

**Thèse de doctorat**  
**de l'Université Sorbonne Paris Cité**  
**Préparé à l'université Paris Diderot**  
**Ecole doctorale BioSPC (Bio Sorbonne Paris Cité)**  
**Equipe hème, fer et pathologies inflammatoires**

Titre de la thèse  
**Protoporphyrine Erythropoïétique :**  
**Thérapie génique non intégrative par oligonucléotide antisens**  
**adressé par peptides bifonctionnels RTf1-CPP**

Soutenue Par  
**Arienne MIRMIRAN**

**Thèse de doctorat en génétique**  
**Dirigée par Pr. Laurent GOUYA**  
  
Présentée et soutenue publiquement à  
**La faculté de médecine Xavier Bichat**  
**Le 28 mars 2017**

**Président du jury : Mme Lydie DA COSTA, PU-PH, Université Paris Diderot**

**Rapporteurs : Mr François Maillot, PU-PH, CHU de Tours**

**Rapporteurs : Mr Emmanuel Richard, MCU-PH, Université de Bordeaux**

**Examineur : Mr Dominique Germain, PU-PH, Université UVSQ**

**Directeur de thèse : Mr Laurent Gouya, PU-PH, Université Paris Diderot**

*A Simin*

## SOMMAIRE

Abréviations.....	1
Liste des figures.....	5
Liste des tableaux.....	9
<b>CHAPITRE I / INTRODUCTION.....</b>	<b>10</b>
<b><u>I/Hème.....</u></b>	<b>10</b>
1- Fonctions de l'hème.....	10
2- Structure et des propriétés physico-chimiques des porphyrines et de l'hème.....	11
3- Métabolisme de l'hème.....	12
A-Différentes étapes de biosynthèse de l'hème chez les mammifères.....	12
B-Régulation de biosynthèse de l'hème.....	16
1- <i>Régulation hépatique de la biosynthèse de l'hème.....</i>	<i>16</i>
a-Régulation transcriptionnelle.....	17
b-Régulation post-transcriptionnelle.....	18
c-Régulation post-traductionnelle.....	18
2- <i>Régulation érythroïde de biosynthèse de l'hème.....</i>	<i>18</i>
a-Système IRE/IRP.....	20
b-Hème contrôle la transcription des gènes spécifiquement érythroïdes.....	22
c-Hème régule la synthèse des protéines lors de la différenciation érythroïde.....	23
4- Catabolisme de l'hème.....	25
5- Biosynthèse de l'hème dans des conditions hypoxiques.....	25
6- Trafic de l'hème et ses précurseurs à travers les membranes mitochondriales...	26
a-Export de l'ALA des mitochondries.....	27
b-Import mitochondrial de COPROgèneIII.....	28
c-Export d'hème de la mitochondrie.....	29
7- FECH.....	30
a-Gène <i>FECH</i> .....	30
b-Structure de l'enzyme FECH.....	30
c-Substrats et les inhibiteurs de FECH.....	31
a	
d-Interaction avec d'autres protéines.....	32

8- Complexe Transferrine/ Récepteur de la Transferrine (Tf/RTf).....	35
a-Structure du récepteur de la transferrine1.....	36
b-Mécanisme d'internalisation de transferrine par RTf.....	37
c-Régulation du récepteur de la transferrine1.....	39
<b><u>II/ Porphyries</u></b> .....	<b>41</b>
A-Porphyries hépatiques aiguës.....	42
1-Symptomatologie neurologique des porphyries hépatiques aiguës.....	43
2-Symptomatologie cutanée des porphyries hépatiques aiguës.....	43
3-Diagnostic.....	44
4- Traitement d'une crise aiguë de porphyrie.....	44
5-Prévention des attaques aiguës récurrentes.....	44
B-Porphyrie cutanée tardive (PCT).....	44
C-Porphyrie hépato-érythropoïétique.....	45
D-Porphyries érythropoïétiques.....	45
1-Porphyrie érythropoïétique congénitale (PEC).....	45
2-Protoporphyririe érythropoïétique (PPE).....	45
A- Caractéristiques physiopathologiques et histopathologiques de PPE.....	45
B- Caractéristiques cliniques.....	47
1-Symptômes dermatologiques.....	47
2-Complications hépatiques.....	47
3-Complications hématologiques.....	48
C- Génétique de la PPE.....	48
1-Déficit en FECH.....	48
D- Épidémiologie de la PPE.....	50
E- Diagnostic de la PPE.....	50
F- Traitement de la PPE.....	51
1-Mesures préventives de la photosensibilité.....	51
2-Gestion des complications hépatiques.....	52
3-la porphyrie dominante liée à l'X (PPEDLX).....	53
<b><u>III/Thérapie génique de la maladie PPE</u></b> .....	<b>54</b>
1- Thérapie génique intégrative.....	54

2- Thérapie génique non intégrative.....	56
<b><u>IV/Thérapie génique utilisant des oligonucléotides antisens.....</u></b>	<b>59</b>
1- Oligonucléotides modifiant l'épissage, SSOs.....	60
2- Limitation de l'utilisation des oligonucléotides antisens.....	62
3- Vectorisation d'oligonucléotides antisens.....	62
4- Cell Penetrating Peptides (CPPs).....	65
A-Origin des CPPs.....	65
B-Classification des CPPs.....	66
i- CPPs cationiques.....	66
ii- CPPs amphipathiques.....	68
iii- CPPs hydrophobes.....	68
C-Stratégies de vectorisation des acides nucléiques par les CPPs.....	68
i- Conjugaisons covalentes.....	68
ii- conjugaisons non-covalentes.....	70
D-Mécanisme d'internalisation des nanocomplexes CPP/acide nucléique.....	71
E-Echappement endosomal.....	74
F-Adressage ciblé de nanocomplexes CPP/oligonucléotide.....	76
G-Adressage subcellulaire des acides nucléiques.....	78
H-Poly (oligo-D-arginine) avec le pont disulfure interne .....	79
I-PepFect14.....	80
J-Peptides ciblant RTf1 humain.....	81
<b><u>V/ Objectif du projet.....</u></b>	<b>83</b>
<b>CHAPITRE II/ MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>85</b>
1-Synthèse des peptides et les oligonucléotides antisens.....	85
2-Culture cellulaire.....	86
a- Lignée UT7-Epo.....	86
b- Lignées lymphoblastoïdes (LBCL).....	86
c- Fibroblastes.....	87
d- Cellules primaires de progéniteurs érythroïdes à partir de cellules CD34 <sup>+</sup> périphériques .....	88
3-Expression de RTf1 (CD71) dans différents lignées cellulaires.....	90
4-Etude de transfection <i>in vitro</i> des nanocomplexes ligands RTf1-CPP/ ASO-V1.....	90

a- Formation des nanocomplexes peptides/ASOs.....	90
b- Transfection des cellules par les nanocomplexes Peptide/ oligonucléotides.....	91
c- Transcription reverse.....	91
d- PCR qualitative.....	91
e- PCR quantitative.....	92
5-Etude de transfection <i>ex vivo</i> des nanocomplexes ligands RTf1-CPP/ ASO-V1 dans des progéniteurs érythroïdes à partir des cellules CD34+.....	93
a- Mesure de la PPIX intracellulaire.....	93
b- Etude de marquage phénotypique.....	94
c- Etude de la morphologie des cellules au cours de la différenciation érythroïde.....	94
d- Test de prolifération.....	94
6-Détermination de la taille de nanocomplexe P1-9R / ASO-V1.....	94
7-Mesure de potentiel zêta de nanocomplexe P1-9R/ASO-V1.....	95
8-Etude de la biodisponibilité intracellulaire des peptides et des nanocomplexes par la microscopie confocale.....	96
a- Internalisation des peptides dans des fibroblastes humains.....	96
b- Internalisation de l'ASO-V1 par le peptide dans des fibroblastes humains.....	96
<b>CHAPITRE III/RESULTATS.....</b>	<b>97</b>
1-Expression de CD71 (RTf1) dans différents lignées cellulaires.....	97
2-Recherche du meilleur ratio de charge entre peptides et ASO en utilisant des lignées lymphoblastoïdes de malades PPE.....	98
3-Cinétique de l'effet des complexes RTf1-CPP/ASO dans le temps.....	101
4-Etude de l'impact quantitatif sur l'ARN <i>FECH</i> WT de la transfection de l'ASO-V1 par des nanocomplexes RTf1-CPP dans des lignées lymphoblastoïdes de malades PPE.....	103
5- Etude de l'efficacité de la transfection de l'ASO-V1 par les peptides bi fonctionnels RTf1-CPP dans les progéniteurs érythroïdes d'un sujet porteur de l'allèle hypomorphe c.31548C.....	108
5- Etude de l'efficacité de la transfection de l'ASO-V1 par les peptides bifonctionnels RTf1-CPP précédemment sélectionnés, dans les progéniteurs érythroïdes d'un malade PPE.....	111

i- Patient A.....	112
a-Impact des nanocomplexes Peptide/ASO sur la prolifération et la viabilité des cellules.....	112
b-Redirection de l'épissage exon3-exon4 du site cryptique vers le site physiologique.....	112
c- Quantité d'ARN <i>FECH</i> WT.....	113
d- Mesure de la PPIX.....	114
ii- Patient B.....	115
a-Impact des nanocomplexes Peptide/ASO sur la prolifération et la viabilité des cellules.....	116
b-Redirection de l'épissage exon3-exon4 du site cryptique vers le site physiologique.....	116
c- Quantité d'ARN <i>FECH</i> WT.....	116
d- Mesure de la PPIX.....	117
iii- Patient C.....	118
a-Impact des nanocomplexes Peptide/ASO sur la prolifération et la viabilité des cellules.....	118
b-Redirection de l'épissage exon3-exon4 du site cryptique vers le site physiologique.....	119
c-Quantité d'ARN <i>FECH</i> WT, Peptide B2-9R.....	119
d-Mesure de la PPIX, Peptide B2-9R.....	120
e- Quantité d'ARN <i>FECH</i> WT, Peptide P1-9R.....	121
f- Mesure de la PPIX, Peptide P1-9R.....	122
g-Etude phénotypiques de la différenciation érythroïde, Peptide P1-9R.....	123
h- Morphologies des cellules, P1-9R et B2-9R.....	124
7-Mesure de la taille des nanocomplexes par DLS et de leur potentiel zêta.....	126
8-Etude de la biodisponibilité intracellulaire des peptides et nanocomplexes par la microscopie confocale.....	128
CHAPITRE IV/DISCUSSION.....	132
CHAPITRE V/PERSPECTIVES.....	139
Référence.....	142

## **Abréviations principales**

ABCB10: ATP Binding Cassette Subfamily B Member 10

ACO1 : Aconitase 1

ALA : Acide  $\delta$ -Aminolévulinique

ALA-D : Acide delta aminolévulinique déhydratase

ALAS : Acide  $\delta$ -Aminolévulinique synthase

ALAS1 : Acide  $\delta$ -Aminolévulinique synthase 1

ALAS2 : Acide  $\delta$ -Aminolévulinique synthase 1

AntimiR: anti-miRNA

ASC : Anémie Sidéroblastique Congénitale

ASO: Anti-Sense Oligonucléotide

ATPiF1: ATPase inhibitory Factor 1

CFUs: Colony-Forming Unit

CH: Coproporphyrine Hériditaire

CMF: Cytométrie en flux

COPROgène I : Coproporphyrinogène I

COPROgène III : Coproporphyrinogène III

CPOX : Coproporphyrinogène oxydase

CPP : Cell-Penetrating Peptides

DALAD: Déficit en Acide Delta-Aminolévulinique Déhydratase

DLS : Dynamic Light Scattering

DMD : Dystrophie Musculaire de Duchenne

Egr-1: Early growth response protein 1

EPO: Erythropoïétine

ERC: Endosomal Recycling Compartment

FECH: Ferrochélatase

FLVCR1: Feline leukemia virus subgroup C receptor-related protein 1



FOXO1: Forkhead box protein O1

FSC: Forward Scatter

FXN: Frataxine

GAG: GlycosAminoGlycanes

HDAC3: Histone Deacetylase 3

HIF: Hypoxia Inducible Factors

HJV: Hemojuvelin

HMBS: Hydroxyméthylbilane synthase

HO-1: Heme oxygenase 1

HRE: Heme Responsive Element

HRI: Heme Regulated Inhibitor

HRM: Heme Regulatory Motif

HS: Héparanes Sulfates

KEAP1: Kelch-like ECH-associated protein 1

IRE: Iron Responsive Element

IRP: Iron Regulatory protein

LONP1: Lon peptidase 1

LNA: Locked Nucleic Acid

MARE: Maf Recognition Element

MFRN1: Mitoferrin-1

MFS: Major Facilitator Superfamily

MGG: May-Grünwald-Giemsa

miRNA: microRNAs

MOE: Methoxy-ethyl

MSH: Melanocyte Stimulating Hormone

NCoR : Nuclear receptor CoRepressors

NrF2: Nuclear factor erythroid 2-related Factor-2

ON: oligonucléotide

PAI: Porphyrie Aiguë Intermittente

PBG : Porphobilinogène

PBGS: Porphobilinogène synthase

PBGD : Porphobilinogène désaminase

PC: Porphyrie Cutanée

PEC: Porphyrie Erythropoïétique Congénitale

PGC-1 $\alpha$ : Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1-alpha

PGRMC1: Progesterone Receptor Membrane Component 1

PHA : porphyries hépatiques aiguës

PHE: Porphyrie Hépto-Erythropoïétique

PLP: Pyridoxal 5' Phosphate

PMO: Phosporodiamidate Morpholino

PNA: Peptide Nucleic Acid

PPE: Protoporphyrine Erythropoïétique

PPEDLX: Protoporphyrine Erythropoïétique Dominante Liée à l'X

PPIX : Protoporphyrinogène IX

PPOX : Protoporphyrinogène oxydase

PROTOgène IX : Protoporphyrinogène IX

PTD:Protein Transduction Domain

PV: Porphyrie Variegata

Re $\alpha$ : orphan nuclear receptor Rev-erb $\alpha$

RTf : Récepteur de la transferrine

RVG : Rabies Virus Glycoprotein

SCARA: Scavenger Receptor Class A

siRNA: Small Interfering RNAs

SSC: Side Scatter

SSO: Splice Switching Oligonucleotide

STAT5: Signal Transducer and Activator of Transcription 5

SUCLA2: Succinyl-CoA synthetase

URO-D : Uroporphyrinogène décarboxylase

UROgène I : Uroporphyrinogène I

UROgène III : Uroporphyrinogène III

UROS : Uroporphyrinogène synthase III

VHL: Von Hippel Lindau

## Liste des figures

Figure 1) Structure des porphyrines et l'hème.....	11
Figure 2) La première étape de la voie de biosynthèse de l'hème.....	13
Figure 3) Les différentes étapes enzymatiques de la voie de biosynthèse de l'hème.....	15
Figure 4) Régulation hépatique de biosynthèse de l'hème.....	16
Figure 5) Mécanismes de régulation transcriptionnelle d'ALAS1 par l'hème.....	17
Figure 6) Régulation érythroïde de biosynthèse de l'hème.....	20
Figure 7) Modulation post-transcriptionnelle par le fer via le système IRE/IRP.....	21
Figure 8) Modulation post-transcriptionnelle par l'hème via le système IRE/IRP.....	22
Figure 9) L'implication de BACH-1 dans la régulation de la transcription des gènes tels que l'hème oxygénase et les globines.....	23
Figure 10) L'hème contrôle la traduction des ARNm HBA et HBB dans les progéniteurs érythroïdes en différenciation.....	24
Figure 11) La stabilité des protéines HIF est dépendante de la biodisponibilité du fer et l'oxygène.....	26
Figure 12) Le trafic de l'hème et ses précurseurs à travers les membranes mitochondriales.....	28
Figure 13) Structure de la FECH.....	31
Figure 14) La ferrochélatase, localisation et partenaires.....	33
Figure 15) Modèle proposé du complexe mitochondriale de protéines impliquées dans le métabolisme de l'hème.....	34
Figure 16) Structure du récepteur de la transferrine.....	37
Figure 17) Endocytose médié par le récepteur de la transferrine.....	38
Figure 18) Biosynthèse de l'hème : enzymes, métabolites et porphyrines.....	41
Figure 19) Caractéristiques cliniques des porphyrries.....	42
Figure 20) Aperçu de la physiopathologie de la PPE.....	46
Figure 21) Les lésions chroniques, les rainurages autour des lèvres.....	47
Figure 22) Co-transmission d'une mutation FECH délétère en trans d'allèle hypomorphe c.315-48C.....	49
Figure 23) Représentation schématique de l'épissage dans l'exon 3-exon4 du gène FECH.....	50
Figure 24) Flux de la biosynthèse de l'hème dans les deux formes de PPE.....	53

Figure 25) Le niveau normal de ferrochélatase exprimé dans la peau protégerait la souris contre la photosensibilité.....	56
Figure 26) Emplacement de l'oligonucléotide antisens corrigeant l'anomalie d'épissage du gène <i>FECH</i> .....	57
Figure 27) Effet d'ASO-V1 transfecté par le lipofectamine 2000 dans des lignées lymphoblastoïdes issues de patients PPE.....	57
Figure 28) Preuve de concept dans des progéniteurs érythroïdes de patients PPE.....	58
Figure 29) Mécanismes antisens.....	59
Figure 30) Mécanismes de modulation de l'expression génique induite par l'oligonucléotide.....	61
Figure 31) Les barrières membranaires limitant la distribution des acides nucléiques aux compartiments subcellulaires.....	63
Figure 32) Différents systèmes pour le transfert de gènes.....	65
Figure 33) Exemple d'une conjugaison covalente de type thiol-maléimide entre le vecteur peptidique et l'oligonucléotide.....	69
Figure 34) La formation du nanocomplexe entre les peptides et l'oligonucléotide par le biais des interactions électrostatiques, ou hydrophobes et/ou de l'hydrogène.....	70
Figure 35) Mécanismes d'entrée de CPPs dans les cellules cibles.....	72
Figure 36) La route de l'endocytose médiée par un récepteur.....	74
Figure 37) Favorisation d'effet d'éponge à proton par les polymères protonnables.....	75
Figure 38) La stratégie d'adressage d'ASO-V1 aux progéniteurs érythroïdes.....	84
Figure 39) Pédigrée de la famille PPE.....	87
Figure 40) Le potentiel zêta représente la charge de surface d'une nanoparticule.....	95
Figure 41) Mesure de l'expression de CD71 par cymomètre en flux.....	97
Figure 42) Exemple de la mesure qualitative de l'effet d'une gamme de ratio sur l'épissage exon3-exon4 du gène <i>FECH</i> par des ligands RTf1 conjugués au CPP 9R.....	99
Figure 43) Exemple de la mesure qualitative de l'effet d'une gamme de ratio sur l'épissage exon3-exon4 du gène <i>FECH</i> par des ligands RTf1 conjugués au PepFect14.....	100
Figure 44) Cinétique de l'effet sur l'épissage en lignées lymphoblastoïdes PPE.....	102
Figure 45) Cinétique de l'effet sur l'épissage en lignée UT7-EPO.....	102
Figure 46) Quantification de l'ARN <i>FECH</i> WT après transfection de nanocomplexes P2-9R/ASO.....	104

