurier, F., Boiron, J. M., Bensidhoum, M., Reiffers, J., and de Verneuil, H. (1995a). Correction of the enzyme defect in cultured congenital erythropoietic porphyria disease cells by retrovirus-mediated gene transfer. Human gene therapy *6*, 13-20.

Moreau-Gaudry, F., Mazurier, F., Bensidhoum, M., Ged, C., and de Verneuil, H. (1995b). Metabolic correction of congenital erythropoietic porphyria by retrovirus-mediated gene transfer into Epstein-Barr virus-transformed B-cell lines. Blood *85*, 1449-1453.

Morozova, O., and Marra, M. A. (2008). Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. Genomics *92*, 255-264.

Moshell, A. N., and Bjornson, L. (1977). Photoprotection in erythropoietic protoporphyria: mechanism of photoprotection by beta carotene. The Journal of investigative dermatology *68*, 157-160.

Muller, A. M., and Dzierzak, E. A. (1993). ES cells have only a limited lymphopoietic potential after adoptive transfer into mouse recipients. Development *118*, 1343-1351.

Mummery, C., Ward-van Oostwaard, D., Doevendans, P., Spijker, R., van den Brink, S., Hassink, R., van der Heyden, M., Opthof, T., Pera, M., de la Riviere, A. B.*, et al.* (2003). Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. Circulation *107*, 2733-2740.

Munakata, H., Sun, J. Y., Yoshida, K., Nakatani, T., Honda, E., Hayakawa, S., Furuyama, K., and Hayashi, N. (2004). Role of the heme regulatory motif in the heme-mediated inhibition of mitochondrial import of 5-aminolevulinate synthase. Journal of biochemistry *136*, 233-238.

Nagy, A., Gocza, E., Diaz, E. M., Prideaux, V. R., Ivanyi, E., Markkula, M., and Rossant, J. (1990). Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. Development *110*, 815-821.

Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., and Roder, J. C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *90*, 8424-8428.

Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., and Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. Nature biotechnology *26*, 101-106.

Nakagawa, M., Takizawa, N., Narita, M., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2010). Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *107*, 14152-14157.

Nakano, T., Kodama, H., and Honjo, T. (1994). Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. Science *265*, 1098-1101.

Nakao, K., Wada, O., Takaku, F., Sassa, S., Yano, Y., and Urata, G. (1967). The origin of the increased protoporphyrin in erythrocytes of mice with experimentally induced porphyria. The Journal of laboratory and clinical medicine *70*, 923-932.

Naldini, L. (1998). Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. Current opinion in biotechnology *9*, 457-463.

Neff, T., Beard, B. C., and Kiem, H. P. (2006). Survival of the fittest: in vivo selection and stem cell gene therapy. Blood *107*, 1751-1760.

Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. Cell *95*, 379-391.

Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. Nature genetics *24*, 372-376.

Oguz, F., Sidal, M., Bayram, C., Sansoy, N., and Hekim, N. (1993). Ocular involvement in two symptomatic congenital erythropoietic porphyria. European journal of pediatrics *152*, 671-673.

Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. Nature *448*, 313-317.

Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. Science *322*, 949-953.

Omata, Y., Sakamoto, H., Higashimoto, Y., Hayashi, S., and Noguchi, M. (2004). Purification and characterization of human uroporphyrinogen III synthase expressed in Escherichia coli. Journal of biochemistry *136*, 211-220.

Orlowski, R. Z., Voorhees, P. M., Garcia, R. A., Hall, M. D., Kudrik, F. J., Allred, T., Johri, A. R., Jones, P. E., Ivanova, A., Van Deventer, H. W.*, et al.* (2005). Phase 1 trial of the proteasome inhibitor bortezomib and pegylated liposomal doxorubicin in patients with advanced hematologic malignancies. Blood *105*, 3058-3065.

Oshikawa, Y., Fukushima, S., Miyake, T., Kawaguchi, T., Motomura, K., Nakashima, Y., Nakamura, K., Jinnin, M., and Ihn, H. (2012). Photosensitivity and acute liver insufficiency in late-onset erythropoietic protoporphyria with a chromosome 18q abnormality. Case reports in dermatology *4*, 144-149.

Pang, Z. P., Yang, N., Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Fuentes, D. R., Yang, T. Q., Citri, A., Sebastiano, V., Marro, S., Sudhof, T. C., and Wernig, M. (2011). Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. Nature *476*, 220-223.

Papapetrou, E. P., Lee, G., Malani, N., Setty, M., Riviere, I., Tirunagari, L. M., Kadota, K., Roth, S. L., Giardina, P., Viale, A.*, et al.* (2011). Genomic safe harbors permit high beta-globin transgene expression in thalassemia induced pluripotent stem cells. Nature biotechnology *29*, 73-78.

Parenti, G. (2009). Treating lysosomal storage diseases with pharmacological chaperones: from concept to clinics. EMBO molecular medicine *1*, 268-279.

Park, I. H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M. W., Cowan, C., Hochedlinger, K., and Daley, G. Q. (2008a). Disease-specific induced pluripotent stem cells. Cell *134*, 877-886.