Figure 47) Quantification de l'ARN <i>FECH</i> WT après transfection de nanocomplexes P1-9R/ASO.....	105
Figure 48) Quantification de l'ARN <i>FECH</i> WT après transfection de nanocomplexes B2-9R/ASO.....	106
Figure 49) Quantification de l'ARN <i>FECH</i> WT après transfection de nanocomplexes B18-PepFect14/ASO.....	107
Figure 50) Redirection de l'épissage du site cryptique vers le site physiologique exon3-exon4 par les nanocomplexes RTf1-CPP/ASO-V1 en culture de progéniteurs érythroïdes d'un sujet porteur de l'allèle hypomorphe.....	110
Figure 51) Impact des nanocomplexes Peptide/ASO sur la prolifération des cellules après la transfection de progéniteurs érythroïdes d'une malade PPE (Sujet A).....	112
Figure 52) Redirection de l'épissage exon3-exon4 du site cryptique vers le site physiologique après transfection de progéniteur érythroïdes d'un patient PPE (Sujet A).....	112
Figure 53) Augmentation de la quantité d'ARN <i>FECH</i> WT après la redirection de l'épissage exon3-exon4 du site cryptique vers le site physiologique dans des progéniteurs érythroïdes d'un malade PPE (Sujet A).....	113
Figure 54) Mesure de la production de la PPIX après une redirection de l'épissage exon3-exon4 du site cryptique vers le site physiologique dans des progéniteurs érythroïdes d'un malade PPE (Sujet A).....	114
Figure 55) Impact des nanocomplexes Peptide/ASO sur la prolifération des cellules après la transfection de progéniteurs érythroïdes d'une malade PPE (Sujet B).....	115
Figure 56) Redirection de l'épissage exon3-exon4 du site cryptique vers le site physiologique après transfection de progéniteurs érythroïdes d'un patient PPE (Sujet B).....	116
Figure 57) Augmentation de la quantité d'ARN <i>FECH</i> WT après la redirection de l'épissage exon3-exon4 du site cryptique vers le site physiologique dans des progéniteurs érythroïdes d'un malade PPE (Sujet B).....	116
Figure 58) Mesure de la PPIX après une redirection de l'épissage exon3-exon4 du site cryptique vers le site physiologique dans des progéniteurs érythroïdes d'un malade PPE (Sujet B).....	117
Figure 59) Impact des nanocomplexes Peptide/ASO sur la prolifération des cellules après la transfection de progéniteurs érythroïdes d'un malade PPE (Sujet C).....	118
Figure 60) Redirection de l'épissage exon3-exon4 du site cryptique vers le site physiologique après transfection de progéniteurs érythroïdes d'un patient PPE (Sujet C).....	119

Figure 61) Augmentation de la quantité d'ARN <i>FECH</i> WT après la redirection de l'épissage exon3-exon4 du site cryptique vers le site physiologique dans des progéniteurs érythroïdes d'un malade PPE (Sujet C).....	119
Figure 62) Mesure de la production de PPIX après une redirection de l'épissage exon3-exon4 du site cryptique vers le site physiologique dans des progéniteurs érythroïdes d'un malade PPE (Sujet C).....	120
Figure 63) La quantité d'ARN <i>FECH</i> WT après la redirection de l'épissage exon3-exon4 du site cryptique vers le site physiologique dans des progéniteurs érythroïdes d'un malade PPE (Sujet C).....	121
Figure 64) Mesure de la production de PPIX après une redirection de l'épissage exon3-exon4 du site cryptique vers le site physiologique dans des progéniteurs érythroïdes d'un malade PPE (Sujet C).....	122
Figure 65) Effet des nanocomplexes P1-9R/ASOs sur la différenciation érythroïde dans des progéniteurs érythroïdes d'un malade PPE(C).....	123
Figure 66) Effet des nanocomplexes peptide/ASOs sur la différenciation érythroïde dans des progéniteurs érythroïdes d'un malade PPE(C).....	124
Figure 67) Mesure du potentiel Zêta dans de l'eau.....	127
Figure 68) Mesure du potentiel Zêta dans du PBS.....	128
Figure 69) Co-localisation entre les peptides et la Tf.....	129
Figure 70) Co-localisation entre Tf <small>Alexa 647</small> et ASO-V1 <small>Alexa 594</small> .....	130
Figure 71) Distribution nucléaire de l'ASO-V1 dans des fibroblastes.....	131

## Liste des tableaux

Tableau 1) Principales hémoprotéines humaines et leurs fonctions.....	10
Tableau 2) Exemple des peptides cationiques.....	66
Tableau 3) Exemple des peptides amphipathiques.....	68
Tableau 4) Exemple des peptides hydrophobes.....	68
Tableau 5) Exemples de CPPs conjugués directement aux oligonucléotides et leurs applications.....	69
Tableau 6) Exemples de nanocomplexes CPP/oligonucléotide et leurs applications.....	71
Tableau 7) Exemples des modifications favorisant l'échappement endosomal des CPPs et d'ONs.....	76
Tableau 8) Peptides ciblant le RTf1 humain.....	82
Tableau 9) Liste des peptides ligands RTf1 +/- CPP.....	86
Tableau 10) Caractéristique clinique et biologique des patients PPE et du sujet contrôl porteur de l'allèle hypomorphe.....	88
Tableau 11) Protocole de préparation du milieu de culture des CD34+ en fonction des jours de culture.....	89
Tableau 12) Analyse DLS.....	127



## I/ Hème

### **1-Fonctions de l'hème**

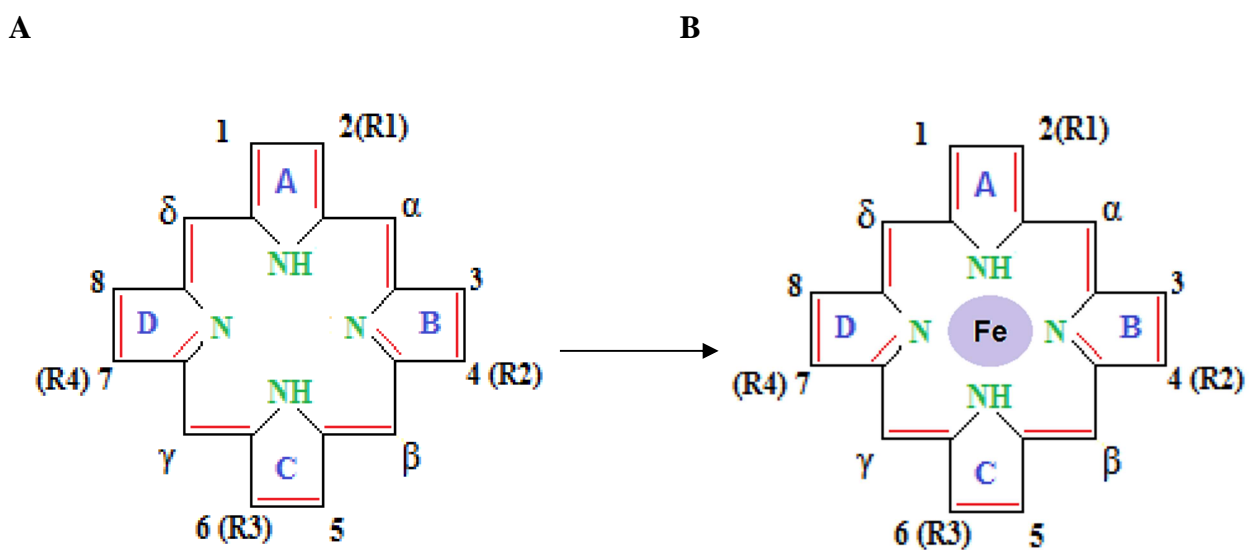
L'hème est le groupement prosthétique d'un ensemble de protéines appelées hémoprotéines. Elles sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que le transfert d'électrons, le transport et le stockage musculaire de l'oxygène, la détoxification cellulaire et l'apoptose (Tab.1)<sup>1</sup>. De plus, l'hème exerce un rôle régulateur essentiel. Des études récentes révèlent le rôle de l'hème dans la maturation des microARN et le contrôle du cycle circadien<sup>2,3</sup>. L'hème inhibe les canaux dépendants du calcium (par exemple les canaux BK SLO-1)<sup>4</sup> et exerce tout un ensemble de régulation par sa capacité à se fixer sur des protéines ayant des motifs HRM (Heme Regulatory Motif). Ces régulations concernent aussi bien la régulation de la transcription (par exemple : les gènes *CYC1*, *CYC2*, *CTT1*) que la régulation de la traduction par HRI (Heme-Regulated Inhibitor) et des régulations post-traductionnelles (ALAS1, IRP1, BACH1). Cette molécule est également un effecteur dans plusieurs voies cellulaires telles que la différenciation des tissus neuronaux, adipeux et érythroïde. Bien que l'hème soit synthétisé dans chaque cellule humaine pour les respirations cellulaires et des réactions d'oxydoréduction, il est très majoritairement produit dans les cellules érythropoïétiques pour la synthèse de l'hémoglobine et dans les cellules parenchymateuses hépatiques pour la synthèse des cytochromes P450. L'ensemble de ces fonctions rend la molécule d'hème indispensable à la vie. Le contrôle de la production de l'hème diffère entre ces deux tissus, principalement en raison de la différence dans les taux de synthèse de l'acide 5-aminolévulinique. Les macrophages de la rate et du foie dégradent l'hème et recyclent le fer après l'erythrophagocytose de l'hème par l'hème oxygénase-1<sup>5</sup>.

<b>Hémoprotéines</b>	<b>Rôle principal</b>
Hémoglobine	Transport O <sub>2</sub>
Myoglobine	Stockage O <sub>2</sub>
HRI (Heme Regulator Inhibitor)	Régulation traductionnelle
Cytochromes mitochondriaux	Transfert d'électrons
Péroxydase	Oxydation
Catalase	Dismutation H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Tryptophane dioxygénase	Dégradation du tryptophane
Cytochromes	Transfert d'électrons, oxydation
Cyclooxygénase	Synthèse de prostaglandines
Guanylate synthase	Transport du NO
Oxyde nitrique synthase	Synthèse du NO

**Tableau 1) Principales hémoprotéines humaines et leurs fonctions.**

## 2-Structure et des propriétés physico-chimiques des porphyrines et de l'hème

Les porphyrines, molécules précurseurs de l'hème, sont des pigments rouges, fluorescents, de structure cyclique, aromatique et tétrapyrrolique. Les noyaux pyrroles A, B, C, D sont liés entre eux par des ponts méthènes (-CH=) entre deux carbones  $\alpha$  (Fig.1). Le suffixe «inogène» indique un état réduit des ponts méthènes tandis que le suffixe «ine» représente l'état oxydé. Seuls les dérivés oxydés sont colorés et fluorescents. La détection et la quantification des porphyrines par spectrofluorométrie dans les milieux biologiques est possible car les porphyrines libres ou complexées à certains métaux (ex : Zinc) émettent une fluorescence rouge intense quand elles sont exposées à la lumière violette (longueur d'onde d'excitation : 405nm, dite bande de Soret).



**Figure 1) Structure des porphyrines et l'hème.** A) Les porphyrines sont des pigments aromatiques (Rouge) et tétrapyrroliques (Bleu). Les noyaux pyrroles A, B, C, D sont liés entre eux par des ponts méthènes (-CH=) entre deux carbones  $\alpha$ . B) L'atome de fer (Violet) se fixe au centre de la porohyrine par les atomes d'azote (Vert) pour former l'hème.

Les complexes métalliques de porphyrine jouent un rôle important dans les activités biologiques comme par exemple des complexes de fer dans les hémoprotéines, les complexes de magnésium dans les chlorophylles, et un complexe de cobalt dans la vitamine B12. L'hème est un cofacteur constitué d'un anneau organique hétérocyclique de porphyrine, qui contient un ion central de fer à l'état ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ).

### 3-Métabolisme de l'hème

La biosynthèse de l'hème est un processus complexe qui se produit dans toutes les cellules grâce à huit réactions enzymatiques réparties entre les mitochondries et le cytosol. La première ainsi que les trois dernières prennent place dans la mitochondrie tandis que les étapes intermédiaires sont cytoplasmiques (Fig.3).

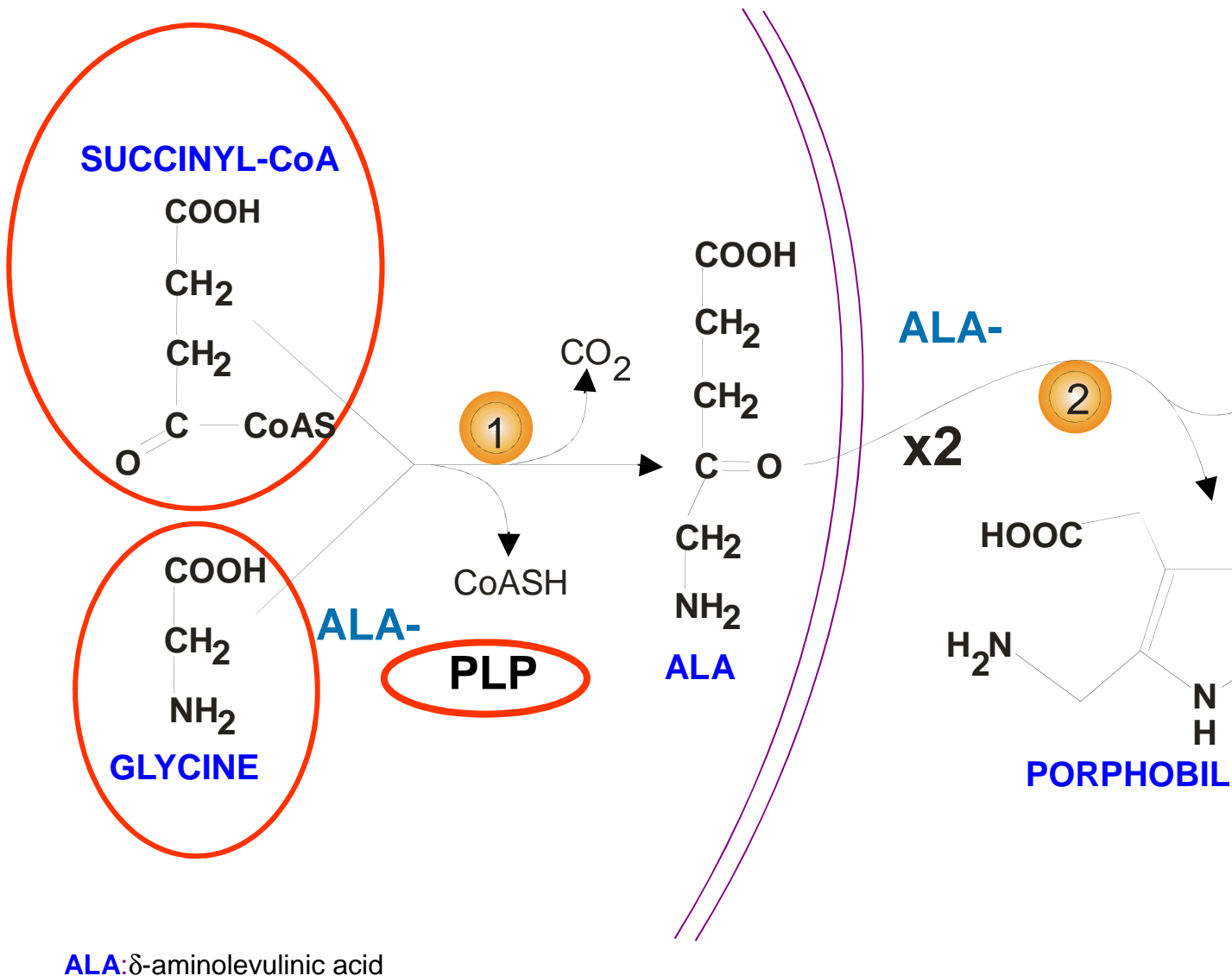
#### A-Différentes étapes de biosynthèse de l'hème chez les mammifères

- **Etape I**

La première étape de la voie de biosynthèse de l'hème est la condensation du succinyl-CoA et de la glycine pour former l'acide  $\delta$ -aminolévulinique (ALA) dans la matrice mitochondriale (Fig.2). Cette réaction est catalysée par l'enzyme ALA synthase (ALAS; EC 2.3.1.37). L'ALA est le précurseur général pour tous les tétrapyrroles naturels et représente la seule source de carbone et les atomes d'azote nécessaires pour la formation de l'hème. Le premier rapport sur l'incorporation des atomes d'azote provenant de la glycine en hème a été publié en 1945, par Shemin et Rittenberg <sup>6</sup>. Après l'identification de l'ALA comme un précurseur potentiel de la biosynthèse de l'hème, l'activité de l'ALA synthase a été simultanément décrite en 1958 par les groupes de Shemin et Neuberger <sup>7</sup> et Laver WG et Neuberger A <sup>8</sup>. Il existe deux isoformes d'ALAS : ALAS1 et ALAS2, codées par deux gènes. Leur homologie de séquence est de 75 % au niveau du domaine catalytique. Les isoformes d'ALAS sont les seuls dans cette voie qui sont codées par deux gènes différents. Le gène *ALAS1* est situé sur le chromosome 3 et est exprimé de façon ubiquitaire. Ce gène contient 12 exons et code pour une protéine fonctionnelle de 640 acides aminés. Le gène *ALAS2* est situé sur le chromosome X et contient 11 exons. Ce gène code pour une protéine fonctionnelle de 587 acides aminés et est exprimé uniquement dans les cellules érythroïdes <sup>9</sup>.

## Mitochondria

## Cytosol



**Figure 2) La première étape de la voie de biosynthèse de l'hème.** La première étape de la voie de biosynthèse de l'hème se déroule dans la matrice mitochondriale. Elle consiste à la condensation du succinyl-CoA et de la glycine pour former l'acide  $\delta$ -aminolévulinique (ALA). Cette réaction requiert le PLP (Pyridoxal 5'-Phosphate) qui est une coenzyme dérivée d'une vitamine, la Pyridoxine.

### • Etape II

La deuxième étape de la biosynthèse de l'hème se déroule dans le cytosol. Elle consiste en la condensation de deux molécules d'ALA par l'acide delta aminolévulinique déhydratase (ALA-D, E.C.4.3.1.8) pour former la molécule monopyrrolique de porphobilinogène (PBG). La protéine delta aminolévulinate déhydratase nommée aussi sous le nom de porphobilinogène synthase

(PBGS) est composée de 8 sous unités identiques et présente 4 sites catalytiques. Le gène *ALA-D* est localisé sur le chromosome 9 et contient 2 exons alternatifs non codants, 1A et 1B, et 11 exons codant, 2 à 12. Les exons 1A et 1B sont épissés à l'exon 2 de façon alternative. Les exons ont 2 promoteurs distincts qui sont activés suivant les tissus: ubiquitaire pour 1A et érythroïde pour 1B<sup>10</sup>. L'activité de l'ALA-D est activée par des groupements thiols et du zinc. L'intoxication par le plomb entraîne une inhibition de l'ALA-D en raison du remplacement des ions de zinc par un autre cation divalent le Pb<sup>2+</sup><sup>11</sup>.

- **Etape III**

Dans la troisième étape de cette voie, l'hydroxyméthylbilane est généré par des liaisons «tête à queue» de quatre molécules PBG par l'hydroxyméthylbilane synthase (HMBS) ou la porphobilinogène désaminase (PBGD, E.C.4.3.1)<sup>12</sup>. Le gène *PBGD*, situé dans le chromosome 11, est composé de 15 exons qui génèrent deux ARNm épissés de façon alternative codant pour deux isoformes de l'enzyme<sup>13</sup>. La forme érythroïde de PBGD possède un promoteur spécifiquement érythroïde situé dans l'intron 1, qui aboutit après transcription à un enchaînement exon2-exon3 alors que dans la forme ubiquitaire, la maturation de l'ARN pré-messager aboutit à un enchaînement exon1-exon3. Le site d'initiation de la traduction spécifiquement érythroïde est situé dans l'exon 3<sup>14</sup>. La protéine fonctionnelle de PBGD possède 361 acides aminés.

- **Etape IV**

La conversion d'hydroxyméthylbilane en uroporphyrinogène III (UROgène III) nécessite l'action de l'enzyme uroporphyrinogène synthase III (UROS, E.C.4.2.1.75). Cette réaction, catalysée sans cofacteur, est une inversion du noyau pyrrole D d'hydroxyméthylbilane, suivi d'une cyclisation pour donner UROgène III. Le gène uroporphyrinogène synthase III est situé sur le chromosome 10 et est composé de 16 exons codant pour une protéine de 265 acides aminés. En absence de l'enzyme HMBS, l'hydroxyméthylbilane se cyclise spontanément en uroporphyrinogène I (UROgène I) qui se transforme en coproporphyrinogène I (COPROgène I) par une décarboxylation. Le COPROgène I est une impasse métabolique de la synthèse de l'hème du fait de son incapacité à être transporté.

- **Etape V**

Dans le cytosol, les chaînes latérales du macrocycle UROgène III sont décarboxylées séquentiellement par l'uroporphyrinogène décarboxylase (URO-D, E.C.4.1.1.37) pour former le coproporphyrinogène III (COPROgène III). Le gène *UROD* est situé sur le chromosome 1 et contient 10 exons qui génèrent deux ARNm épissés de façon alternative. Un seul ARNm code pour l'enzyme fonctionnelle de 367 acides aminés.

- **Etape VI**

Toutes les étapes restantes de la biosynthèse de l'hème prennent place à l'intérieur des mitochondries. Le COPROgène III est importée dans l'espace inter-membranaire mitochondrial, où il est transformé en protoporphyrinogène IX (PROTOgène IX) par la coproporphyrinogène oxydase (CPOX, E.C.1.3.3.3). Le gène *CPOX* est localisé sur le chromosome 3 et est constitué de 8 exons codant pour une protéine de 454 acides aminés. Ce gène possède un promoteur unique qui est régulé différemment dans les tissus érythroïdes et non érythroïdes. Il exprime deux ARNm distincts grâce à l'utilisation de deux signaux de polyadénylation alternatifs.

- **Etape VII**

L'avant dernière étape de la biosynthèse de l'hème est l'oxydation du PROTOgène IX en protoporphyrine IX (PPIX) par la protoporphyrinogène oxydase (PPOX E.C.1.3.3.4). Cette réaction nécessite trois molécules d'oxygène et entraîne la perte de six protons et six électrons, ce qui génère trois molécules de peroxyde d'hydrogène. La PPOX est une flavoprotéine synthétisée dans le cytoplasme et est transloquée vers la mitochondrie où sa localisation exacte reste soumise à débat. Le gène *PPOX* est situé sur le chromosome 1, et est composé de 14 exons codant pour une protéine de 477 acides aminés.

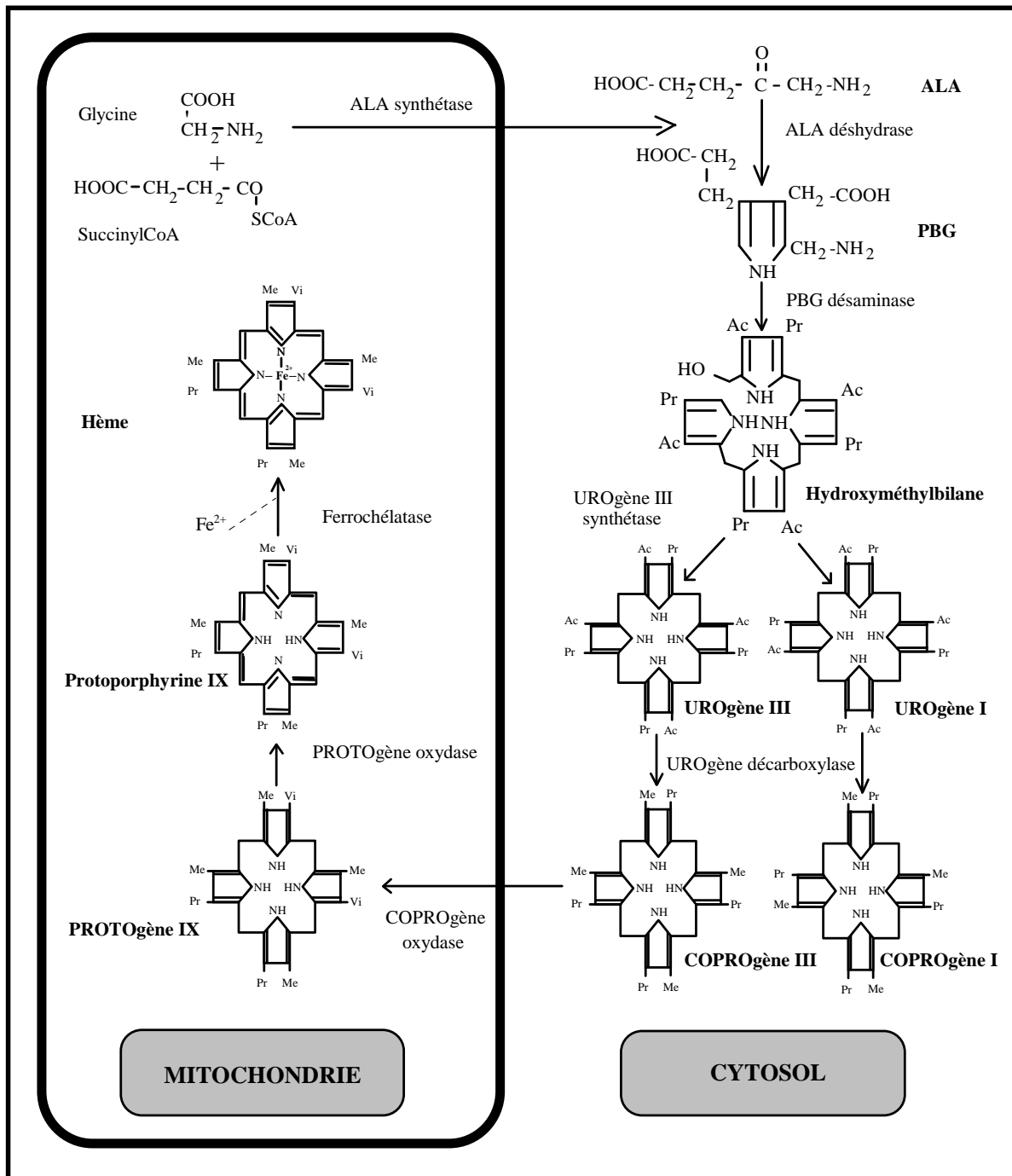


Figure 3) Les différentes étapes enzymatiques de la voie de biosynthèse de l'hème.

### • Etape VIII

Enfin, le fer ferreux est incorporé dans la PPIX par la dernière enzyme de la voie de biosynthèse de l'hème, la ferrochélatase (FECH), pour former l'hème dans la matrice mitochondriale. Le premier rapport décrivant l'activité de ferrochélatase dans les érythrocytes aviaires a été publiée en 1956 par Ashenbrucker et al <sup>15</sup>. Cependant, il a fallu attendre 25 ans de plus jusqu'à la première purification de la ferrochélatase à partir de mitochondries de foie de rat pour caractériser

l'activité FECH. Au début des années 1990, les gènes codant pour la ferrochélatase venant de plusieurs organismes eucaryotes ont été clonés et séquencés. De nos jours, la ferrochélatase est l'une des enzymes de la voie de biosynthèse de l'hème la mieux caractérisée (voir à la fin du chapitre 1).

## **B) Régulation de biosynthèse de l'hème**

### **1-La régulation hépatique de la biosynthèse de l'hème**

La première étape de la biosynthèse de l'hème catalysée par ALAS est l'étape régulée. Dans les cellules non-érythrocytaires, en particulier dans les hépatocytes, l'hème ou son produit oxydé, l'hémine, contrôlent l'activité enzymatique d'ALAS1 par un rétrocontrôle négatif à de multiples niveaux : transcriptionnel, post-transcriptionnel, post-traductionnel en régulant la translocation de l'ALA synthase du cytosol vers la mitochondrie et finalement par une inhibition protéolytique de l'enzyme (Fig.4).



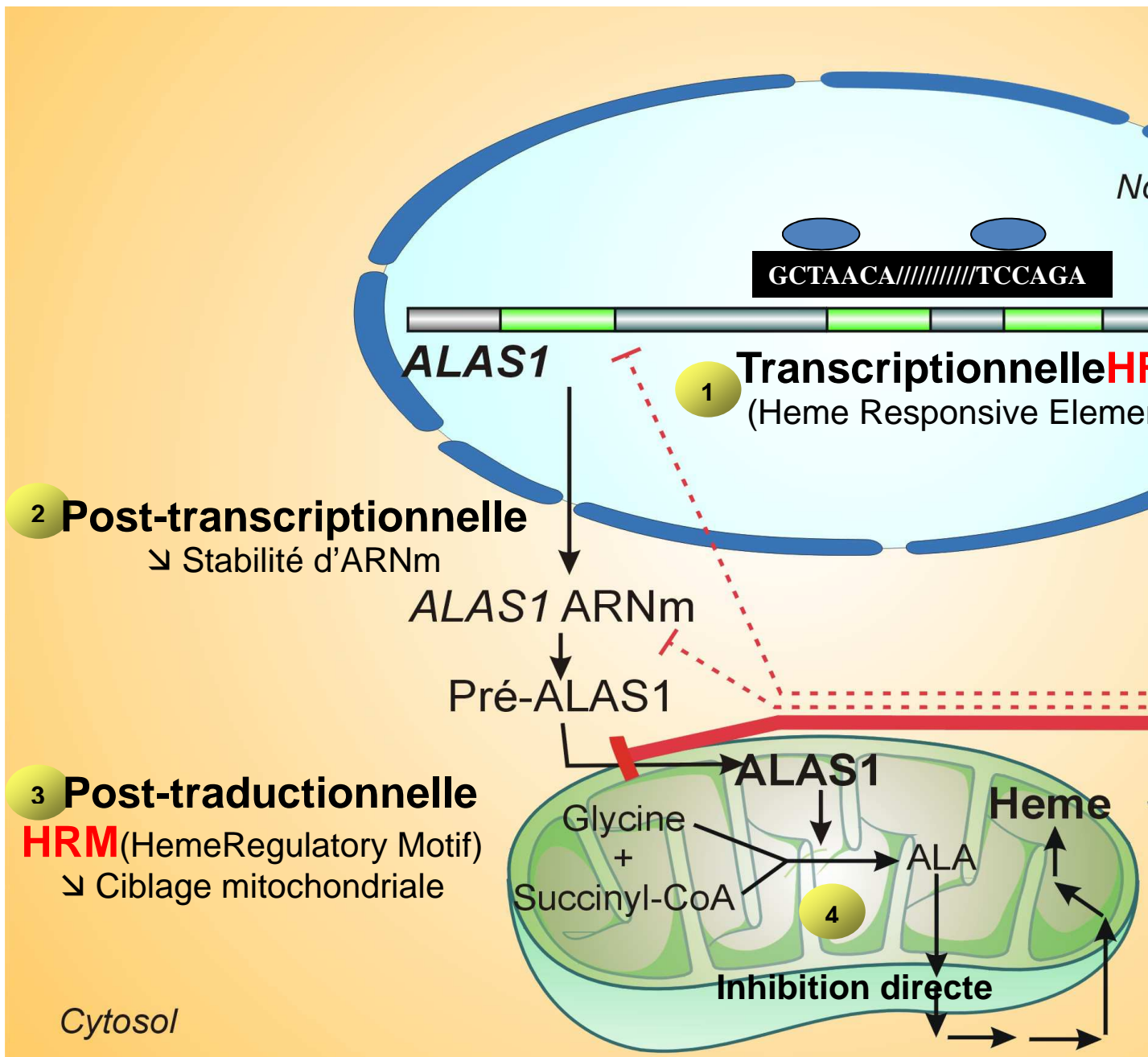


Figure 4) Régulation hépatique de biosynthèse de l'hème.

#### a- Régulation transcriptionnelle

Le premier mécanisme implique PGC-1 $\alpha$  (Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1-alpha) qui est un coactivateur transcriptionnel du gène *ALAS1*<sup>16</sup>. PGC-1 $\alpha$  est régulé soit par le statut nutritionnel via la voie AKT (phosphorylation de FOX-1) et la voie cAMP (phosphorylation de CREB), et par la quantité d'hème libre. Il a été montré que Rea (orphan nuclear receptor Rev-erb $\alpha$ ) agit comme un senseur de l'hème dans l'organisme<sup>17</sup>. La fixation de

l'hème sur Reα entraîne le recrutement du complexe corépresseur HDAC3 (NCoR/histone deacetylase 3), ce qui réprime la transcription de PGC-1α<sup>18</sup> et par conséquent la transcription du gène *ALAS1*<sup>19</sup>. Le deuxième mécanisme alternatif de régulation transcriptionnel d'ALAS1 médié par l'hème est basé sur l'identification d'un HRE (Heme Responsive Element) dans la région proximale du promoteur d'ALAS1 chez la souris, ainsi que sur la liaison combinatoire d'Egr-1 (Early growth response protein 1) et ses corépresseurs NBA1 et NBA 2 à HRE<sup>20</sup>. L'interaction entre Egr-1 et le corépresseur est renforcée par l'augmentation de la concentration de l'hème intracellulaire, ce qui conduit à la répression de la transcription d'*ALAS1*. Ces deux mécanismes peuvent réguler de manière synergique la transcription du gène *ALAS1*, médié par l'hème.

**Figure 5) Mécanismes de régulation transcriptionnelle d'ALAS1 par l'hème, modifié d'après Gloria C Ferreira, 2013<sup>21</sup>.** L'hème libre se lie à Reα et entraîne le recrutement du complexe corépresseur NCoR/HDAC3 sur la région «enhancer» du gène PGC-1α. L'hème libre se lie également à Egr-1 et provoque l'interaction entre Egr-1 et ses corépresseurs NBA1 et NBA2 sur l'HRE dans la région proximale du gène *ALAS1*. La cascade de signalisation de l'insuline diminue la transcription d'ALAS1 par l'inactivation de FOXO1 et CREB, qui sont des régulateurs positifs de la transcription d'ALAS1.

#### **b- Régulation post-transcriptionnelle**

Chez l'homme, l'épissage alternatif de l'ARN, dans les cellules hépatiques, génère deux transcrits ALAS1 avec des régions non traduites distinctes à l'extrémité 5' (5'-UTR). Dans la forme majeure d'ARNm *ALAS1*, l'exon 1B est manquant alors que cet exon est conservé dans la forme mineure d'ARNm *ALAS1*. L'Hème diminue la stabilité de la forme majeure au niveau post-

transcriptionnel par l'augmentation de la dégradation de transcrit, alors que la forme mineure est résistant au dommage médié par l'hème <sup>22</sup>.

### **c- Régulation post-traductionnelle**

L'hème peut également affecter l'ALAS1 au niveau post-traductionnel. Il existe trois motifs de liaison à l'hème (HRM) du côté N-terminal de la séquence de ciblage mitochondrial de protéine pre-ALAS1. La liaison de l'hème à ce motif entraîne une diminution de transport de pré-ALAS1 vers les mitochondries, où la forme mature de protéine est produite après le clivage du signal de translocation <sup>23</sup>.

Il a été récemment démontré que l'hème augmente également la dégradation de la forme mature mitochondriale d'ALAS1 via la protéolyse médiée par LONP1, une protéase dépendant de l'ATP qui contrôle le renouvellement sélectif des protéines de la matrice mitochondriale <sup>24</sup>. L'autre protéase mitochondriale dépendante de l'ATP qui dégrade l'ALAS1 au niveau post-traductionnel est ClpXP. Ce dernier est un hétéro-multimères de CLPX et CLPP. Il est encore difficile de savoir si ClpXP dégrade directement l'ALAS1, mais il a été suggéré que CLPX reconnaît et déplie d'abord les structures tertiaires des protéines cibles, et CLPP dégrade ensuite la cible dépliée <sup>25</sup>. L'ALAS1 subit un changement conformationnel suite à l'association de l'hème à son motif de liaison à l'hème. Ce changement conformationnel renforce la formation d'un complexe entre ALAS1 et la protéase ClpXP dans la mitochondrie, et accélère ainsi la dégradation de la protéine ALAS1 afin de maintenir le niveau de l'hème intracellulaire approprié. Il est possible que LONP1 et ClpXP régulent de manière coopérative la dégradation d'ALAS1 dans les mitochondries des cellules de mammifères <sup>26</sup>.

## **2-Régulation érythroïde de biosynthèse de l'hème**

La biosynthèse érythroïde de l'hème est absolument dépendante de l'absorption du fer par des érythroblastes en maturation, car le fer est non seulement nécessaire pour l'étape finale de la production de l'hème, l'incorporation du fer<sup>2+</sup> dans le PPIX, mais il contrôle également l'expression d'ALAS2 et l'activité de la FECH. Le fer est acquis par les progéniteurs érythroïdes en différenciation via l'endocytose du RTf1 (Récepteur de la Transferrine 1) et est transféré par la Mitoferrin vers les mitochondries pour la synthèse de l'hème <sup>27</sup>. Cependant, lorsque le fer est biodisponible, il stimule la synthèse d'ALAS2 pour fabriquer l'hème afin de produire l'hémoglobine, un tétramère de chaînes de globines 2 $\alpha$ , 2 $\beta$ , et l'hème. L'ALAS2 est le premier facteur limitant de la voie de biosynthèse de l'hème. L'expression d'ALAS2 est régulée par des facteurs de transcription spécifiquement érythroïdes tels que GATA1. En dépit de son rôle sur la production de l'hème, le fer intra-mitochondrial participe également à la formation des clusters

fer-souffre. La FECH ainsi que la protéine régulatrice IRP1 possèdent respectivement un centre [2Fe/2S] et [4Fe/4S]. La FECH est le deuxième facteur limitant de la voie de biosynthèse de l'hème car son expression est augmentée au cours de la différenciation érythroïde et est contrôlée par des facteurs de transcription Sp1, NF-E2 et des éléments de GATA. Au niveau post-transcriptionnel, l'expression de FECH est contrôlée par la disponibilité des clusters fer-soufre néoformés dont la biogenèse dépend du fer, ainsi que des machines d'assemblage de cluster fer-soufre. Le pH mitochondrial joue un rôle important sur l'assemblage et la stabilité du cluster fer-souffre et subséquemment l'activité de ferrochélatase. L'activité FECH serait donc régulée par le facteur inhibiteur ATPiF1 (ATPase inhibitory factor 1) qui module le pH mitochondrial et le potentiel redox. ATPiF1 est un régulateur de l'ATP synthase (ou ATP phosphohydrolase (H<sup>+</sup>-transporting)). ATP synthase est une protéine à double fonction qui soit synthétise l'ATP en utilisant un gradient H<sup>+</sup> + généré à travers de la membrane mitochondriale ou hydrolyse l'ATP dans une réaction inverse (activité ATPase) en cas d'absence du potentiel de membrane ou du gradient du pH. Campanella M et al ont démontré qu'ATPiF1 stimule l'activité ATP synthase en inhibant son activité ATPase<sup>28</sup>. D'après les expériences effectuées dans les modèles de poisson zèbre et les cellules murines portant le gène muté *ATPiF1*, il a été démontré que l'augmentation du pH au niveau de la matrice mitochondriale a entraînée la diminution de l'activité FECH et ainsi l'hémoglobinisaiton<sup>29, 30</sup>. La régulation négative de FECH pendant une érythropoïèse en carence en fer a été observée chez les souris *Irp2*<sup>-/-</sup>, pendant la différenciation érythroïdes des cellules MEL limitée en fer, et enfin dans des conditions d'une biogénèse déficiente de cluster fer-souffre<sup>31</sup>.