Park, I. H., Zhao, R., West, J. A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T. A., Lerou, P. H., Lensch, M. W., and Daley, G. Q. (2008b). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. Nature *451*, 141-146.

Park, S. W., Jun Koh, Y., Jeon, J., Cho, Y. H., Jang, M. J., Kang, Y., Kim, M. J., Choi, C., Sook Cho, Y., Chung, H. M.*, et al.* (2010). Efficient differentiation of human pluripotent stem cells into functional CD34+ progenitor cells by combined modulation of the MEK/ERK and BMP4 signaling pathways. Blood *116*, 5762-5772.

Park, T. S., Zimmerlin, L., and Zambidis, E. T. (2012). Efficient and simultaneous generation of hematopoietic and vascular progenitors from human induced pluripotent stem cells. Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology.

Pawliuk, R., Bachelot, T., Wise, R. J., Mathews-Roth, M. M., and Leboulch, P. (1999). Long-term cure of the photosensitivity of murine erythropoietic protoporphyria by preselective gene therapy. Nature medicine *5*, 768-773.

Perrier, A., and Peschanski, M. (2012). How can human pluripotent stem cells help decipher and cure Huntington's disease? Cell stem cell *11*, 153-161.

Pey, A. L., Ying, M., Cremades, N., Velazquez-Campoy, A., Scherer, T., Thony, B., Sancho, J., and Martinez, A. (2008). Identification of pharmacological chaperones as potential therapeutic agents to treat phenylketonuria. The Journal of clinical investigation *118*, 2858-2867.

Pfaff, N., Lachmann, N., Kohlscheen, S., Sgodda, M., Arauzo-Bravo, M. J., Greber, B., Kues, W., Glage, S., Baum, C., Niemann, H.*, et al.* (2012). Efficient hematopoietic redifferentiation of induced pluripotent stem cells derived from primitive murine bone marrow cells. Stem cells and development *21*, 689-701.

Phillips, J. D., Steensma, D. P., Pulsipher, M. A., Spangrude, G. J., and Kushner, J. P. (2007a). Congenital erythropoietic porphyria due to a mutation in GATA1: the first trans-acting mutation causative for a human porphyria. Blood *109*, 2618-2621.

Phillips, J. D., Whitby, F. G., Stadtmueller, B. M., Edwards, C. Q., Hill, C. P., and Kushner, J. P. (2007b). Two novel uroporphyrinogen decarboxylase (URO-D) mutations causing hepatoerythropoietic porphyria (HEP). Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine *149*, 85-91.

Pigneux, A., Mahon, F. X., Moreau-Gaudry, F., Uhalde, M., de Verneuil, H., Lacombe, F., Reiffers, J., Milpied, N., Praloran, V., and Belloc, F. (2007). Proteasome inhibition specifically sensitizes leukemic cells to anthracyclin-induced apoptosis through the accumulation of Bim and Bax pro-apoptotic proteins. Cancer biology & therapy *6*, 603-611.

Piomelli, S., Poh-Fitzpatrick, M. B., Seaman, C., Skolnick, L. M., and Berdon, W. E. (1986). Complete suppression of the symptoms of congenital erythropoietic porphyria by long-term treatment with high-level transfusions. The New England journal of medicine *314*, 1029-1031.

Poh-Fitzpatrick, M. B. (1985). Porphyrin-sensitized cutaneous photosensitivity: pathogenesis and treatment. Clinics in dermatology *3*, 41-82.

Poh-Fitzpatrick, M. B., Ramsay, C. A., Frain-Bell, W., Tamayo, L., Kahn, T. A., and Bickers, D. R. (1988). Photodermatosis in infants and children. Pediatric dermatology *5*, 189-200.

Poh-Fitzpatrick, M. B., Wang, X., Anderson, K. E., Bloomer, J. R., Bolwell, B., and Lichtin, A. E. (2002). Erythropoietic protoporphyria: altered phenotype after bone marrow transplantation for myelogenous leukemia in a patient heteroallelic for ferrochelatase gene mutations. Journal of the American Academy of Dermatology *46*, 861-866.

Ponder, K. P., and Haskins, M. E. (2007). Gene therapy for mucopolysaccharidosis. Expert opinion on biological therapy *7*, 1333-1345.

Ponka, P. (1999). Cellular iron metabolism. Kidney international Supplement *69*, S2-11.

Porteus, M. H., and Carroll, D. (2005). Gene targeting using zinc finger nucleases. Nature biotechnology *23*, 967-973.

Porto, C., Cardone, M., Fontana, F., Rossi, B., Tuzzi, M. R., Tarallo, A., Barone, M. V., Andria, G., and Parenti, G. (2009). The pharmacological chaperone N-butyldeoxynojirimycin

enhances enzyme replacement therapy in Pompe disease fibroblasts. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy *17*, 964-971.

Puy, H., Gouya, L., and Deybach, J. C. (2010). Porphyrias. Lancet *375*, 924-937.