L'hème, de son côté, joue également des rôles régulateurs multiples au cours de la différenciation des précurseurs érythroïdes étant donné qu'il commande sa propre synthèse et régule l'expression du gène spécifiquement érythroïde majeur de la voie de biosynthèse de l'hème, l'ALAS2 (Fig.6). Un équilibre très précis entre la synthèse de l'hème et des globines est nécessaire car l'hème libre est extrêmement toxique pour l'organisme. La régulation du pool de l'hème libre dans le tissu érythroïde se réalise par trois voies principales :

- Le niveau de biosynthèse de l'hème par l'ALAS2 et la FECH
- Catabolisme de l'hème par HO-1
- Export de l'hème par FLVCR1

## Figure 6) Régulation érythroïde de biosynthèse de l'hème.

### a- Le système IRE/IRP

Les protéines régulatrices IRP1 et IRP2 (Iron Regulatory Protein) sont capables de se fixer sur une séquence spécifique d'ARN messager ayant une structure tertiaire tige boucle nommée IRE (Iron Responsive Element). La liaison d'IRP à un IRE en 5' empêche l'initiation de la traduction tandis que sa liaison à un IRE en 3' protège l'ARNm de la dégradation par des ribonucléases intracellulaires. En situation de biodisponibilité normale du fer, les IRPs ne se fixent pas aux IREs, car IRP1 se complexe avec un cluster fer-soufre [4Fe-4S] pour devenir l'aconitase (ACO1) dont la fonction est actuellement inconnue. Contrairement à IRP1, IRP2 ne se complexe pas avec le cluster fer-souffre et est dégradé par le protéasome (Fig.7). Durant l'érythropoïèse, IRP2 contrôle l'absorption du fer et la biosynthèse de l'hème. Il a été démontré que les souris IRP2<sup>-/-</sup> développe une anémie microcytaire hypochrome avec une disponibilité du fer réduite pour l'érythropoïèse. Le niveau d'expression du RTf1 chez les souris IRP2<sup>-/-</sup> est très faible. Le transcrit du RTf1 contient une séquence IRE en 3' et perd sa stabilité en cas d'absence d'IRP2. Par conséquent, les cellules ne parviennent pas à acquérir des quantités suffisantes du fer pour l'érythropoïèse en dépit de l'approvisionnement du fer physiologique. Ces souris développent également la protoporphyrine érythropoïétique due à l'accumulation élevée du PPIX libre ou Zn-PPIX (~ 200-fois plus de PPIX libre). Le transcrit d'ALAS2 contient un IRE en 5' et est également soumis à cette régulation post-transcriptionnelle. Lorsqu'*Irp2* est invalidé, la traduction d'ALAS2 n'est pas inhibée par le mécanisme IRP/IRE et ainsi la biosynthèse de l'hème est suractivée. Cependant, l'absence du fer à un niveau approprié pour la production de l'hème, entraîne l'accumulation du PPIX libre ou Zn-PPIX <sup>32,33,34</sup>. L'expression de plusieurs autres gènes impliqués dans le métabolisme du fer est aussi régulée par le système IRE/IRP. Les transcrits des *H-ferritine*, *L-ferritine*, *mAconitase* et *ferroportine* contiennent un IRE en 5' tandis que le transcrit de *DMT1* possède un IRE en 3' <sup>35</sup>. Au total, le système IRE/IRP permet une régulation balancée

entre stockage/utilisation/export du fer d'une part et son apport cellulaire et mitochondrial d'autre part.

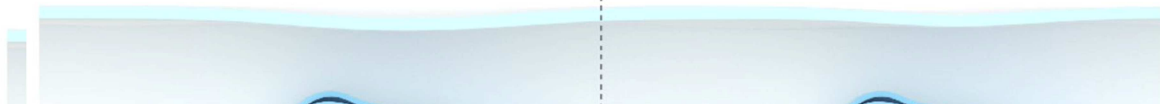
**Figure 7) Modulation post-transcriptionnelle par le fer via le système IRE/IRP, modifié d'après Shah YM et Xie L, 2014 <sup>36</sup>.** Lorsque la concentration du fer est faible, la liaison entre IRP1 et IRP2 avec les ARNm ayant des séquences IREs est renforcée. La liaison d'IRP aux transcrits qui contiennent un IRE en 5' tels que L-ferritine, H-ferritine, Ferroportine, ALAS2 réprime la traduction. Alors que la liaison d'IRP aux transcrits qui possèdent un IRE en 3' tels que RTf1 et DMT1, stabilise l'ARNm de la dégradation par des ribonucléases intracellulaires.

Les données suggèrent que l'hème pourrait également favoriser sa propre synthèse au cours de la différenciation érythroïde par la régulation de l'expression d'ALAS2 via le système IRE/IRP. L'hème interagit avec la séquence consensus HRM d'IRP2 et entraîne l'oxydation d'IRP2 qui déclenche son ubiquitination et sa dégradation <sup>37</sup> (Fig.8). L'augmentation du niveau de l'hème dans les précurseurs érythroïdes stimule donc la production de protéine ALAS2 due à la perte d'IRP2. En conclusion, l'hème participe au contrôle de l'homéostasie du fer dans les progéniteurs érythroïdes en contrôlant l'oxydation/dégradation d'IRP2.

**Figure 8) Modulation post-transcriptionnelle par l'hème via le système IRE/IRP.** L'hème interagit avec la séquence consensus d'HRM d'IRP2 et entraîne l'oxydation d'IRP2 qui déclenche son ubiquitination et sa dégradation.

**b- L'hème contrôle la transcription des gènes spécifiquement érythroïdes**

L'hème est impliqué dans la régulation transcriptionnelle de plusieurs gènes tels que l'hème oxygénase-1 (HO-1) et les gènes de globines par l'intermédiaire d'un répresseur de la transcription : BACH-1<sup>38</sup>. Ce dernier possède cinq motifs HRM et est spécifique des séquences trans-activatrices MARE (Maf Recognition Element) au niveau des promoteurs. Lorsque l'hème se lie au domaine C-terminal du BACH-1, il inhibe son activité de liaison à l'ADN et induit son dissociation des protéines MAFs, déclenche son exportation du noyau et induit son ubiquitination et la dégradation<sup>39,40,41</sup>. Dans des conditions normales, la protéine KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) séquestre NrF2 dans le cytoplasme<sup>42</sup> et par conséquent BACH-1, qui est en compétition avec NrF2, se complexe avec les protéines MAFs. De ce fait, L'expression des gènes est réprimée par la fixation d'hétéro-dimère de BACH-1 et MAF sur la séquence MARE. Au contraire, le stress oxydatif induit par un excès d'hème provoque la dissociation du complexe KEAP1/NrF2 et l'accumulation nucléaire de NrF2 (Nuclear factor erythroid 2-related Factor-2)<sup>43</sup>. L'hétéro-dimère de NrF2 et MAF se fixent ensemble sur la séquence MARE et stimulent la transcription des gènes (Fig.9).



**Figure 9) L'implication de BACH-1 dans la régulation de la transcription des gènes tels que l'hème oxygénase et les globines, modifié d'après Yuji Naito, 2011 <sup>44</sup>.** Dans des conditions normales, BACH-1 reconnaît des séquences enhanceurs MARE et réprime la transcription des gènes tels que *HO-1*. L'augmentation de l'hème inhibe la liaison de BACH-1 à l'ADN et induit sa dissociation des protéines MAFs, déclenche son exportation du noyau et induit son ubiquitination et la dégradation. De ce fait, la séquence MARE est disponible pour les complexes activateurs de transcription y compris Maf/Nrf2.

De plus, l'hème contrôle également la transcription d'autres gènes exprimés de manière ubiquitaire tels que les protéines de stockage du fer, L-ferritin et l'exporteur du fer, la ferroportine par ce mécanisme <sup>45</sup>. Ce mécanisme de régulation pourrait contribuer à adapter le métabolisme du fer dans des érythroblastes en fonction de leur stade afin d'assurer une biodisponibilité suffisante du fer pour la synthèse d'hème.

#### **c- L'hème régule la synthèse des protéines lors de la différenciation érythroïde**

La synthèse des protéines dans les progéniteurs érythroïdes dépend principalement du niveau de l'hème qui est détectée par HRI (Heme Regulated Inhibitor, eIF2 $\alpha$  kinase), un membre de la famille des protéines kinases capables de phosphoryler la sous-unité  $\alpha$  du facteur d'initiation de la traduction chez les eucaryotes (eIF2 $\alpha$ ). Une fois phosphorylée, eIF2 $\alpha$  entraîne l'inhibition de la synthèse protéique <sup>46</sup>. HRI est exprimé de manière prédominante dans le compartiment érythroïde et son activité de kinase est directement régulée par le niveau de l'hème. L'hème inhibe l'activité de phosphorylation en se liant au domaine kinase d'HRI via un motif HRM. Par conséquent, la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  est diminuée et le taux de la traduction est augmenté, principalement des ARNm *HBA* et *HBB*. D'autre part, lors de la carence en hème, l'activation d'HRI et la phosphorylation ultérieure d'eIF2 $\alpha$  provoquent l'inhibition de la synthèse protéique. Ainsi, seulement après l'initiation de la biosynthèse de l'hème dans les progéniteurs érythroïdes en différenciation, l'inhibition de l'activité HRI permet la synthèse des globines  $\alpha$  et  $\beta$ . De cette manière, HRI est fondamental pour coordonner la synthèse d'hème et de chaînes de globine évitant ainsi une accumulation d'hème pro-oxydant et des chaînes de globine seule (Fig.10). Les souris *Hri*<sup>-/-</sup> montrent une anémie macrocytaire hyperchrome légère avec une réponse adaptative altérée à une carence en fer. La réponse adaptative normale à une carence en fer est d'arrêter la synthèse d'hémoglobine, ce qui entraîne une anémie microcytaire hypochrome. Les souris *Hri*<sup>-/-</sup>



soumises à un régime de carence en fer développent une anémie hyperchrome avec une destruction accrue des précurseurs de globules rouges en phase tardive et une hyperplasie érythroïde compensatoire au niveau médullaire. L'excès des chaînes de globine, après un déficit en HRI, précipite et forment des inclusions protéiques toxiques, responsable de la mort des progéniteurs érythroïdes. Ces données démontrent clairement le rôle essentiel des HRI pour arrêter la synthèse d' $\alpha$ - et  $\beta$ -globine dans les progéniteurs érythroïdes lorsque le fer est en carence, ce qui évite la précipitation toxique des chaînes de globine <sup>47</sup>.

**Figure 10) L'hème contrôle la traduction des ARNm *HBA* et *HBB* dans les progéniteurs érythroïdes en différenciation, modifié après D.Chiabrando, 2014 <sup>48</sup>.** La traduction des ARNm de globines est régulée par l'hème via la protéine kinase HRI. Ce dernier est inactivé lorsqu'il se lie à l'hème. Par conséquent, le facteur d'initiation de traduction eIF2 $\alpha$  n'est pas phosphorylé et entraîne l'initiation de synthèse de protéines.

#### **4-Catabolisme de l'hème**

L'hème libre devrait rapidement être dégradé par l'hème oxygénase (HO), en monoxyde de carbone, biliverdine et fer. La biliverdine est réduite par la biliverdine réductase en bilirubine. La bilirubine est ensuite transportée vers le foie où elle est conjuguée avec un sucre solubilisant appelé l'acide glucuronique. Cette forme plus soluble de bilirubine (conjuguée) est excrétée dans la bile. Le fer est recyclé. Il existe deux isoenzymes catalytiquement actifs pour HO, HO-1, HO-2. Les gènes humains codant pour HO-1 et HO-2 sont localisés respectivement sur le chromosome 22 et du chromosome 16. HO-1 est une isoenzyme inductible, et son expression est régulée positivement par son substrat "hème" et le stress oxydatif (voir paragraphe 2b).

## 5-La biosynthèse de l'hème dans des conditions hypoxiques

L'érythropoïétine (EPO) est une glycoprotéine de 34 kDa, composée de 165 acides aminés sous sa forme circulante. Son rôle principal est la prévention de l'apoptose dans les cellules érythroïdes dépendantes de l'EPO, les CFUs (colony-forming unit) et des érythroblastes qui n'ont pas encore commencé la synthèse de l'hémoglobine. L'hypoxie est l'inducteur physiologique primaire pour la production d'EPO, qui, en fonction des conditions hypoxiques, augmente les taux sériques d'EPO jusqu'à plusieurs centaines de fois par rapport au taux basal. EPO est produit à 90% par les fibroblastes péri-tubulaires du cortex rénal et à 10% par le foie, principalement les hépatocytes et les cellules d'Ito situées autour des sinus dans les espaces de Disse <sup>49</sup>. L'EPO-R est son récepteur qui est également inductible par l'hypoxie. Il est exprimé au niveau des progéniteurs érythropoïétiques et exerce un effet par de multiples voies <sup>50</sup>. Au niveau des tissus érythropoïétiques, l'hypoxie entraîne une prolifération des précurseurs érythroïdes via l'EPO. La réponse cellulaire à l'hypoxie est contrôlée par une famille de facteurs de transcription : HIFs (Hypoxia-Inducible Factors). HIF est un hétéro-dimère composé de deux sous unités, HIF- $\alpha$  et HIF- $\beta$ . En conditions normoxiques, la sous unité HIF- $\alpha$  est hydroxylée par des prolyl hydroxylases PHD et est dégradée par le protéasome. La forme hydroxylée de HIF- $\alpha$  se fixe à VHL (Von Hippel Lindau) et le complexe HIF- $\alpha$ /VHL facilite la dégradation de HIF- $\alpha$  via le protéasome. Contrairement à HIF- $\alpha$ , la sous unité HIF- $\beta$  est stable en conditions normoxiques. En situation d'hypoxie, les prolyl hydroxylases sont inactivées et par conséquent, HIF- $\alpha$  se dimérise avec HIF- $\beta$ . Ce nouveau complexe se lie à de courtes séquences d'ADN qui contiennent les HREs et qui régulent la transcription oxygène-dépendante des gènes cibles de HIF dont celui de l'EPO (Fig.11). Il existe trois sous unités régulatrices HIF- $\alpha$  : HIF1, HIF2 et HIF3. La sous unité HIF-1 $\alpha$  est exprimé de façon ubiquitaire et est le facteur majeur de réponse à l'hypoxie. Zhang F.L et al ont démontré que l'expression d'ALAS2 est régulée par HIF-1 $\alpha$  dans des conditions hypoxiques. Ils ont émis l'hypothèse que l'augmentation du niveau d'expression d'ALAS2 contribue à l'hémoglobinisaiton des cellules érythroïdes dans des conditions hypoxiques, et qu'ALAS2 coopère avec l'EPO pour augmenter l'érythropoïèse pendant l'hypoxie <sup>51,52</sup>.

**Figure 11) La stabilité des protéines HIF est dépendante de la biodisponibilité du fer et l'oxygène, modifié d'après Yatrik M. Shah and Liwei Xie, 2015 <sup>53</sup>.** Le fer est majoritairement utilisé pour la synthèse des globules rouges; la carence en fer réduit le nombre de globules rouges et le transport d'oxygène, conduisant à une hypoxie tissulaire. Une diminution de l'oxygène cellulaire ou la biodisponibilité du fer inhibe l'hydroxylation de la sous unité HIF- $\alpha$  par des prolyl hydroxylases PHD. Les espèces réactives de l'oxygène dans les mitochondries (mtROS) sont également nécessaires pour la stabilisation de HIF. HIF- $\alpha$  stabilisé se complexe avec la sous unité HIF- $\beta$ . Ce nouveau complexe se lie à de courtes séquences d'ADN qui contiennent les HRE et qui régulent la transcription oxygène-dépendante des gènes cibles de HIF dont celui de l'EPO.

## **6-Le trafic de l'hème et ses précurseurs à travers les membranes mitochondriales**

Alors que toutes les étapes enzymatiques conduisant à la production de l'hème sont bien caractérisées, les mécanismes de transport des métabolites entre le cytosol et la mitochondrie et inversement sont très mal connus. Comment l'ALA est-il exporté à travers les deux membranes mitochondriales? Comment le COPROgèneIII est-il importé dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie? Comment l'hème est-il exporté hors des mitochondries? C'est seulement dans la dernière décennie que certaines de ces questions ont commencé à trouver des réponses et plusieurs nouveaux acteurs du métabolisme de l'hème ont été identifiés.

### **a- Export de l'ALA des mitochondries**

Les transporteurs SLC25A38 et l'ABCB10 ont été proposés pour exporter l'ALA des mitochondries (Fig.12). SLC25A38 est un membre de la famille des transporteurs SLC25 de la membrane interne de la mitochondrie qui facilite la production d'ALA par l'import de glycine dans les mitochondries et échangerait la glycine contre l'ALA à travers la membrane mitochondriale interne <sup>54, 55</sup>. SLC25A38 est fortement et préférentiellement exprimé dans les cellules érythroïdes et est importante pour la biosynthèse de l'hème chez les eucaryotes.

Un seul gène a été connu pendant longtemps pour entraîner l'anémie sidéroblastique congénitale (ASC) lorsqu'il est muté: le gène spécifiquement érythroïde d'*ALAS2*. Cependant, l'équipe Guernsey a trouvé des nouvelles mutations de type "perte de fonction" dans le gène *SLC25A38* qui sont responsables de l'apparition de la maladie chez les patients atteints de la forme autosomique récessive d'ASC. Afin de confirmer le rôle de *SLC25A38* dans l'érythropoïèse, Guernsey et al ont réalisé des expériences utilisant dans des poissons zèbre des oligonucléotides antisens de type morpholino inhibant la production d'ARNm. La diminution de l'expression de *SLC25A38* chez les poissons zèbre a provoqué une anémie semblable à un déficit d'*Alas2*. Le manque d'*YDL119c*, l'orthologue de *SLC25A38*, chez les levures présente également un défaut de biosynthèse d'ALA<sup>55</sup>.