Rademakers, L. H., Cleton, M. I., Kooijman, C., Baart de la Faille, H., and van Hattum, J. (1990). Early involvement of hepatic parenchymal cells in erythrohepatic protoporphyria? An ultrastructural study of patients with and without overt liver disease and the effect of chenodeoxycholic acid treatment. Hepatology *11*, 449-457.

Rand, E. B., Bunin, N., Cochran, W., Ruchelli, E., Olthoff, K. M., and Bloomer, J. R. (2006). Sequential liver and bone marrow transplantation for treatment of erythropoietic protoporphyria. Pediatrics *118*, e1896-1899.

Raya, A., Rodriguez-Piza, I., Guenechea, G., Vassena, R., Navarro, S., Barrero, M. J., Consiglio, A., Castella, M., Rio, P., Sleep, E.*, et al.* (2009). Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. Nature *460*, 53-59.

Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Vajta, G., and Trounson, A. O. (2001). Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method. Human reproduction *16*, 2187-2194.

Richard, E., Geronimi, F., Lalanne, M., Ged, C., Redonnet-Vernhet, I., Lamrissi-Garcia, I., Gerson, S. L., de Verneuil, H., and Moreau-Gaudry, F. (2003). A bicistronic SIN-lentiviral vector containing G156A MGMT allows selection and metabolic correction of hematopoietic protoporphyric cell lines. The journal of gene medicine *5*, 737-747.

Richard, E., Mendez, M., Mazurier, F., Morel, C., Costet, P., Xia, P., Fontanellas, A., Geronimi, F., Cario-Andre, M., Taine, L.*, et al.* (2001). Gene therapy of a mouse model of protoporphyria with a self-inactivating erythroid-specific lentiviral vector without preselection. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy *4*, 331-338.

Richard, E., Robert-Richard, E., Ged, C., Moreau-Gaudry, F., and de Verneuil, H. (2008). Erythropoietic porphyrias: animal models and update in gene-based therapies. Current gene therapy *8*, 176-186.

Richard, E., Robert, E., Cario-Andre, M., Ged, C., Geronimi, F., Gerson, S. L., de Verneuil, H., and Moreau-Gaudry, F. (2004). Hematopoietic stem cell gene therapy of murine protoporphyria by methylguanine-DNA-methyltransferase-mediated in vivo drug selection. Gene therapy *11*, 1638-1647.

Robert-Richard, E., Lalanne, M., Lamrissi-Garcia, I., Guyonnet-Duperat, V., Richard, E., Pitard, V., Mazurier, F., Moreau-Gaudry, F., Ged, C., and de Verneuil, H. (2010). Modeling of congenital erythropoietic porphyria by RNA interference: a new tool for preclinical gene therapy evaluation. The journal of gene medicine *12*, 637-646.

Robert-Richard, E., Moreau-Gaudry, F., Lalanne, M., Lamrissi-Garcia, I., Cario-Andre, M., Guyonnet-Duperat, V., Taine, L., Ged, C., and de Verneuil, H. (2008). Effective gene therapy of mice with congenital erythropoietic porphyria is facilitated by a survival advantage of corrected erythroid cells. American journal of human genetics *82*, 113-124.

Robinton, D. A., and Daley, G. Q. (2012). The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. Nature *481*, 295-305.

Rodda, D. J., Chew, J. L., Lim, L. H., Loh, Y. H., Wang, B., Ng, H. H., and Robson, P. (2005). Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. The Journal of biological chemistry *280*, 24731-24737.

Rohwedel, J., Maltsev, V., Bober, E., Arnold, H. H., Hescheler, J., and Wobus, A. M. (1994). Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. Developmental biology *164*, 87-101.

Romisch, K. (2005). Endoplasmic reticulum-associated degradation. Annual review of cell and developmental biology *21*, 435-456.

Ross, J., and Sautner, D. (1976). Induction of globin mRNA accumulation by hemin in cultured erythroleukemic cells. Cell *8*, 513-520.

Rowland, B. D., and Peeper, D. S. (2006). KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer. Nature reviews Cancer *6*, 11-23.

Sadelain, M., Papapetrou, E. P., and Bushman, F. D. (2012). Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome. Nature reviews Cancer *12*, 51-58.

Sarkany, R. P., and Cox, T. M. (1995). Autosomal recessive erythropoietic protoporphyria: a syndrome of severe photosensitivity and liver failure. QJM : monthly journal of the Association of Physicians *88*, 541-549.

Sarkany, R. P., Ross, G., and Willis, F. (2006). Acquired erythropoietic protoporphyria as a result of myelodysplasia causing loss of chromosome 18. The British journal of dermatology *155*, 464-466.

Sassa, S. (1990). Regulation of the genes for heme pathway enzymes in erythroid and in non-erythroid cells. International journal of cell cloning *8*, 10-26.

Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., and Brivanlou, A. H. (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. Nature medicine *10*, 55-63.

Sauvageau, G., Thorsteinsdottir, U., Eaves, C. J., Lawrence, H. J., Largman, C., Lansdorp, P. M., and Humphries, R. K. (1995). Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. Genes & development *9*, 1753-1765.

Schmitt, C., Ducamp, S., Gouya, L., Deybach, J. C., and Puy, H. (2010). [Inheritance in erythropoietic protoporphyria]. Pathologie-biologie *58*, 372-380.

Schneider-Yin, X., Gouya, L., Dorsey, M., Rufenacht, U., Deybach, J. C., and Ferreira, G. C. (2000). Mutations in the iron-sulfur cluster ligands of the human ferrochelatase lead to erythropoietic protoporphyria. Blood *96*, 1545-1549.

Schoenfeld, N., Mamet, R., Minder, E. I., and Schneider-Yin, X. (2003). A "null allele" mutation is responsible for erythropoietic protoporphyria in an Israeli patient who underwent liver transplantation: relationships among biochemical, clinical, and genetic parameters. Blood cells, molecules & diseases *30*, 298-301.

Schuldiner, M., Eiges, R., Eden, A., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Goldstein, R. S., and Benvenisty, N. (2001). Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells. Brain research *913*, 201-205.

Seiler, K., Soroush Noghabi, M., Karjalainen, K., Hummel, M., Melchers, F., and Tsuneto, M. (2011a). Induced pluripotent stem cells expressing elevated levels of sox-2, oct-4, and klf-4 are severely reduced in their differentiation from mesodermal to hematopoietic progenitor cells. Stem cells and development *20*, 1131-1142.

Seiler, K., Tsuneto, M., and Melchers, F. (2011b). Experimental limitations using reprogrammed cells for hematopoietic differentiation. Journal of biomedicine & biotechnology *2011*, 895086.

Sharma, M., Burre, J., and Sudhof, T. C. (2012). Proteasome inhibition alleviates SNARE-dependent neurodegeneration. Science translational medicine *4*, 147ra113.

Shaw, P. H., Mancini, A. J., McConnell, J. P., Brown, D., and Kletzel, M. (2001). Treatment of congenital erythropoietic porphyria in children by allogeneic stem cell transplantation: a case report and review of the literature. Bone marrow transplantation *27*, 101-105.

Shehee, W. R., Oliver, P., and Smithies, O. (1993). Lethal thalassemia after insertional disruption of the mouse major adult beta-globin gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *90*, 3177-3181.

Si-Tayeb, K., Noto, F. K., Sepac, A., Sedlic, F., Bosnjak, Z. J., Lough, J. W., and Duncan, S. A. (2010). Generation of human induced pluripotent stem cells by simple transient transfection of plasmid DNA encoding reprogramming factors. BMC developmental biology *10*, 81.

Singh, S., Khanna, N., and Kumar, L. (2012). Bone marrow transplantation improves symptoms of congenital erythropoietic porphyria even when done post puberty. Indian journal of dermatology, venereology and leprology *78*, 108-111.

Sitia, R., Neuberger, M., Alberini, C., Bet, P., Fra, A., Valetti, C., Williams, G., and Milstein, C. (1990). Developmental regulation of IgM secretion: the role of the carboxy-terminal cysteine. Cell *60*, 781-790.

Smiers, F. J., Van de Vijver, E., Delsing, B. J., Lankester, A. C., Ball, L. M., Rings, E. H., van Rheenen, P. F., and Bredius, R. G. (2010). Delayed immune recovery following sequential orthotopic liver transplantation and haploidentical stem cell transplantation in erythropoietic protoporphyria. Pediatric transplantation *14*, 471-475.

Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G. W., Cook, E. G., Hargus, G., Blak, A., Cooper, O., Mitalipova, M.*, et al.* (2009). Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. Cell *136*, 964-977.

Solis, C., Aizencang, G. I., Astrin, K. H., Bishop, D. F., and Desnick, R. J. (2001). Uroporphyrinogen III synthase erythroid promoter mutations in adjacent GATA1 and CP2 elements cause congenital erythropoietic porphyria. The Journal of clinical investigation *107*, 753-762.

Somers, A., Jean, J. C., Sommer, C. A., Omari, A., Ford, C. C., Mills, J. A., Ying, L., Sommer, A. G., Jean, J. M., Smith, B. W.*, et al.* (2010). Generation of transgene-free lung disease-specific human induced pluripotent stem cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. Stem cells *28*, 1728-1740.

Sommer, C. A., Stadtfeld, M., Murphy, G. J., Hochedlinger, K., Kotton, D. N., and Mostoslavsky, G. (2009). Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. Stem cells *27*, 543-549.

Sottile, V., Thomson, A., and McWhir, J. (2003). In vitro osteogenic differentiation of human ES cells. Cloning and stem cells *5*, 149-155.

Stadtfeld, M., Brennand, K., and Hochedlinger, K. (2008a). Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. Current biology : CB *18*, 890-894.

Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D. T., and Hochedlinger, K. (2008b). Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. Cell stem cell *2*, 230-240.

Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008c). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. Science *322*, 945-949.