*ABCB10* est un membre de la famille "ATP binding cassette sub-family", qui utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour le transport de divers substrats à travers les membranes cellulaires. *ABCB10* est une protéine de la membrane mitochondriale interne qui s'homodimérise pour former un transporteur fonctionnel<sup>56</sup>. En plus de son rôle dans la stabilisation de *MFRN1* (Mitoferrin-1) qui est l'importeur essentiel du fer dans la mitochondrie pour la biosynthèse de l'hème<sup>57,58</sup>, *ABCB10* joue un rôle important au cours de la différenciation érythroïde. Les souris *Abcb10* <sup>-/-</sup> meurent in utero en raison d'une anémie sévère<sup>59</sup>. Il a d'abord été proposé qu'*ABCB10* puisse exporter l'hème des mitochondries<sup>60</sup>. Cependant, l'extinction d'*ABCB10* provoque une diminution des niveaux cellulaire et mitochondrial de l'hème associée à la réduction de l'activité de plusieurs enzymes ayant un groupement prosthétique héminique. L'administration d'ALA restaure complètement le niveau de l'hème dans les cellules sous exprimées pour *ABCB10* alors que la surexpression d'*ALAS2* ne parvient pas à le faire. Ainsi, il a été proposé qu'*ABCB10* puisse faciliter la synthèse mitochondriale d'ALA ou son exportation à partir de la mitochondrie. *SLC25A38* et *ABCB10* sont situées sur la membrane mitochondriale interne. Il reste à comprendre comment l'ALA est transporté à travers la membrane mitochondriale externe<sup>48</sup>.

**Figure 12) Le trafic de l'hème et ses précurseurs à travers les membranes mitochondriales, modifié après D.Chiabrando et al, 2014<sup>48</sup>.**

#### **b- L'import mitochondrial de COPROgèneIII**

ABCB6 a été proposé comme étant le transporteur de COPROgèneIII du cytoplasme vers l'espace inter-membranaire mitochondrial (Fig.12). ABCB6 est situé dans la membrane mitochondriale externe et son expression est régulée positivement après la stimulation de la différenciation érythroïde des cellules MEL et G1ER ainsi que par le niveau d'hème. ABCB6 a été trouvé aussi sur la membrane plasmique, dans le compartiment de Golgi et dans les lysosomes. Cependant certaines études ne parviennent pas à détecter ABCB6 dans les mitochondries<sup>61, 62, 63</sup>. ABCB6 se lie aux porphyrines, y compris l'hème, et les essais de compétition suggèrent que le COPROgèneIII soit le substrat principal<sup>61</sup>. Cependant, la localisation mitochondriale d'ABCB6 ainsi que le rôle d'ABCB6 dans la translocation des porphyrines dans les mitochondries restent controversés. En outre, ABCB6 a été associée à d'autres fonctions non liées à l'homéostasie des porphyrines. Elle code pour un nouveau système de groupe sanguin Langereis (Lan). L'antigène du groupe sanguin Lan est exprimé à la membrane des globules rouges ainsi que des cellules du carcinome hépatocellulaire<sup>64</sup>. La manifestation clinique, chez différents individus atteints de porphyrie ayant les mêmes mutations, est très variable. Fukuda et al ont démontré très récemment que les patients atteints de porphyrie portent des allèles variant du gène *ABCB6* et les études fonctionnelles ont indiqué que la plupart de ces variantes sont exprimées très faiblement ou ont une altération de la fonction d'ABCB6. D'autre part, une disruption génique du gène *ABCB6* dans un modèle murin de protoporphyrie érythropoïétique (*Fech<sup>m1Pas</sup>/Fech<sup>m1Pas</sup>*) a exacerbé le phénotype de la maladie par l'accumulation de porphyrine. Toutes ces études ensemble confirment le rôle d'ABCB6 comme étant le modificateur génétique de la porphyrie et suggère que les médicaments induisant la porphyrie peuvent produire des toxicités excessives chez les individus avec le group sanguin Lan (-)<sup>65</sup>.

Récemment, il a été rapporté que chez les souris *Abcb6* <sup>-/-</sup>, l'importation mitochondriale dépendant de l'ATP du COPROgèneIII est inhibée alors que l'absorption indépendante de l'ATP du COPROgèneIII n'est pas affectée. L'analyse de l'expression des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'hème pendant la différenciation érythroïde a révélé que le déficit en *Abcb6* entraîne une augmentation de la régulation des voies alternatives de la porphyrine et du fer et est associée à un taux élevé de PPIX. Le stress induit par la phénylhydrazine entraîne une mortalité plus élevée chez les souris *Abcb6* <sup>-/-</sup>, probablement en raison d'un taux élevé de PPIX dont sa transformation en hème est inhibée en dépit d'un niveau normal de ferrochélatase. Pris ensemble, ces données suggèrent qu'ABCB6 est le seul importeur dépendant de l'ATP de la porphyrine et le déficit en ABCB6 entraîne une régulation positive des voies de l'hème et du fer nécessaires au développement normal <sup>66</sup>.

### **c- L'export d'hème de la mitochondrie**

L'hème libre agit comme le régulateur de plusieurs événements biologiques dont la régulation d'ALAS1 dans le foie. Néanmoins l'excès de l'hème est hautement toxique de part ses propriétés prooxydantes et pro-inflammatoires. De ce fait, il existe des systèmes de régulation très fins de la quantité d'hème libre en jouant sur son catabolisme par HO-1 ou son export par FLVCR1 (Feline Leukemic Virus Cell Surface Receptor-1). FLVCR1 appartient à la famille des transporteurs MFS (Major Facilitator Superfamily) et est un exporteur d'hème (Fig.12) qui est exprimé au niveau des sites potentiels du trafic de l'hème tels que le tissu hématopoïétique <sup>67</sup>. Il existe deux isoformes différentes de FLVCR1 : FLVCR1a et FLVCR1b, exprimées respectivement, sur la membrane plasmique et mitochondriale. FLVCR1a, avec 12 domaines transmembranaires, a été initialement identifié comme un exporteur essentiel de l'hème pendant l'érythropoïèse <sup>67,68</sup>. L'exporteur d'hème mitochondrial, FLVCR1b, avec 6 domaines transmembranaires, est essentiel pour la différenciation érythroïde puisque la surexpression ou l'inactivation de *FLVCR1b* dans les cellules K562 favorise ou réduit, respectivement, la différenciation érythroïde. La comparaison entre différents modèles de souris invalidés pour *Flvcr1* a indiqué que *Flvcr1b* a un rôle important pour le contrôle de la différenciation érythroïde fœtale <sup>48</sup>. FLVCR1b est le premier exporteur de l'hème mitochondrial identifié à ce jour. Il a été émis l'hypothèse que FLVCR1b agisse de façon coordonnée avec FLVCR1a, afin d'assurer une biodisponibilité efficace de l'hème dans les compartiments cytosoliques et mitochondriaux <sup>48</sup>.

## **7-La FECH**

L'enzyme terminale de la voie de biosynthèse de l'hème est la FECH qui est localisée sur la face interne de la membrane interne de la mitochondrie et qui catalyse, à l'état d'homo-dimère,

l'incorporation du  $\text{Fe}^{2+}$  dans la protoporphyrine IX pour former l'hème. Le déficit de l'activité enzymatique FECH entraîne l'accumulation de la PPIX et par conséquent l'apparition de la protoporphyririe érythropoïétique.

#### **a- Le gène *FECH***

L'expression du gène *FECH* est ubiquitaire et est fortement induite au niveau transcriptionnel lors de l'érythropoïèse tardive chez les mammifères. La FECH humaine est codée par un gène nucléaire qui couvre environ 45 kb de l'ADN chromosomique et qui est situé sur le bras long du chromosome 18. Ce gène contient 11 exons qui varient en taille de 108 à 1293 bp<sup>69,70</sup>. Un pseudogène (~30 kb) a été identifié sur le chromosome 3 et montre > 80% d'homologie avec la séquence nucléotidique du gène fonctionnel, mais ne contient pas de cadre de lecture ouvert. Le gène *FECH* contient deux sites de polyadénylation dans sa région 3' UTR et par conséquent, deux transcrit ARNm de 2,5 et 1,6 kb. Une seule protéine fonctionnelle est traduite à partir de deux isoformes dans les tissus érythroïdes et non érythroïdes. Le promoteur proximal du gène *FECH* humain ne contient pas la boîte CAAT ou TATA, mais contient la boîte GC. La séquence consensus concernant le site de liaison à GATA-1 se trouve dans la région du promoteur de *FECH* humain en positions -566 à -561 et -561 à -556. Ces motifs d'ADN servent en partie pour coordonner la transcription des gènes spécifiquement érythroïdes et sont présents dans le promoteur des gènes de globines et des gènes codant pour les enzymes érythroïdes-inductibles dans la biosynthèse de l'hème telles qu'ALAS2 et UROIII synthase<sup>71,72</sup>.

#### **b- Structure de l'enzyme FECH**

Wu C.K et al ont déterminé pour la première fois la structure de FECH humaine par la technique de cristallographie à rayon X<sup>73</sup>. Chez les eucaryotes, la ferrochélatase existe sous forme d'un homo-dimère avec une masse moléculaire d'environ 86 kDa. La FECH est synthétisée à partir de deux monomères clivés dans leur partie N terminale lors de leur translocation dans la mitochondrie. Chaque monomère de cette enzyme est composé de deux domaines similaires, contenant chacun quatre brins parallèles en feuillet  $\beta$ , entouré par des hélices  $\alpha$ . La protéine ferrochélatase chez les eucaryotes, à l'exception des enzymes des plantes et des champignons, contient un cluster [2Fe-2S] par sous-unité. Les clusters fer-soufre sont synthétisés dans les cellules humaines par une machinerie mitochondriale et aussi par une machinerie indépendante cytosolique, qui impliquent au moins 20 protéines au total<sup>74</sup>. L'extrémité C-terminale dans chaque monomère adopte une structure hélice-tour-hélice et est fortement impliquée dans la stabilisation du dimère. L'extrémité N-ter comporte le site actif de l'enzyme qui est présente dans chaque monomère<sup>75</sup>. Les poches comportant des sites actifs de FECH dimère sont situées sur la

surface qui est censé être incorporée dans la membrane. L'entrée de la poche du site actif est bordée par des résidus essentiellement hydrophobes, tandis que la cavité interne de la poche est remplie avec plusieurs résidus hydrophiles. La structure cristallinienne de la FECH complexée à la PPIX a révélé que le site actif se ferme lors de la liaison avec la porphyrine et que le substrat est complètement englouti par la protéine. Plusieurs interactions clés entre la FECH et le substrat, positionne la porphyrine dans la poche du site actif (Fig.13). La conservation moléculaire de la FECH est très faible entre les espèces et seulement six résidus d'acide aminé sont strictement conservés entre les mammifères et les plantes <sup>76</sup>.

**Figure 13) Structure de la FECH.** La cristallisation du dimère (PDB 3HCN, sous Rasmol). Il existe un vaste réseau des liaisons hydrogène intermoléculaires et des interactions hydrophobes à l'interface du dimère. Chaque monomère contient un cluster [2Fe-2S].

### c- Les substrats et les inhibiteurs de FECH

La ferrochélatase accepte une variété de porphyrines (telle que la mésoporphyrine utilisée dans la mesure de l'activité FECH) comme substrats ainsi que des cations divalents tels que le zinc, le cobalt, le nickel et le cuivre. Certains ions métalliques comme le plomb, le magnésium et le mercure ont des effets inhibiteurs sur la FECH et ALAD. L'intoxication au plomb est à l'origine du saturnisme en inhibant l'activité FECH par l'interaction de cations avec les groupements thiols. Le fer ferreux est le substrat le plus efficacement incorporé en termes de kcat (le nombre de molécules de substrat hydrolysées par minute par une molécule d'enzyme). L'excès de substrat, excepté le fer, peut avoir un effet inhibiteur sur la formation du produit final. La FECH contient deux sites catalytiques pour la fixation du métal. L'un des inhibiteurs non compétitifs sur l'activité FECH est le  $Zn^{2+}$  qui réduit la production de métalloporphyrines non hémiques en



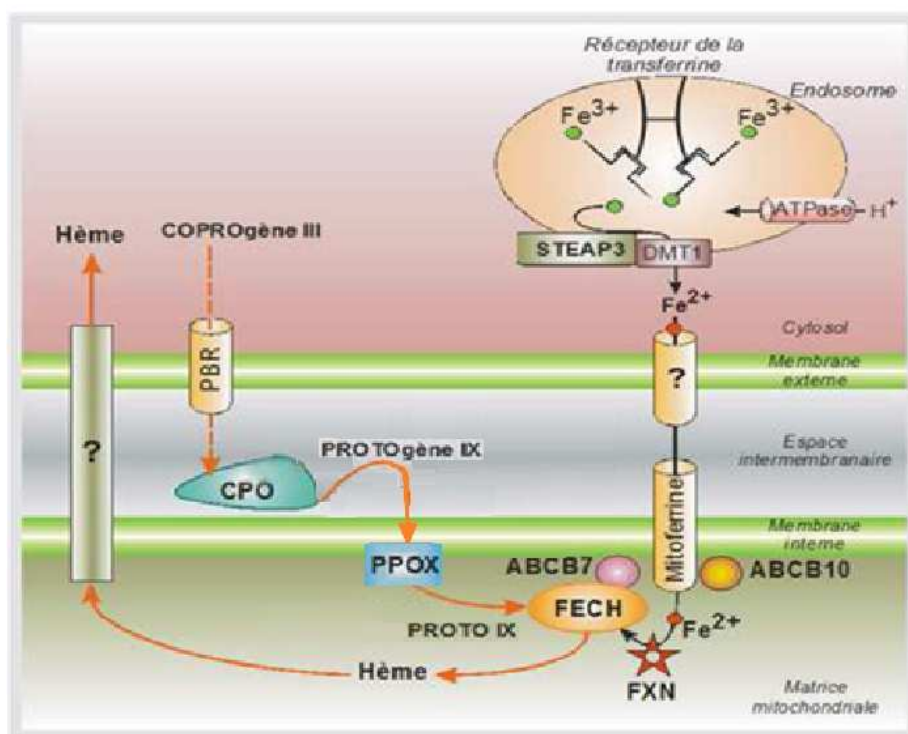
ralentissant l'activité de la FECH. La proportion de Zn PPIX est augmentée dans le cas de carence martiale ou d'empoisonnement par le plomb <sup>76</sup>.

#### **d- Interaction avec d'autres protéines**

Les protéines identifiées comme étant en interaction avec la FECH, comprennent un certain nombre de protéines impliquées dans le métabolisme de l'hème (ALAS2 et PPOX) et du métabolisme du fer (ABCB10 et ABCB7). Ces interactions soulignent l'importance de la FECH comme le point régulateur crucial à l'intersection de ces deux voies métaboliques. ABCB7 est co-localisée avec la FECH dans la mitochondrie et interagit avec le domaine C-ter de la ferrochélatase. Chez l'homme ABCB7 est un régulateur de synthèse de l'hème, soit par son impact direct sur l'assemblage des clusters [Fe/S] ou par la régulation de la production érythroïde de l'hème en modulant le contenu du fer cytosolique <sup>77</sup>. Les modèles murins mutés pour le gène *Abcb7* présentent l'anémie sidéroblastique <sup>78</sup>, et cela confirme que la production de l'hème est modulée indirectement par l'action d'ABCB7 sur la FECH.

Il a été démontré, dans la lignée MEL de souris, que les protéines MFRN1 et ABCB10 forment un complexe transitoire avec la FECH pour faciliter le transfert direct du fer<sup>2+</sup> à la FECH. L'expression d'ABCB10 est induite lors de l'érythropoïèse et régulée au niveau transcriptionnel par GATA1. La demi-vie de MFRN1 est augmentée par ABCB10 et cela augmente l'import du fer dans la mitochondrie. ABCB10 s'associe avec la forme érythroïde de MFRN1 mais pas avec la forme ubiquitaire (MFRN2). ABCB10 pourrait également être impliqué dans l'export de l'hème nouvellement synthétisé par la FECH <sup>79, 80</sup>.

La frataxine (FXN), l'intermédiaire entre la FECH et la MFRN1, est un senseur du fer intramitochondrial qui joue un rôle fondamental dans l'apport du fer vers la FECH <sup>81</sup> (Fig.14).



**Figure 14) La ferrochélatase, localisation et partenaires.**

Des données récentes suggèrent une interaction entre les enzymes PPOX et FECH, ce qui faciliterait le transfert de la PPIX dans la mitochondrie. Medlock et al ont confirmé dernièrement que la PPOX est localisée dans la matrice de la mitochondrie<sup>82</sup> et n'est pas située dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie. Les protéines impliquées dans le transport de protoporphyrinogène IX, entre l'espace inter-membranaire et la matrice mitochondriale ne sont pas encore clairement identifiées, mais sont susceptibles d'être parmi des transporteurs de la membrane interne de la mitochondrie telle que Tmem14c<sup>83</sup>, Ant2<sup>84</sup>, Ogc<sup>85</sup>, ABCB10<sup>80</sup>. Chacun de ces transporteurs est impliqué dans la synthèse de l'hème lors de la différenciation érythroïde et sont proposé d'être dans un complexe multi-protéique mitochondrial avec la FECH (Fig.14)<sup>82</sup>. Ce complexe protéique mitochondrial relie physiquement la première étape de biosynthèse de l'hème catalysée par ALAS2 à la dernière étape catalysée par FECH, ce qui soutient des études précédentes qui ont montré que ces deux enzymes sont des facteurs régulateurs important de la biosynthèse d'hème<sup>74,86,82</sup>. Furuyamma et al ont démontré qu'ALAS2 est complexée également avec la sous unité beta de l'enzyme succinyl-CoA synthétase (SUCLA2). Cette association entre ces deux enzymes peut favoriser une utilisation efficace du CoA par ALAS2 ou faciliter la translocation d'ALAS2 dans les mitochondries<sup>87</sup> (Fig.15).

L'équipe de Medlock ont trouvé très récemment que PGRMC1 (Progesterone Receptor Membrane Component 1) est un nouveau partenaire et régulateur de la Ferrochélatase. Elle est impliquée dans une variété de voies cellulaires y compris la prolifération cellulaire, la synthèse du cholestérol, et l'autophagie. Ils ont proposé que PGRMC1 soit un senseur de l'hème qui interagit directement avec la FECH et diminue son activité ou un chaperon de l'hème pour délivrer l'hème nouvellement synthétisé aux hémoprotéines à différents endroits cellulaires. L'interaction entre la FECH et la PGRMC1 a lieu près de l'extrémité N-terminale de PGRMC1 <sup>88</sup>. Le fait qu'il existe un complexe mitochondrial composé de différentes protéines représente plusieurs avantages tels que la synthèse rapide, coordonnée et ciblée de l'hème pour l'érythropoïèse, la distribution de l'hème et le fer et enfin la protection cellulaire contre le fer, l'hème et les précurseurs de l'hème telles que les porphyrines.