Suh, M. R., Lee, Y., Kim, J. Y., Kim, S. K., Moon, S. H., Lee, J. Y., Cha, K. Y., Chung, H. M., Yoon, H. S., Moon, S. Y., *et al.* (2004). Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. Developmental biology *270*, 488-498.

Sumi, T., Tsuneyoshi, N., Nakatsuji, N., and Suemori, H. (2007). Apoptosis and differentiation of human embryonic stem cells induced by sustained activation of c-Myc. Oncogene *26*, 5564-5576.

Sun, N., Panetta, N. J., Gupta, D. M., Wilson, K. D., Lee, A., Jia, F., Hu, S., Cherry, A. M., Robbins, R. C., Longaker, M. T., and Wu, J. C. (2009). Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 15720-15725.

Szabo, E., Rampalli, S., Risueno, R. M., Schnerch, A., Mitchell, R., Fiebig-Comyn, A., Levadoux-Martin, M., and Bhatia, M. (2010). Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. Nature *468*, 521-526.

Taibjee, S. M., Stevenson, O. E., Abdullah, A., Tan, C. Y., Darbyshire, P., Moss, C., Goodyear, H., Heagerty, A., Whatley, S., and Badminton, M. N. (2007). Allogeneic bone marrow transplantation in a 7-year-old girl with congenital erythropoietic porphyria: a treatment dilemma. The British journal of dermatology *156*, 567-571.

Takahashi-Tezuka, M., Yoshida, Y., Fukada, T., Ohtani, T., Yamanaka, Y., Nishida, K., Nakajima, K., Hibi, M., and Hirano, T. (1998). Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. Molecular and cellular biology *18*, 4109-4117.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell *131*, 861-872.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell *126*, 663-676.

Takenaka, C., Nishishita, N., Takada, N., Jakt, L. M., and Kawamata, S. (2010). Effective generation of iPS cells from CD34+ cord blood cells by inhibition of p53. Experimental hematology *38*, 154-162.

Taketani, S. (2005). Aquisition, mobilization and utilization of cellular iron and heme: endless findings and growing evidence of tight regulation. The Tohoku journal of experimental medicine *205*, 297-318.

Taketani, S., Inazawa, J., Nakahashi, Y., Abe, T., and Tokunaga, R. (1992). Structure of the human ferrochelatase gene. Exon/intron gene organization and location of the gene to chromosome 18. European journal of biochemistry / FEBS *205*, 217-222.

Taketani, S., Yoshinaga, T., Furukawa, T., Kohno, H., Tokunaga, R., Nishimura, K., and Inokuchi, H. (1995). Induction of terminal enzymes for heme biosynthesis during differentiation of mouse erythroleukemia cells. European journal of biochemistry / FEBS *230*, 760-765.

Tanigawa, K., Namba, H., Ohtsuru, A., Shima, M., Nakata, K., Kondo, M., Yamashita, S., and Nagataki, S. (1994). Plasmasorbent therapy with activated charcoal column for congenital erythropoietic porphyria. Dermatology *188*, 329-330.

Tashiro, K., Kawabata, K., Omori, M., Yamaguchi, T., Sakurai, F., Katayama, K., Hayakawa, T., and Mizuguchi, H. (2012). Promotion of hematopoietic differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by transient HoxB4 transduction. Stem cell research *8*, 300-311.

Tezcan, I., Xu, W., Gurgey, A., Tuncer, M., Cetin, M., Oner, C., Yetgin, S., Ersoy, F., Aizencang, G., Astrin, K. H., and Desnick, R. J. (1998). Congenital erythropoietic porphyria successfully treated by allogeneic bone marrow transplantation. Blood *92*, 4053-4058.

Thomas, C., Ged, C., Nordmann, Y., de Verneuil, H., Pellier, I., Fischer, A., and Blanche, S. (1996). Correction of congenital erythropoietic porphyria by bone marrow transplantation. The Journal of pediatrics *129*, 453-456.

Thomas, E. D., Lochte, H. L., Jr., Lu, W. C., and Ferrebee, J. W. (1957). Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. The New England journal of medicine *257*, 491-496.

Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science *282*, 1145-1147.

Thomson, J. A., Kalishman, J., Golos, T. G., Durning, M., Harris, C. P., Becker, R. A., and Hearn, J. P. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *92*, 7844-7848.

Thomson, J. A., Kalishman, J., Golos, T. G., Durning, M., Harris, C. P., and Hearn, J. P. (1996). Pluripotent cell lines derived from common marmoset (Callithrix jacchus) blastocysts. Biology of reproduction *55*, 254-259.

Thorel, F., Nepote, V., Avril, I., Kohno, K., Desgraz, R., Chera, S., and Herrera, P. L. (2010). Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. Nature *464*, 1149-1154.

Thunell, S., Harper, P., and Brun, A. (2000). Porphyrins, porphyrin metabolism and porphyrias. IV. Pathophysiology of erythyropoietic protoporphyria--diagnosis, care and monitoring of the patient. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation *60*, 581-604.

To-Figueras, J., Ducamp, S., Clayton, J., Badenas, C., Delaby, C., Ged, C., Lyoumi, S., Gouya, L., de Verneuil, H., Beaumont, C*., et al.* (2011a). ALAS2 acts as a modifier gene in patients with congenital erythropoietic porphyria. Blood *118*, 1443-1451.

To-Figueras, J., Phillips, J. D., Gonzalez-Lopez, J. M., Badenas, C., Madrigal, I., Gonzalez-Romaris, E. M., Ramos, C., Aguirre, J. M., and Herrero, C. (2011b). Hepatoerythropoietic porphyria due to a novel mutation in the uroporphyrinogen decarboxylase gene. The British journal of dermatology *165*, 499-505.

Todd, D. J. (1994). Erythropoietic protoporphyria. The British journal of dermatology *131*, 751-766.

Tomasi, T. B., Jr. (1977). Structure and function of alpha-fetoprotein. Annual review of medicine *28*, 453-465.

Tomescot, A., Leschik, J., Bellamy, V., Dubois, G., Messas, E., Bruneval, P., Desnos, M., Hagege, A. A., Amit, M., Itskovitz, J*., et al.* (2007). Differentiation in vivo of cardiac committed human embryonic stem cells in postmyocardial infarcted rats. Stem cells *25*, 2200-2205.

Troadec, M. B., Warner, D., Wallace, J., Thomas, K., Spangrude, G. J., Phillips, J., Khalimonchuk, O., Paw, B. H., Ward, D. M., and Kaplan, J. (2011). Targeted deletion of the mouse Mitoferrin1 gene: from anemia to protoporphyria. Blood *117*, 5494-5502.

Tsiftsoglou, A. S., Tsamadou, A. I., and Papadopoulou, L. C. (2006). Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and pharmacological aspects. Pharmacology & therapeutics *111*, 327-345.

Tutois, S., Montagutelli, X., Da Silva, V., Jouault, H., Rouyer-Fessard, P., Leroy-Viard, K., Guenet, J. L., Nordmann, Y., Beuzard, Y., and Deybach, J. C. (1991). Erythropoietic protoporphyria in the house mouse. A recessive inherited ferrochelatase deficiency with anemia, photosensitivity, and liver disease. The Journal of clinical investigation *88*, 1730-1736.

Uchida, N., Sutton, R. E., Friera, A. M., He, D., Reitsma, M. J., Chang, W. C., Veres, G., Scollay, R., and Weissman, I. L. (1998). HIV, but not murine leukemia virus, vectors mediate high efficiency gene transfer into freshly isolated G0/G1 human hematopoietic stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *95*, 11939-11944.

Urnov, F. D., Miller, J. C., Lee, Y. L., Beausejour, C. M., Rock, J. M., Augustus, S., Jamieson, A. C., Porteus, M. H., Gregory, P. D., and Holmes, M. C. (2005). Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. Nature *435*, 646-651.

Urnov, F. D., Rebar, E. J., Holmes, M. C., Zhang, H. S., and Gregory, P. D. (2010). Genome editing with engineered zinc finger nucleases. Nature reviews Genetics *11*, 636-646.

Utikal, J., Maherali, N., Kulalert, W., and Hochedlinger, K. (2009a). Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. Journal of cell science *122*, 3502-3510.

Utikal, J., Polo, J. M., Stadtfeld, M., Maherali, N., Kulalert, W., Walsh, R. M., Khalil, A., Rheinwald, J. G., and Hochedlinger, K. (2009b). Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. Nature *460*, 1145-1148.

Vallier, L., Alexander, M., and Pedersen, R. A. (2005). Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. Journal of cell science *118*, 4495-4509.

Van Goor, F., Hadida, S., Grootenhuis, P. D., Burton, B., Cao, D., Neuberger, T., Turnbull, A., Singh, A., Joubran, J., Hazlewood, A.*, et al.* (2009). Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 18825-18830.

Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z. P., Kokubu, Y., Sudhof, T. C., and Wernig, M. (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. Nature *463*, 1035-1041.

Vierbuchen, T., and Wernig, M. (2011). Direct lineage conversions: unnatural but useful? Nature biotechnology *29*, 892-907.

Wagers, A. J., and Weissman, I. L. (2004). Plasticity of adult stem cells. Cell *116*, 639-648.

Wahlin, S., Aschan, J., Bjornstedt, M., Broome, U., and Harper, P. (2007). Curative bone marrow transplantation in erythropoietic protoporphyria after reversal of severe cholestasis. Journal of hepatology *46*, 174-179.

Wahlin, S., and Harper, P. (2010). The role for BMT in erythropoietic protoporphyria. Bone marrow transplantation *45*, 393-394.

Wang, X., Koulov, A. V., Kellner, W. A., Riordan, J. R., and Balch, W. E. (2008). Chemical and biological folding contribute to temperature-sensitive DeltaF508 CFTR trafficking. Traffic *9*, 1878-1893.

Wang, Y., Langer, N. B., Shaw, G. C., Yang, G., Li, L., Kaplan, J., Paw, B. H., and Bloomer, J. R. (2011). Abnormal mitoferrin-1 expression in patients with erythropoietic protoporphyria. Experimental hematology *39*, 784-794.