**Figure 15) Modèle proposé du complexe mitochondrial de protéines impliquées dans le métabolisme de l'hème, modifié après Medlock et al, 2016 <sup>82</sup>.** Ce modèle soutient l'hypothèse qu'il existe un complexe mitochondrial composé de FECH, PPOX, ALAS2, ABCB10, ABCB7, et SUCLA2 pour faciliter la canalisation du substrat et coordonner le métabolisme du fer et la porphyrine.

## 8- Le complexe Transferrine/Récepteur de la Transferrine (Tf/RTf)

La transferrine est une glycoprotéine monomérique de 78 kDa, synthétisée par les hépatocytes <sup>89</sup>, qui joue un rôle majeur dans le transport du fer entre les sites d'absorption (le duodénum), de recyclage (le macrophage), de stockage (l'hépatocyte), et d'utilisation (dans les tissus en particulier par les érythroblastes). Elle est une protéine plasmatique bilobée. Chacun de ses lobes fixe avec une forte affinité, de façon réversible, deux atomes de fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) <sup>90</sup>. Lorsque la Tf est libre, elle est connue comme "apo-transferrine" alors qu'à l'état saturé en fer, elle est nommée "holo-transferrine". Différents facteurs tels que la température, la concentration ionique et le pH sont impliqués dans la fixation et la libération du fer par la transferrine <sup>91</sup>. L'endocytose du complexe Tf-RTf est le mécanisme d'incorporation du fer qui est utilisé par de nombreux types cellulaires.

Deux types de récepteurs aux fonctions très différentes peuvent fixer l'holo-transferrine :

1-Le récepteur de la transferrine 1, dénommé **RTf1** (également connu sous le nom de CD71) qui est exprimé de façon ubiquitaire dans la plupart des tissus humains et permet l'absorption du fer et participe à la régulation de la prolifération cellulaire <sup>92</sup>. Comme pour la transferrine, le gène codant pour le RTf1 est situé sur le chromosome 3 et est constitué de 19 exons <sup>93</sup>.

Les progéniteurs érythroïdes ont un besoin majeur en fer pour la synthèse de l'hémoglobine. Ce qui explique que ces cellules expriment le plus RTf1 dans l'organisme <sup>94</sup>.

Le deuxième type cellulaire exprimant fortement le RTf1 sont les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique. La barrière hémato-encéphalique limite la biodisponibilité des traitements pour le système nerveux central (CNS), y compris dans le traitement des tumeurs cérébrales, les maladies neurodégénératives et les troubles psychiatriques. Le transfert des agents thérapeutiques dans le cerveau médié par le transcytose du RTf1 a été largement étudié en raison de la forte expression du RTf1 dans ce tissu <sup>95</sup>.

Le RTf1 est exprimé sur les cellules malignes à des niveaux beaucoup plus élevés que par rapport aux cellules normales et son expression peut être corrélée avec le stade de la tumeur ou la progression du cancer. Son expression élevée dans les cellules malignes est liée aux besoins en fer pour la prolifération de ces cellules. Ce récepteur est donc très intéressant comme vecteur pour l'administration des médicaments anticancéreux <sup>96</sup>.

Le RTf1 possède d'autres fonctions importantes en lien avec le métabolisme du fer : son interaction avec HFE régule indirectement la synthèse d'hépcidine <sup>97</sup>, il est impliqué dans l'homéostasie intestinale <sup>98</sup> et enfin il a un rôle dans la régulation et la prolifération des lymphocytes B et lymphocytes T en jouant sur la biodisponibilité du fer <sup>99</sup>.

Le ciblage du récepteur de la transferrine pour la distribution de petites molécules, des protéines, des acides nucléiques et des nanoparticules dans de nombreux types de cellules ne cesse de croître. Le ciblage du RTf1 est possible par l'utilisation d'une variété de méthodes, y compris des stratégies qui utilisent principalement son ligand naturel Tf, les anticorps monoclonaux et les peptides qui ciblent ce récepteur de manière spécifique<sup>96, 100</sup>.

2- Le récepteur de la transferrine 2, **RTf2**, qui est une protéine fortement homologue à RTf1 (avec 45-66 % d'homologie dans le domaine extracellulaire) mais son expression concerne efficacement les hépatocytes, les cellules érythroïdes et les cellules de la crypte intestinale<sup>101</sup>. Une étude protéomique récente a révélé que de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses expriment également RTf2<sup>102</sup>. Le RTf2 présente une affinité nettement plus faible pour la transferrine par rapport à celle du RTf1 (environ 25 fois inférieure), et son expression n'est pas corrélée avec le niveau du fer dans les cellules<sup>103,104</sup>. Il possède également une capacité d'endocytose de la Tf.

Le RTf2 a une fonction régulatrice dans l'homéostasie du fer systémique, puisque son inactivation provoque une surcharge systémique en fer. Le RTf2 hépatique en relation avec HFE et HJV participe à la détection du fer et à l'activation de l'hépcidine, bien que le mécanisme reste peu clair. Le RTf2 érythroïde stabilise les récepteurs de l'érythropoïétine à la surface des érythroblastes et est essentiel pour contrôler la production d'érythrocytes en carence en fer<sup>105</sup>.

#### **a- Structure du récepteur de la transferrine1**

Le récepteur de la transferrine est une glycoprotéine transmembranaire avec une masse moléculaire de 190 kDa. Il est homo-dimérique et contient deux sous-unités (ou monomères). Chaque sous-unité contient 760 acides aminés répartis en trois domaines : un court domaine N-terminal cytoplasmique, un domaine transmembranaire hydrophobe et un grand domaine C-terminal extracellulaire globulaire qui contient le site de liaison à la transferrine. Les deux monomères se lient entre eux par deux ponts disulfures dans le domaine extracellulaire et forment un dimère<sup>106,107</sup> (Fig.16). Etant donné que chaque monomère de RTf1 peut se fixer à un ligand de la transferrine, le récepteur de la transferrine peut internaliser jusqu'à quatre ions ferriques pendant un cycle d'endocytose.

**Figure 16) Structure du récepteur de la transferrine, modifié d'après M. Vernet, 1999 <sup>108</sup>.**

L'extrémité aminoterminal est dans le cytoplasme. Le domaine extracellulaire comporte deux ponts disulfures unissant les deux monomères.

**b- Le mécanisme d'internalisation de la transferrine par RTf**

Le mécanisme principal impliqué dans l'internalisation cellulaire du fer médiée par la transferrine est l'endocytose. Il existe deux voies distinctes, la première impliquant le recyclage du complexe à la surface cellulaire, et le second conduit à sa dégradation lysosomale <sup>109</sup>. Suite à la liaison de la transferrine chargée de deux atomes de fer à son récepteur correspondant, le complexe Tf/RTf active une cascade intracellulaire. L'initiation de l'endocytose commence par le bourgeonnement de vésicules recouvertes de clathrine sur la surface intracellulaire. La dynamine est une composante importante de ce processus et est nécessaire pour terminer l'endocytose par la séparation des vésicules de la membrane cellulaire <sup>110</sup>. Dans le cytoplasme, la couche de clathrine est rapidement éliminée par des enzymes de décapsidation dépendantes de l'adénosine triphosphate <sup>111, 112</sup>. La baisse du pH dans la vésicule sous l'action d'une pompe ATPase à proton permet la dissociation des ions ferriques de la transferrine. L'endosome acidifié va être reconduit à la membrane plasmique pour remplacer la Tf et le RTf1 à la surface cellulaire. Ce cycle est appelé le recyclage rapide de Tf/RTf1 dépendant de Rab5. Il existe une deuxième voie de recyclage plus lente qui est dépendante de Rab11. Ce dernier induit une première fusion de l'endosome précoce avec le compartiment péri-nucléaire des ERC <sup>113</sup> (Endosomal Recycling Compartment). Ensuite, le RTf1 est soit recyclé à la membrane plasmique par un endosome Rab11 positif soit dégradé par le lysosome <sup>114</sup>. Environ 85-95 % des complexes suivent la voie du

recyclage<sup>115, 116</sup> alors que la voie de dégradation est empruntée par environ 5-15% des récepteurs de la transferrine<sup>116</sup>. L'endocytose médié par la clathrine et la voie du recyclage du complexe Tf/RTf1 est un processus rapide et efficace (temps estimé est d'environ 10-20 min)<sup>116,117</sup>.

**Figure 17) Endocytose médiée par le récepteur de la transferrine, modifié d'après Pippard MJ, 2011<sup>118</sup>.** Suite à la liaison du complexe fer-transferrine au récepteur du RTf1, l'endocytose se déclenche et le complexe rentre dans le cytoplasme. Les ions ferriques se dissocient de la transferrine due à un pH abaissé à l'intérieur du compartiment endosomique. Le  $\text{Fe}^{3+}$  est réduit en  $\text{Fe}^{2+}$  par une ferorréductase STEAP3 puis transporté par DMT1 de l'endosome vers le cytosol. Le RTf est majoritairement recyclé vers la surface cellulaire.

Récemment, il a été démontré que STEAP3, une métallo-réductase exprimée dans des érythroblastes, est nécessaire pour l'internalisation optimale du RTf1 dans les cellules érythroïdes. Les patients avec une immunodéficience combinée caractérisée par un nombre normal mais avec une fonction altérée des lymphocytes T et B ont une substitution homozygote p.Tyr20His dans le récepteur de la transferrine 1. Cette substitution perturbe le motif d'internalisation du RTf1, conduisant à une endocytose défectueuse du récepteur et une augmentation marquée de l'expression de RTf1 à la surface cellulaire. Malgré le rôle critique du

RTf1 dans le développement et la fonction des érythrocytes, ces patients ont une anémie modérée et une faible augmentation au niveau de l'expression de RTf1 dans les précurseurs érythroïdes. Haifa H Jabara et al ont montré que STEAP3 s'associe à RTf1 et facilite l'internalisation de la transferrine dans des fibroblastes dérivés de ces patients, ce qui suggère que STEAP3 pourrait envoyer un signal auxiliaire d'endocytose pour RTf1 qui aidera à diminuer l'anémie chez ces patients <sup>99</sup>.

### **c- Régulation du récepteur de la transferrine1**

Au cours de la différenciation érythroïde, l'expression du RTf1 est augmentée à la surface cellulaire entre les étapes BFU-E et CFU-E, lorsque les cellules deviennent strictement dépendantes de l'EPO <sup>119</sup>. Au niveau transcriptionnel, l'expression du RTf1 continue d'augmenter jusqu'aux stades basophiles tardifs et diminue au stade orthochromatique <sup>120</sup>. L'expression de la protéine RTf1 est maximale au stade polychromatophile des progéniteurs érythroïdes humains <sup>121</sup>. Les érythrocytes sont entièrement dépourvus du récepteur de la transferrine. La disponibilité du fer joue un rôle principal sur la régulation de l'expression du RTf1. Les études cellulaires révèlent qu'il existe une corrélation négative entre la disponibilité du fer et l'expression du récepteur de la transferrine. En présence d'un chélateur du fer, la desferrioxamine, l'expression du récepteur de la transferrine est augmentée d'environ 2 à 5 fois <sup>122</sup>. En revanche, en présence du fer exogène, une diminution significative du récepteur de la transferrine est observée. Il a été montré que la régulation par le fer biodisponible intracellulaire fait intervenir le mécanisme IRE/IRP (Voir Fig.7, page 21).

L'ARNm du *RTf1* contient 5 IREs à l'extrémité 3' et est stabilisé par la liaison d'IRP1 ou IRP2 aux IREs en condition de faible concentration en fer libre et par conséquent, le niveau d'expression de sa protéine est augmenté. La concentration cytoplasmique du fer libre disponible pour la régulation d'IRP reste faible tout au long de la phase terminale de la différenciation érythroïde maintenant une expression élevée de RTf1 soit parce que le fer est chélaté en hème ou séquestré dans les mitochondries permettant un approvisionnement efficace en fer pour déclencher la synthèse d'hème <sup>123</sup>.

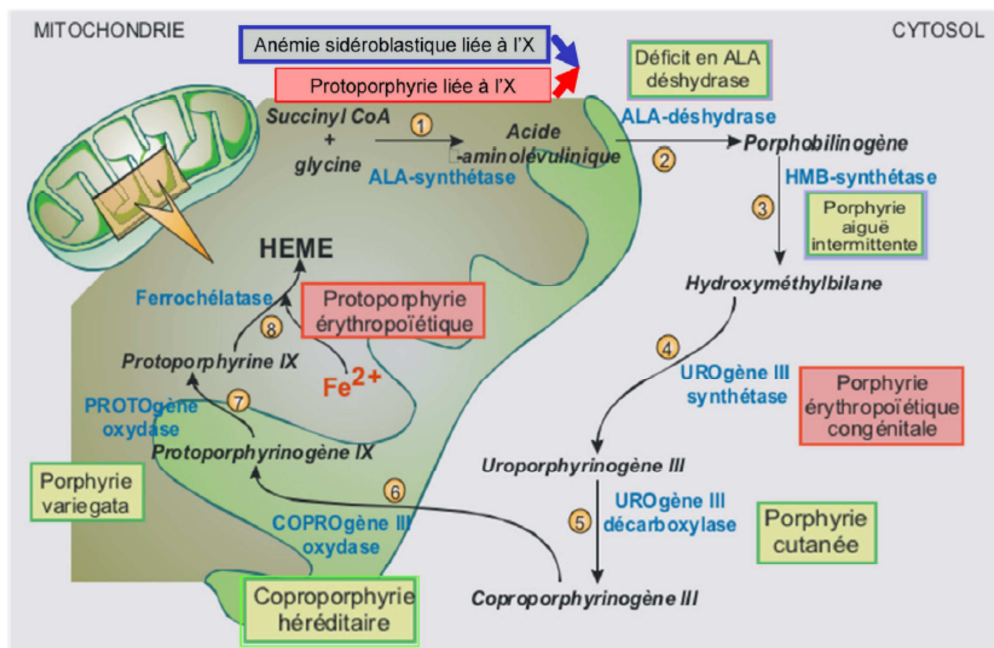
L'expression du gène RTf1 est également régulée au niveau transcriptionnel par STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5). Ce dernier fait partie d'une des principales voies de signalisation de l'EPO. Suite à la phosphorylation d'EPO-R, la molécule STAT5 est phosphorylée par Jak2 et transloquée vers le noyau où elle active plusieurs gènes impliqués dans la différenciation, la prolifération, l'apoptose et plusieurs autres processus cellulaires dont RTf1 <sup>124</sup>. STAT5 régule l'expression du RTf1 à deux niveaux : premièrement, le gène *RTf1* contient



trois séquences fonctionnelles GAS qui lient STAT5 <sup>125</sup>. Deuxièmement, l'expression d'IRP2 est également régulée par STAT5 via des séquences de liaison à STAT5 situées dans le promoteur de son gène, ce qui contribue probablement à l'augmentation de l'expression des protéines RTf1 dans les érythroblastes <sup>124</sup>.

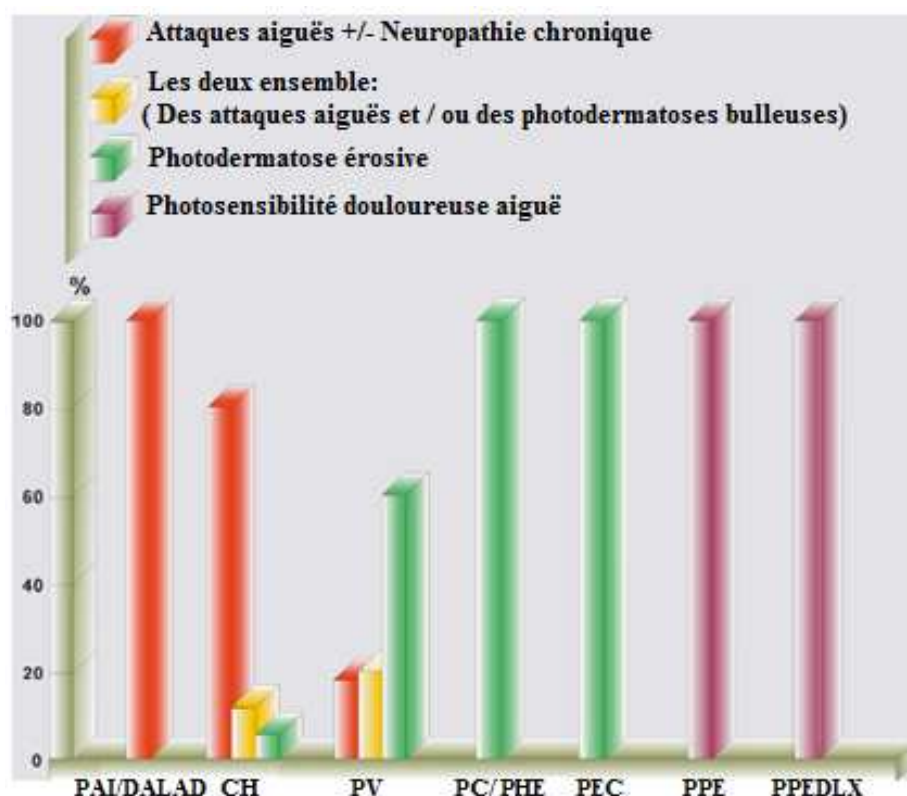
## II/ Porphyrries

Les porphyries sont un groupe de huit maladies métaboliques héréditaires de la voie de biosynthèse de l'hème. Chacune d'elle est le résultat d'une altération enzymatique spécifique de la chaîne métabolique, ce qui conduit à une accumulation de précurseurs de l'hème <sup>126,127</sup> (Fig.18). Les termes "porphyrine" et "porphyrie" sont dérivés du mot grec, porphyrus, signifiant «pourpre». L'urine des patients souffrants de porphyrie peut être sombre ou rougeâtre en raison de la présence de porphyrines oxydées, et peut s'assombrir encore après l'exposition à la lumière. Dans les différents types de porphyries, les précurseurs de l'hème s'accumulent initialement dans le foie ou la moelle osseuse, qui sont les tissus qui fabriquent le plus d'hème. Ainsi, les porphyries sont-elles classées : hépatiques ou érythropoïétiques, selon l'organe dans lequel les précurseurs de l'hème s'accumulent (Fig.18). Les porphyries peuvent être également classées en fonction de leurs différentes présentations cliniques en porphyries aiguës (PA) qui se manifestent sous forme des crises aiguës neuro-viscérales et en porphyries cutanées avec des lésions photo-induites bullo-érosives, ulcéronecrotiques ou photoalgiques <sup>128</sup> (Fig.19).



**Figure 18) Biosynthèse de l'hème : enzymes, métabolites et porphyries.**

Les porphyries hépatiques sont dans un encadré vert ; les porphyries érythropoïétiques sont dans un encadré rouge.



**Figure 19) Caractéristiques cliniques des porphyries.** PAI: la porphyrie aiguë intermittente; DALAD: Déficit en acide delta-aminolévulinique déhydratase; CH: la coproporphyrine héréditaire; PV: la porphyrie variegata; PC: La porphyrie cutanée; PHE: La porphyrie hépato-érythropoïétique; PEC: La porphyrie érythropoïétique congénitale; PPE: la protoporphyrine érythropoïétique; PPEDLX: la porphyrie dominante liée à l’X.

### A-Porphyries hépatiques aiguës :

Les trois porphyries hépatiques aiguës (PHA) quantitativement importantes sont des pathologies mendéliennes de transmission autosomique dominante et regroupent par ordre de fréquence la Porphyrie Aiguë Intermittente (PAI, MIM 176000), la Porphyrie Variegata (PV, MIM 176200) et la Coproporphyrine Héréditaire (CH, MIM 121300). La porphyrie de Doss ou déficit en acide delta-aminolévulinique déhydratase (DALAD, MIM 612740) est une forme extrêmement rare de porphyrie hépatique aiguë avec un mode de transmission autosomique récessif. Les porphyries hépatiques aiguës sont caractérisées par l’accumulation de précurseurs de la voie de biosynthèse de l’hème due à un déficit en activité enzymatique acide delta-aminolévulinique déhydratase (Porphyrie de Doss), porphobilinogène déaminase (Porphyrie Aiguë Intermittente), protoporphyrinogène oxydase (Porphyrie Variegata) ou coproporphyrinogène oxydase (Coproporphyrine Héréditaire).

## **1-Symptomatologie neurologique des porphyries hépatiques aiguës (PHA)**

Les principaux signes cliniques des porphyries hépatiques aiguës sont probablement dus à une accumulation des précurseurs de la voie de biosynthèse de l'hème, ALA et PBG et concerne aussi bien le système nerveux splanchnique, périphérique que central.

L'accumulation des précurseurs, considérés comme neurotoxiques, serait responsable des signes neurologique. Le signe cardinal des porphyries hépatiques aiguës est la crise neuroviscérale qui peut mettre en jeu le pronostic vital du patient <sup>128</sup>. Ces attaques aiguës sont difficiles à diagnostiquer du fait de la faible incidence de ces pathologies, de la faible spécificité des symptômes et d'une expressivité clinique variable entre patients et chez un même patient. Les crises de porphyries hépatiques aiguës sont souvent précédées de facteurs déclenchant endogènes et exogènes tels que la prise de médicaments porphyrinogéniques ou d'alcool, les infections, les régimes hypocaloriques, les modifications hormonales au cours du cycle menstruel ou pendant la grossesse ou le stress <sup>129</sup>. Les crises de PHA débutent par une phase prodromique pouvant inclure une perte d'appétit, une asthénie et des changements de comportement mineurs à type d'anxiété, d'insomnie et d'impossibilité de trouver le repos. La plupart de ces attaques débutent par des douleurs abdominales sévères. Nausées, vomissements et constipation sont fréquents, de même que tachycardie, hypersudation ou hypertension artérielle, tous symptômes d'une hyperactivité neurovégétative sympathique <sup>129</sup>. L'atteinte centrale peut comporter des troubles de la conscience, des crises convulsives, un SIADH et des troubles psychiatriques chez 20 à 30% des patients, des perturbations neuro-psychiatriques, une cécité. L'atteinte périphérique sensitivo-motrice commence par l'apparition d'une faiblesse musculaire des releveurs des extrémités et par une atteinte progressive des ceintures pouvant finalement aboutir à un syndrome de guilain Barré. Les crises aiguës, plus fréquentes chez les femmes (80% des cas), sont exceptionnelles avant la puberté et plus rares après la ménopause et atteignent un pic de fréquence chez les trentenaires. La plupart des patients vont présenter une ou plusieurs crises suivies d'une rémission complète pour le reste de leur vie; moins de 10% vont développer des crises aiguës récurrentes.

Certaines porphyries ne présentent que des symptômes neurologiques, cela concerne la Porphyririe de Doss et la Porphyririe Aiguë Intermittente qui sont dues à des déficits enzymatiques situés avant la formation des premières porphyrines.

## **2-Symptomatologie cutanée des porphyries hépatiques aiguës**

La coproporphyririe héréditaire et la porphyrie variegata sont des porphyries mixte, qui peuvent être associée à la fois à une accumulation de porphyrines responsable de signes cutanés ou à une accumulation de précurseurs responsable de signes neurologiques. Ces accumulations de précurseurs seraient dues à une inhibition secondaire des enzymes initiales de la voie de

biosynthèse de l'hème. Des lésions cutanées peuvent être les seules manifestations cliniques de PV (60% des cas) et plus rarement de CH. Ces lésions cutanées sont de type bullo-érosive comme celles rencontrés dans la porphyrie cutanée tardive sans photosensibilité aiguë.

### **3-Diagnostic**

Comme les manifestations cliniques sont dans la plupart des cas non spécifiques, les analyses biochimiques du métabolisme de l'hème sont indispensables pour le diagnostic d'une crise aiguë de porphyrie mais aussi pour déterminer le type de porphyrie hépatique aiguë. Pour le diagnostic de la crise aiguë, le diagnostic repose sur le dosage des précurseurs ALA et surtout PBG dans les urines, les selles ou le plasma. Les dosages enzymatiques, puis la caractérisation des mutations sur l'ADN correspondant, permettent de définir le type de porphyrie.

### **4- Traitement d'une crise aiguë de porphyrie**

Les attaques aiguës sont provoquées par des éléments qui soit induisent directement ALAS1 soit augmentent indirectement ALAS1 par la baisse du pool d'hème libre liée à une augmentation de la consommation d'hème hépatique<sup>130</sup> et en conséquence dé-répriment ALAS1.

Le traitement étiopathogénique vise à diminuer l'induction d'ALAS1 afin d'arrêter la surproduction des précurseurs. L'injection d'hémine humaine permet à restaurer rapidement le rétrocontrôle négatif sur ALAS1 et une disparition des symptômes en 2 à 4 jours. La perfusion d'hydrates de carbone permet de réprimer la transcription d'ALAS1 en réprimant le co-activateur transcriptionnel PGC-1 $\alpha$  par l'induction de la synthèse d'insuline.

### **5-Prévention des attaques aiguës récurrentes**

La prise en charge des attaques répétées suffisamment sévères nécessitant une hospitalisation est difficile et requiert le plus souvent un traitement préventif au long cours par l'hémine humaine pour anticiper l'apparition des crises. L'administration régulière, hebdomadaire à mensuelle, d'une seule dose, peut permettre d'aider à contrôler la maladie<sup>129</sup>. L'administration chronique d'hème peut être responsable de la disparition du système veineux superficiel et profond voire à une surcharge hépatique en fer. La transplantation hépatique doit être envisagée chez ces patients présentant les formes les plus sévères de PAI.

#### **B-Porphyrie cutanée tardive (PCT)**

La PCT est une porphyrie hépatique chronique qui se présente essentiellement par des signes cutanés (peau fragile, bulles séro-hématiques, pigmentation, hypertrichose des zones photo-exposées). La PCT peu être acquise (sporadique ou PCTs, type I) dans 80% des cas ou héritée (familiale ou PCTf, type II) dans seulement 20% des cas. Les patients atteints de la forme acquise n'ont pas de mutations du gène *UROD* et le déficit est limité aux seuls hépatocytes alors que les patients atteints de la forme familiale présentent un déficit constitutif en activité

uroporphyrinogène décarboxylase avec une mutation du gène *UROD*. La PCTf est transmise selon une hérédité autosomique dominante avec une faible pénétrance <sup>131</sup>. Chez ces patients, le déficit à 50% de l'activité enzymatique est un facteur prédisposant important mais insuffisant en soi pour provoquer la PCT. D'autres facteurs génétiques et environnementaux tels que le virus de l'hépatite C, le VIH, l'abus d'alcool, et l'utilisation d'œstrogènes chez les femmes contribuent à la susceptibilité de la maladie dans les deux types 1 et 2 de PCT <sup>132,133</sup>.

### **C-Porphyririe hépato-érythropoïétique**

Le mode récessif de la porphyrie cutanée tardive est la porphyrie hépato-érythropoïétique. Elle est caractérisée par des symptômes cutanés identiques à la PCT et par des manifestations hématologiques avec une anémie.

### **D-Porphyrries érythropoïétiques :**

Il existe essentiellement deux types de porphyrie érythropoïétique :

#### **1-Porphyririe érythropoïétique congénitale (PEC)**

La PEC ou la maladie de Günther est une affection autosomique récessive rare due à un déficit en activité uroporphyrinogène synthase III. La PEC est caractérisée par des manifestations cutanées, ressemblant à celles de PCT mais avec des symptômes beaucoup plus sévères et une anémie hémolytique parfois sévère. Le phénotype varie en fonction de type de mutations du gène *UROS* et le niveau de porphyrines dans le plasma et les érythrocytes qui affectent plus ou moins sévèrement l'activité de l'enzyme. Il est essentiel de protéger la peau contre la lumière du jour pour réduire la sensation de brûlure, le gonflement et les démangeaisons. Une greffe de moelle osseuse est un traitement efficace dont on peut en bénéficier chez quelques patients. Toutefois les résultats sur le long terme restent à préciser <sup>133</sup>.

#### **2-Protoporphyririe érythropoïétique (PPE)**

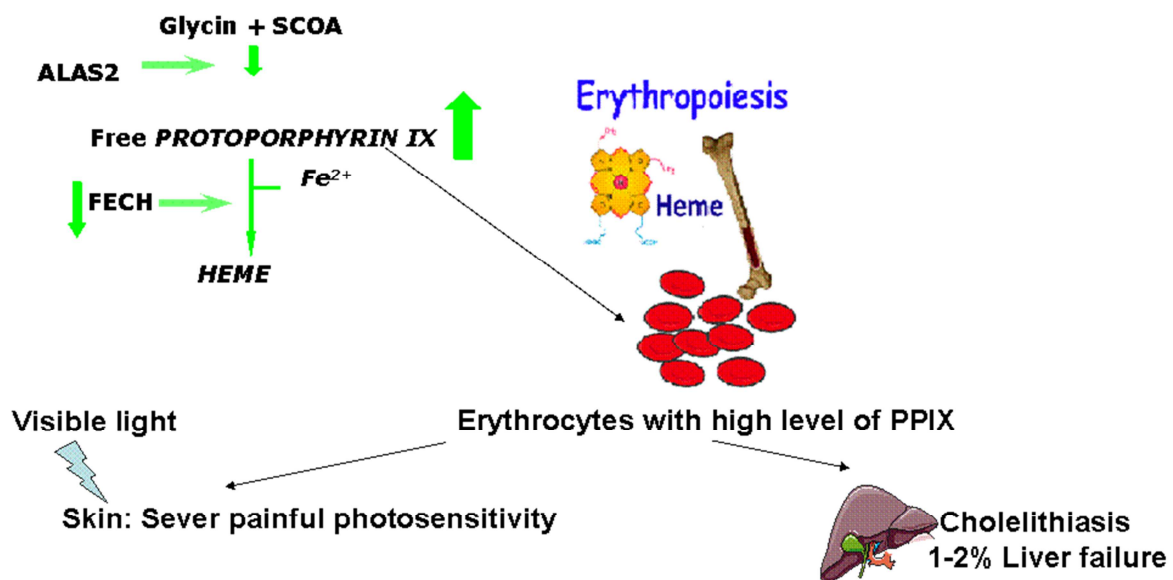
La protoporphyririe érythropoïétique (PPE, MIM 177000) est une maladie héréditaire due à un déficit partiel en ferrochélatase mitochondrial, l'enzyme terminale de la voie de biosynthèse de l'hème. Une nouvelle forme génétique de cette porphyrie, la protoporphyririe érythropoïétique dominante liée à l'X (PPEDLX) cliniquement similaire à PPE a été découverte en 2008, impliquant une suractivité de l'enzyme ALAS2 responsable d'une surproduction d'ALA tout en ayant une activité FECH normale <sup>134</sup>.

### **G- Caractéristiques physiopathologiques et histopathologiques de la PPE**

Les manifestations cliniques de PPE sont dues à l'accumulation érythrocytaire de PPIX libre en raison de l'activité déficiente de l'enzyme ferrochélatase (10-35% de l'activité enzymatique normale-(Fig.20)). L'accumulation de PPIX libre principalement dans les érythrocytes et secondairement dans d'autres tissus (la peau, le foie) ou des liquides biologiques (la bile, les

selles), conduit à une photosensibilité douloureuse et des complications hépatiques potentielles. La molécule protoporphyrine libre est sensible au rayonnement visible de la lumière bleue-violette principalement à 405 nm (la bande de Soret). L'absorption de cette longueur d'onde augmente le contenu d'énergie de la protoporphyrine (en induisant un état triplet) et l'excès d'énergie est transféré à l'oxygène en produisant des espèces réactives de l'oxygène, qui peuvent interagir avec de nombreuses molécules biologiques telles que les protéines, les lipides, l'ADN et le complément responsable de l'induction d'une réaction inflammatoire chez les patients atteints de PPE <sup>128, 135, 136</sup>.

Indépendamment des réactions photosensibilisantes, la PPIX est fortement toxique car elle est strictement lipophile et sa voie d'élimination est uniquement hépatique. Lorsque la PPIX se lie à des composants biliaires, elle perturbe l'équilibre physiologique des phospholipides, des acides biliaires et du cholestérol dans la bile. Par conséquent, elle augmente les acides biliaires libres et toxiques qui sont responsables de la formation de cholangite sclérosante <sup>137</sup>. La régénération désordonnée des tissus, la fibrose hépatique et la cirrhose biliaire associée à la maladie biliaire sont à l'origine d'une insuffisance hépatocellulaire <sup>137, 138</sup>.



**Figure 20) Aperçu de la physiopathologie de la PPE.**

## **H- Caractéristiques cliniques**

### **1-Symptômes dermatologiques:**

La plus fréquente manifestation clinique de la PPE est la réaction phototoxique aiguë de la peau exposée au soleil <sup>139</sup>. La photosensibilité apparaît tôt dans l'enfance, mais dans de rares cas, les symptômes peuvent se manifester plus tardivement. La réaction phototoxique se produit quelques minutes après l'exposition au soleil et se manifeste par les symptômes cutanés tels que le picotement, le prurit et la brûlure dans la peau photo-exposée. La durée de manifestation de ces symptômes peut être variable en fonction de l'intensité et la durée de l'exposition au soleil et peut persister pendant plusieurs jours. Les épisodes de photosensibilisation répétés conduisent à l'apparition de lésions cutanées chroniques telles que l'épaississement lichéniforme de la peau avec une apparence cireuse ou tannée, et des zones d'hyperkératose. Les zones touchées sont le plus souvent le visage et le dos des mains, car ce sont des zones habituellement exposées, mais les réactions de photosensibilité peuvent également apparaître sur d'autres zones exposées. Les lèvres montrent des rides linéaires (Fig.21).



**Figure 21) Les lésions chroniques, les rainurages autour des lèvres**

### **2-Complications hépatiques**

La PPIX étant strictement lipophile n'est pas excrétée par les reins, mais est éliminée par le foie et excrétée dans la bile. De ce fait, des complications hépatiques peuvent apparaître et incluent : la lithiase biliaire de PPIX avec de possibles épisodes obstructifs qui est la complication la plus fréquente, une hépatite cholestatique et cytolytique chronique qui rarement évolue vers une insuffisance hépatique aiguë <sup>140</sup> (Fig.20). La progression de l'hépatite provoque la splénomégalie et la séquestration splénique des érythrocytes, une hémolyse, ce qui augmente l'érythropoïèse et aggrave la maladie. Environ 5-20% des personnes atteintes de PPE ont un certain degré du dysfonctionnement du foie. Les patients qui ont des mutations *FECH* sur les deux allèles ou une mutation "gain de fonction" d'*ALAS2* présentent un risque plus élevé de développer des maladies du foie.



Des études ont démontré qu'une augmentation de l'excrétion urinaire de coproporphyrine, avec un changement d'isomère III à isomère I, et l'augmentation des niveaux de PPIX érythrocytaire peut précéder cette complication <sup>139</sup>. Il est impossible de prédire pour chaque patient si une insuffisance hépatique aiguë apparaîtra ou non.

### **3-Complications hématologiques**

L'anémie microcytaire ou un taux normal bas d'hémoglobine est présente chez 20 % à 60 % des patients <sup>141,142</sup>. Le déficit en FECH chez les patients atteints de PPE, semble favoriser un état stable dans lequel une diminution de l'érythropoïèse serait due à une modification de l'homéostasie du fer avec rétention splénique. Cette réponse pourrait être médiée par l'intermédiaire de la PPIX <sup>143</sup>.

#### **I- Génétique de la PPE**

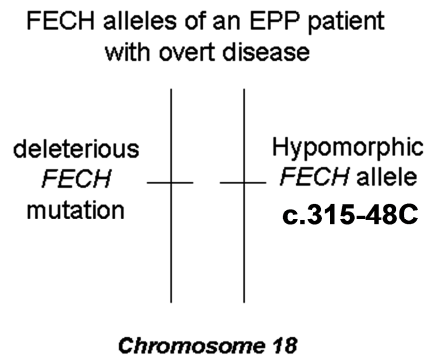
A de rares exceptions près, la PPE est une maladie héréditaire due à des mutations "perte de fonction" du gène *FECH* ou "gain de fonction" du gène *ALAS2*.

#### **1-Déficit en FECH**

Sur la base de dosages enzymatiques et l'analyse moléculaire des familles PPE, deux modes de transmission ont été démontrés à ce jour par le déficit en FECH.

Dans plus de 90 % des patients atteints de PPE, la transmission est décrite comme autosomique dominante à pénétrance incomplète. En fait, seule la transmission du déficit en activité FECH présente une transmission autosomique dominante par l'analyse des pédigrées; c'est-à-dire qu'on observe une transmission verticale du déficit en activité enzymatique. Par contre, quand on analyse la transmission du phénotype, on s'aperçoit que cette transmission répond plutôt à une transmission de type autosomique récessive. Cette contradiction entre la transmission du déficit enzymatique et la transmission du phénotype s'explique par le fait que le phénotype de PPE résulte de la co-ségrégation d'une mutation délétère sur un chromosome *FECH*, qui présente une mutation privée du gène *FECH*, associée en trans à un allèle hypomorphe c.315-48C, qui est une mutation commune dans la population générale observée environ dans 6% des caucasiens. L'association d'un allèle hypomorphe c.315-48C avec la mutation délétère privée en trans, fait baisser l'activité enzymatique FECH résiduelle en-dessous d'un seuil critique d'environ 35% qui entraîne la surproduction et l'accumulation de PPIX au niveau de la lignée érythroïde médullaire et donc la production des hématies contenant une quantité importante de PPIX. Il est néanmoins difficile de parler de la maladie à transmission autosomique récessive, car les sujets homozygotes pour l'allèle hypomorphe c.315-48C, ne présente aucun phénotype clinique particulier et présentent une tolérance au soleil normale bien qu'ils aient seulement 50% d'activité enzymatique FECH résiduelle au niveau lymphocytaire <sup>144,145,146</sup> (Fig.22).