Wang, Z., Oron, E., Nelson, B., Razis, S., and Ivanova, N. (2012). Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells. Cell stem cell *10*, 440-454.

Warner, C. A., Yoo, H. W., Roberts, A. G., and Desnick, R. J. (1992). Congenital erythropoietic porphyria: identification and expression of exonic mutations in the uroporphyrinogen III synthase gene. The Journal of clinical investigation *89*, 693-700.

Warren, L., Manos, P. D., Ahfeldt, T., Loh, Y. H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P. K., Smith, Z. D., Meissner, A.*, et al.* (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. Cell stem cell *7*, 618-630.

Warren, L., Ni, Y., Wang, J., and Guo, X. (2012). Feeder-free derivation of human induced pluripotent stem cells with messenger RNA. Scientific reports *2*, 657.

Warren, L. J., and George, S. (1998). Erythropoietic protoporphyria treated with narrow-band (TL-01) UVB phototherapy. The Australasian journal of dermatology *39*, 179-182.

Wells, M. M., Golitz, L. E., and Bender, B. J. (1980). Erythropoietic protoporphyria with hepatic cirrhosis. Archives of dermatology *116*, 429-432.

Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J. P., and Jaenisch, R. (2008). c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. Cell stem cell *2*, 10-12.

Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B. E., and Jaenisch, R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. Nature *448*, 318-324.

Whatley, S. D., Ducamp, S., Gouya, L., Grandchamp, B., Beaumont, C., Badminton, M. N., Elder, G. H., Holme, S. A., Anstey, A. V., Parker, M.*, et al.* (2008). C-terminal deletions in the ALAS2 gene lead to gain of function and cause X-linked dominant protoporphyria without anemia or iron overload. American journal of human genetics *83*, 408-414.

Whitcombe, D. M., Carter, N. P., Albertson, D. G., Smith, S. J., Rhodes, D. A., and Cox, T. M. (1991). Assignment of the human ferrochelatase gene (FECH) and a locus for protoporphyria to chromosome 18q22. Genomics *11*, 1152-1154.

Wiertz, E. J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T. R., Rapoport, T. A., and Ploegh, H. L. (1996). Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. Nature *384*, 432-438.

Wiles, M. V., and Keller, G. (1991). Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. Development *111*, 259-267.

Wobus, A. M., Wallukat, G., and Hescheler, J. (1991). Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca2+ channel blockers. Differentiation; research in biological diversity *48*, 173-182.

Woltjen, K., Michael, I. P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hamalainen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M.*, et al.* (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. Nature *458*, 766-770.

Wood, A. J., Lo, T. W., Zeitler, B., Pickle, C. S., Ralston, E. J., Lee, A. H., Amora, R., Miller, J. C., Leung, E., Meng, X.*, et al.* (2011). Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. Science *333*, 307.

Woods, N. B., Parker, A. S., Moraghebi, R., Lutz, M. K., Firth, A. L., Brennand, K. J., Berggren, W. T., Raya, A., Izpisua Belmonte, J. C., Gage, F. H., and Verma, I. M. (2011).

Brief report: efficient generation of hematopoietic precursors and progenitors from human pluripotent stem cell lines. Stem cells *29*, 1158-1164.

Wu, Z., Chen, J., Ren, J., Bao, L., Liao, J., Cui, C., Rao, L., Li, H., Gu, Y., Dai, H.*, et al.* (2009). Generation of pig induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system. Journal of molecular cell biology *1*, 46-54.

Xu, D., Alipio, Z., Fink, L. M., Adcock, D. M., Yang, J., Ward, D. C., and Ma, Y. (2009). Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 808-813.

Xu, R. H. (2006). In vitro induction of trophoblast from human embryonic stem cells. Methods in molecular medicine *121*, 189-202.

Xu, W., Warner, C. A., and Desnick, R. J. (1995). Congenital erythropoietic porphyria: identification and expression of 10 mutations in the uroporphyrinogen III synthase gene. The Journal of clinical investigation *95*, 905-912.

Yamashita, J., Itoh, H., Hirashima, M., Ogawa, M., Nishikawa, S., Yurugi, T., Naito, M., Nakao, K., and Nishikawa, S. (2000). Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. Nature *408*, 92-96.

Yang, H., Zonder, J. A., and Dou, Q. P. (2009). Clinical development of novel proteasome inhibitors for cancer treatment. Expert opinion on investigational drugs *18*, 957-971.

Ye, L., Chang, J. C., Lin, C., Sun, X., Yu, J., and Kan, Y. W. (2009). Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in prenatal diagnosis in genetic diseases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 9826-9830.

Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I., and Smith, A. (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. Cell *115*, 281-292.

Yoder, M. C. (2001). Introduction: spatial origin of murine hematopoietic stem cells. Blood *98*, 3-5.

Yoder, M. C., Cumming, J. G., Hiatt, K., Mukherjee, P., and Williams, D. A. (1996). A novel method of myeloablation to enhance engraftment of adult bone marrow cells in newborn mice. Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation *2*, 59-67.

Yoshida, K., Chambers, I., Nichols, J., Smith, A., Saito, M., Yasukawa, K., Shoyab, M., Taga, T., and Kishimoto, T. (1994). Maintenance of the pluripotential phenotype of embryonic stem cells through direct activation of gp130 signalling pathways. Mechanisms of development *45*, 163-171.

Yoshida, Y., Takahashi, K., Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2009). Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. Cell stem cell *5*, 237-241.

Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, II, and Thomson, J. A. (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. Science *324*, 797-801.

Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R.*, et al.* (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science *318*, 1917-1920.

Zhang, S. C., Wernig, M., Duncan, I. D., Brustle, O., and Thomson, J. A. (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. Nature biotechnology *19*, 1129-1133.

Zhao, X. Y., Li, W., Lv, Z., Liu, L., Tong, M., Hai, T., Hao, J., Guo, C. L., Ma, Q. W., Wang, L.*, et al.* (2009). iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. Nature *461*, 86-90.

Zhao, Y., Yin, X., Qin, H., Zhu, F., Liu, H., Yang, W., Zhang, Q., Xiang, C., Hou, P., Song, Z.*, et al.* (2008). Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. Cell stem cell *3*, 475-479.

Zheng, Z., and Diamond, M. I. (2012). Huntington disease and the huntingtin protein. Progress in molecular biology and translational science *107*, 189-214.

Zhou, H., Wu, S., Joo, J. Y., Zhu, S., Han, D. W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y.*, et al.* (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. Cell stem cell *4*, 381-384.

Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J., and Melton, D. A. (2008). In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. Nature *455*, 627-632.

Zhou, W., and Freed, C. R. (2009). Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. Stem cells *27*, 2667-2674.

Zix-Kieffer, I., Langer, B., Eyer, D., Acar, G., Racadot, E., Schlaeder, G., Oberlin, F., and Lutz, P. (1996). Successful cord blood stem cell transplantation for congenital erythropoietic porphyria (Gunther's disease). Bone marrow transplantation *18*, 217-220.

Zou, J., Maeder, M. L., Mali, P., Pruett-Miller, S. M., Thibodeau-Beganny, S., Chou, B. K., Chen, G., Ye, Z., Park, I. H., Daley, G. Q.*, et al.* (2009). Gene targeting of a disease-related gene in human induced pluripotent stem and embryonic stem cells. Cell stem cell *5*, 97-110.

Communications scientifiques

Publications Scientifiques

Duchartre, Y., Petit, N., Moya, C., Lalanne, M., Dubus, P., de Verneuil, H., Moreau-Gaudry, F., Richard, E., Neonatal bone marrow transplantation prevents liver disease in a murine model of erythropoietic protoporphyria. Journal of Hepatology (2010).

Bedel, A., Taillepierre, M., Guyonnet-Dupérat,V., Lippert, E., Dubus, P., Dabernat, S., Cardinaud, B., Mautuit, T., Pain, C., Rousseau, B., Lalanne, M., GED, C., **Duchartre, Y**., Richard, E., de Verneuil, H., Moreau-Gaudry, F. Metabolic Correction of Congenital Erythropoietic Porphyria using iPSCs free of Reprogramming Factors. The American Journal of Human Genetics (2012).

Communications Orales

Duchartre, Y., Lalanne, M., Guyonnet-Dupérat ,V., Bibeyran, A., Taillepierre, M., Bedel, A., de Verneuil, H., Moreau-Gaudry, F., Richard, E. Treatment of erythropoietic porphyria mouse models with induced pluripotent stem cells. Journée Jeunes Chercheurs, SFR TransBioMed (22 Juin 2011, Bordeaux, France).

Posters

Duchartre, Y., Lalanne, M., Guyonnet-Dupérat,V., Bibeyran, A., Taillepierre, M., Bedel, A., de Verneuil, H., Moreau-Gaudry, F., Richard, E. Treatment of erythropoietic porphyria mouse models with induced pluripotent stem cells. Journée de l'Ecole Doctorale, des Sciences de le Vie et de la Santé. (Arcachon, Avril 2011).

Duchartre, Y., Lalanne, M., Guyonnet-Dupérat,V., Bibeyran, A., Taillepierre, M., Bedel, A., de Verneuil, H., Moreau-Gaudry, F., Richard, E. Treatment of erythropoietic porphyria mouse models with induced pluripotent stem cells. 10th meeting of French Society of Cell and Gene Therapy (1st prize, 6-8 June 2011, Nantes, France).

Duchartre, Y., Blouin Jean-Marc., Lalanne, M., Guyonnet-Dupérat,V., Bibeyran, A., Taillepierre, M., Bedel, A., de Verneuil, H., Moreau-Gaudry, F., Richard, E. Gene Therapy of Erythropoietic Porphyria Mice with Induced Pluripotent Stem Cells. 15th annual meeting of American Society of Gene and Cell Therapy (16-19 May 20012, Philadelphia, USA).