### Mechanism operative in 95% of EPP families

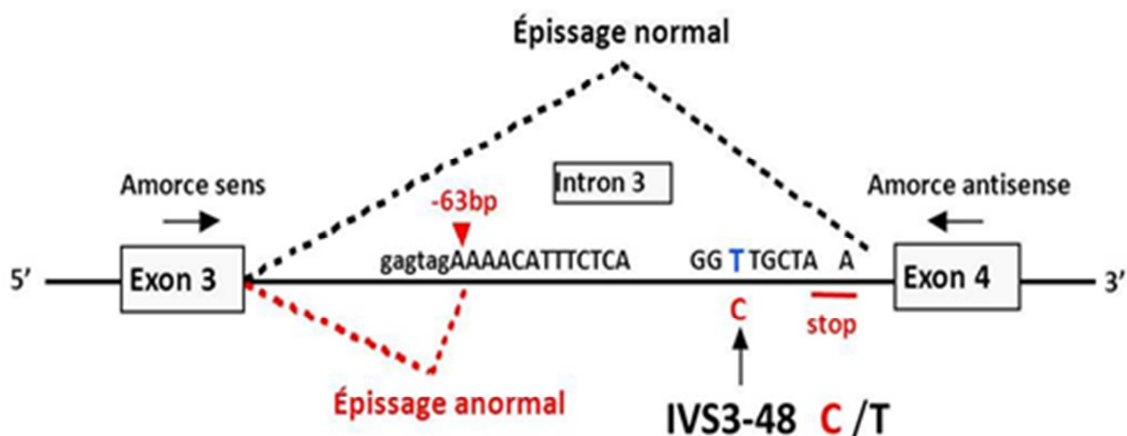


**Figure 22) Co-transmission d'une mutation *FECH* délétère en trans d'allèle hypomorphe c.315-48C.**

Un polymorphisme intronique commun, c.315-48T > C (SNP : rs2272783), situé dans l'intron 3 à proximité de jonction de l'intron3-exon4 entraîne la modulation d'utilisation d'un site cryptique d'épissage situé en position -63 dans l'intron et est responsable de la faible expression de l'allèle hypomorphe. En présence d'un allèle C, l'utilisation d'un site cryptique accepteur d'épissage alternatif est favorisée par rapport au site physiologique et cela entraîne la production d'un ARNm plus long de 63 bp et instable par l'apparition d'un codon STOP prématuré. L'ARNm épissé de façon anormale est ensuite dégradé par le mécanisme de dégradation des ARNm non-sens (NMD), produisant un niveau faible d'ARNm *FECH* (Fig.23). Ce mode de transmission a été démontré en France <sup>145</sup> initialement et a été également confirmée par des études effectués au Japon <sup>147</sup>, en Chine <sup>148</sup>, en Amérique du Nord <sup>149</sup>, en Suède <sup>150</sup>, en Israël <sup>151</sup>, en Afrique du Sud <sup>152</sup> et au Royaume-Uni <sup>153</sup>.

Plus de 120 mutations délétères, y compris des mutations non-sens, faux-sens, d'épissage, des délétions et des insertions, ont été identifiées dans le gène *FECH* chez les familles atteintes de PPE <sup>154</sup> (Human Gene Mutation Database, Cardiff). Les mutations sont caractérisées par une forte hétérogénéité allélique.

Les mutations somatiques acquises du gène *FECH* ont été identifiées chez un petit nombre de patients pour lesquels la PPE a été développé après l'âge de 40 ans en association avec une myélodysplasie ou d'un trouble myélo-prolifératif <sup>155,156</sup>.



**Figure 23) Représentation schématique de l'épissage dans l'exon3-exon4 du gène *FECH*.**

Le polymorphisme intronique c.315-48T/C est situé dans l'intron 3, à proximité de jonction de l'intron3-exon4, et entraîne la modulation d'utilisation de site cryptique d'épissage situé en position -63. En présence d'allèle c.315-48C, l'utilisation du site cryptique accepteur d'épissage alternatif est favorisée par rapport du site physiologique et cela entraîne la production d'un ARNm plus long de 63bp et instable par l'apparition d'un codon STOP prématuré. L'ARNm épissé de façon anormale est ensuite dégradé par le mécanisme de dégradation NMD.

### J- Épidémiologie de la PPE

La protoporphyrie érythropoïétique est considérée comme la forme la plus commune de porphyrie chez les enfants <sup>157</sup>. Elle est présente dans le monde entier, avec une prévalence pour l'Europe entre 1: 75.000 (Les Pays-Bas) et 1: 200.000 (Les Pays de Galles) <sup>158</sup>. Il a été démontré que la prévalence de la PPE dans une population est fortement influencée par la fréquence de l'allèle hypomorphe c.315-48C <sup>159</sup>. La fréquence de l'allèle hypomorphe dans le monde est variable : 7% (France), 8 % (Suède), 7% (Suisse), 6,5% (Royaume-Uni), 5% (Espagne) et 1% (Italie), 45% (Japon) et cela nous permet probablement d'expliquer les variations de l'incidence et la prévalence de la PPE dans ces pays <sup>160,161</sup>.

La différence de la fréquence des allèles mutants délétères du gène *FECH* pourrait également moduler la prévalence de la PPE dans certaines conditions, comme en cas d'effet fondateur avec dérive génétique, comme cela a été rapporté en Suisse ou au Royaume-Uni. Ainsi, la prévalence de la PPE pourrait être augmentée localement <sup>162,163</sup>.

### K- Diagnostic de la PPE

Le diagnostic est basé sur la mise en évidence d'un taux élevé de PPIX libre dans les érythrocytes et les fèces <sup>129</sup>. La mesure de la fluorescence des porphyrines dans le plasma montre un pic spécifique à 634 nm chez les patients symptomatiques, permettant le dosage spécifique des porphyrines. La mesure de PPIX libre érythrocytaire est le test biochimique le plus sensible et

spécifique pour le diagnostic de la PPE. L'activité enzymatique de FECH, mesurée dans les cellules nucléées, est réduite de 10 à 35 % de la valeur normale chez les patients symptomatiques et d'environ 50% chez les porteurs asymptomatiques <sup>145</sup>. Les études moléculaires pour trouver les mutations délétères et le polymorphisme c.315-48C/T dans le gène *FECH* confirment le diagnostic et permettent de réaliser l'enquête familiale <sup>159</sup>.

## **L- Traitement de la PPE**

A ce jour, Il n'existe pas un traitement étiopathogénique corrigeant la surproduction de PPIX chez les PPE.

### **1- Mesures préventives de la photosensibilité**

La protection contre les rayons du soleil, y compris la lumière ultraviolette à ondes longues est la principale mesure thérapeutique de la PPE.

- La protection contre le soleil en utilisant des vêtements de protection à manches longues, des gants et des chapeaux à larges bords <sup>164</sup>.
- Les crèmes solaires contenant un agent réfléchissant sont souvent efficaces, mais ne sont pas acceptables pour tous d'un point de vue esthétique. Certaines crèmes de bronzage qui favorisent la pigmentation de la peau peuvent être utiles <sup>165</sup>.
- Le  $\beta$ -carotène peut améliorer la tolérance au soleil si la dose est ajustée pour maintenir les niveaux de carotène sérique dans l'intervalle de 10-15  $\mu\text{mol/L}$  (600-800  $\mu\text{g/dl}$ ), provoquant une légère coloration orange de la peau en raison de caroténémie. Le  $\beta$ -carotène a une action antioxydant. Il est généralement utilisé, par voie orale, six à huit semaines avant l'été pour réduire la photosensibilité, cependant son efficacité reste limitée <sup>166</sup>.
- La photothérapie par UVB/NBUVB peut être utilisée pour induire le bronzage et améliorer la tolérance à la lumière du soleil <sup>167</sup>.
- L'afamelanotide, une hormone analogue de l' $\alpha$  MSH (alpha melanocyte stimulating hormone), induit la formation épidermique de la mélanine et a récemment obtenue une labellisation par l'EMA <sup>168</sup>. Ce médicament contenant 16 mg d'afamelanotide est administré de manière sous-cutanée en tant qu'un implant biodégradable à libération prolongée <sup>169</sup>.
- Les vitres protectives teintées (les filtres jaunes bloquant le rayonnement au-dessous de 460 nm) pour les voitures et les fenêtres afin d'empêcher l'exposition à la lumière.

- Les patients atteints de PPE peuvent présenter des réactions de photosensibilité pendant les interventions chirurgicales, principalement pendant la transplantation hépatique. Dans ces cas, l'utilisation des filtres jaunes est la meilleure protection <sup>170</sup>.

D'autres approches thérapeutiques comprennent l'administration de la vitamine C <sup>171</sup> et la cystéine (500 mg/deux fois par jour) par voie orale <sup>172</sup>. Les antihistaminiques peuvent également être utilisés car ils peuvent limiter la réaction phototoxique <sup>173</sup>.

## **2- Gestion des complications hépatiques**

En ce qui concerne la réduction de l'excès de PPIX chez les patients atteints de PPE, deux approches peuvent être envisagées :

**i-** La réduction de l'érythropoïèse qui peut être réalisée par les transfusions multiples <sup>174,175</sup>. Le fait que l'hématine (hème oxydé) puisse faire régresser temporairement l'érythropoïèse en modifiant l'activité de la première enzyme limitant de la voie de synthèse de l'hème, ALAS2, n'a pas été clairement démontré <sup>176</sup>. Cependant, cette approche ne peut pas être considérée comme un traitement à long terme de la maladie en raison des complications liées à une surcharge martiale qui outre la toxicité du fer pourrait aussi être un élément inducteur d'ALAS2 <sup>177</sup>.

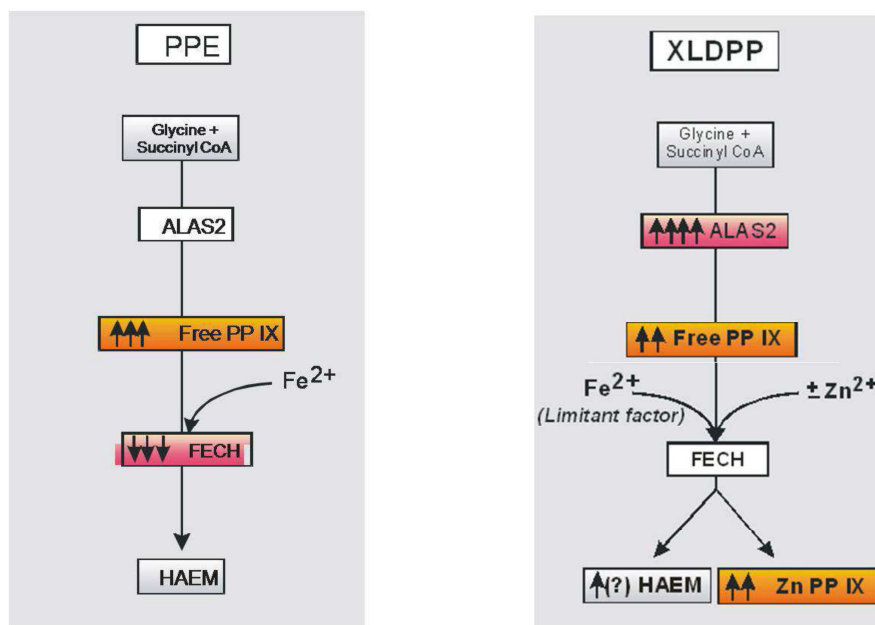
**ii-** L'augmentation de l'excrétion de PPIX est médiée par le cholestyramine <sup>178</sup> et d'autres absorbants de PPIX tel que le charbon activé <sup>179, 180</sup> qui entraîne l'interruption de la circulation entéro-hépatique de la protoporphyrine et son excrétion fécale.

Une fois que l'insuffisance hépatique est avancée, la transplantation est généralement le seul traitement susceptible d'assurer la survie <sup>180,181,182,183,184</sup>. La transplantation hépatique ne réduit pas la surproduction érythroïde de PPIX, par conséquent les patients atteints de PPE continuent à présenter des symptômes cutanés typiques avec un risque élevé de récurrence de la maladie du foie. Cela suggère que la co-transplantation du foie et la moelle osseuse ou la greffe préventive de la moelle osseuse après la réversion de la maladie du foie doivent être envisagés pour prévenir la rechute de la maladie du foie <sup>185</sup>.

Enfin, il est important de noter, d'un point de vue physiopathologique, qu'aucune de ces méthodes ne modifient durablement la surproduction et l'accumulation de PPIX et donc ne réduisent pas les risques liés aux complications hépatiques.

### 3- la porphyrie dominante liée à l’X (PPEDLX)

La protoporphyrie érythroïdique dominante liée à l’X (PPEDLX, MIM 300752) est une porphyrie liée à des mutations gain de fonction du gène *ALAS2*. La présentation clinique de PPEDLX est très similaire à celle de la PPE <sup>127</sup>. Le gain de fonction d’*ALAS2* conduit à l’accumulation de PPIX avec d’énormes quantités de PPIX dans les érythrocytes, dont environ 40 % est constituée de zinc-protoporphyrine (Fig.24). Les études d’expression chez les procaryotes révèlent que la région C-terminale d’*ALAS2* semble affecter l’activité enzymatique. Le retrait de région C-terminal par des mutations, conduit à un gain de fonction alors que tous les autres types de mutations décrites précédemment du gène *ALAS2* diminuent son activité et provoquent une anémie sidéroblastique héréditaire. Les traitements relatifs à la PPEDLX sont similaires à ceux qui concernent la PPE.



**Figure 24) Flux de la biosynthèse de l'hème dans les deux formes de PPE.** Colonne gauche : PPE due à une activité déficitaire en FECH. Colonne droite, PPDLX (ou XLDPP) due à une suractivité de l'ALAS2. Dans les deux cas, une accumulation de PPIX est observée. Dans le cas de la PPEDLX, une surproduction de zinc-protoporphyrine (Zn PPIX) est également présente.

### **III/ Thérapie génique de la maladie PPE**

A ce jour, il n'existe aucun traitement simple et sûr qui permette de réduire le taux de PPIX seul gage d'un effet sur la photosensibilité et le risque hépatique.

Puisque la PPIX provient principalement des cellules érythroïdes, la greffe de moelle osseuse peut être un traitement étiopathogénique efficace. Cependant, sa mise en œuvre et ses complications la rendent inadaptée à cette affection en dehors des rares cas où une transplantation hépatique est nécessaire pour éviter le risque élevé de récurrence sur le greffon hépatique. Une greffe autologue de la moelle osseuse génétiquement corrigée serait une alternative intéressante en l'absence d'un donneur compatible.

#### **1- Thérapie génique intégrative**

Dans une étude effectuée par Pawliuk et al en 1999<sup>186</sup>, la faisabilité d'un traitement à long terme de la photosensibilité a été démontrée dans un modèle murin PPE (BALB/C-Fech<sup>m1Pas</sup>).

Les souris BALB/C-Fech<sup>m1Pas</sup>, homozygotes pour une mutation faux-sens du gène *FECH*, sont caractérisées par un déficit profond en activité de l'enzyme ferrochélatase (moins de 6% de souris normales). Ces souris ont des taux élevés de PPIX dans les érythrocytes, le plasma, le foie et les selles et présentent toutes les caractéristiques cliniques observées chez les patients PPE humains, y compris la photosensibilité, l'anémie hémolytique, la cholestase et la dysfonction hépatique sévère<sup>187,188</sup>. Contrairement aux patients humains, toutes les souris BALB/C-Fech<sup>m1Pas</sup> développent des lésions hépatiques irréversibles<sup>187</sup>.

Pawliuk et al ont greffé les souris PPE par des cellules souches hématopoïétiques transduites auparavant par des vecteurs rétroviraux codant pour l'ADNc *FECH* WT et ce qui a permis de corriger le déficit en FECH et normaliser la production de PPIX et finalement la photosensibilité pendant au moins 7 mois après la greffe dans toutes les souris greffées<sup>186</sup>.

D'autres chercheurs ont également confirmé les résultats de Pawliuk en démontrant une correction complète ou partielle de la photosensibilité chez les souris PPE avec ou sans la présélection de cellules transduites<sup>189,190</sup>. La présélection s'appuie sur la mesure de la fluorescence par cytométrie en flux, suite à l'administration d'ALA exogène, un précurseur de l'hème, qui induit une augmentation de PPIX dans les cellules déficitaires en FECH<sup>189</sup>. Richard et al ont développé un vecteur lentiviral auto-inactivant contenant de l'ADNc *FECH* humain qui permet de réaliser la greffe sans utiliser la stratégie de présélection ou des marqueurs de transduction<sup>190</sup>.

Dans toutes ces études, la greffe de cellules souches hématopoïétiques WT ou génétiquement corrigée de PPE a abouti à une normalisation des taux sanguins de PPIX conduisant à un

traitement à long terme du phénotype photosensible. Par contre, l'amélioration du phénotype hépatique nécessite une greffe très précoce avant l'installation des lésions hépatiques <sup>191</sup>.

Une question non résolue est la place des différents tissus dans la production de PPIX. Un seul article a étudié la contribution de la PPIX hépatique et érythrocytaire à la pathophysiologie de la PPE. Suite à la transplantation de la moelle osseuse de souris malade BALB/C-Fech<sup>m1Pas</sup> à des souris normales, Pawliuk et al <sup>192</sup> ont observé que le niveau de PPIX érythrocytaire et plasmatique est fortement augmenté. La quantification des enzymes hépatiques du sérum et de la bilirubine ainsi que l'examen histopathologique de sections de foie de souris jusqu'à 16 mois après la greffe de moelle de souris PPE n'ont montré aucune preuve de lésions hépatiques. Ces résultats suggèrent étonnamment que l'activité normale ferrochélatase dans les cellules hépatiques et dermiques des souris WT est suffisante pour prévenir l'atteinte hépatique et une photosensibilité cutanée importante <sup>192</sup>. Ces résultats sont néanmoins en contradiction avec l'observation que la greffe d'un foie à un patient PPE se complique dans 60% des cas d'une récurrence de la maladie hépatique en moins de 10 ans.

Afin de démontrer de façon concluante que les taux normaux d'enzyme ferrochélatase produits dans la peau pourraient fournir un effet photoprotecteur significatif en dépit des niveaux élevés de PPIX érythrocytaire, Pawliuk et al ont effectué des greffes cutanées entre des souris BALB/C normales et des souris PPE. Un mois après les transplantations de peau saine chez des souris PPE ou de peau de souris PPE chez une souris saine, ils ont exposés les deux souris à une lumière calibrée pendant 20 mn. Les auteurs ont observé qu'en dépit d'une élévation massive de la PPIX érythrocytaire, la souris PPE transplantée par un greffon de peau saine a montré une absence de photosensibilité du greffon cutané. La souris BALB/C transplantée par un greffon de peau PPE n'a présenté aucun signe de la photosensibilité. Ces données valident l'hypothèse selon laquelle la principale source de PPIX toxique provient des érythrocytes (Fig.25) <sup>192</sup>.



**Figure 25) Le niveau normal de FECH exprimé dans la peau protégerait la souris contre la photosensibilité, modifié d'après Pawliuk et al, 2005 <sup>192</sup>.** Un mois après les greffes cutanées, les dos des souris ont été rasés, épilés et exposés 20 min à une lumière calibrée. Les zones du greffon cutané sont encadrées. La souris PPE recevant la greffe de peau de souris BALB/C a présenté des brûlures sur une grande zone du dos alors que dans la zone de la greffe de peau normale on observe l'absence de brûlures.

## **2- Thérapie génique non intégrative**

Les analyses génétiques révèlent chez près de 95% des patients PPE, la présence d'un allèle hypomorphe commun en trans d'une mutation *FECH* délétère <sup>159</sup>. Les patients ayant seulement un allèle *FECH* délétère sont asymptomatiques. Cette observation suggère que la correction de l'allèle hypomorphe commun responsable de l'épissage aberrant devrait être suffisante pour restaurer le phénotype normal chez plus de 90% des malades PPE.

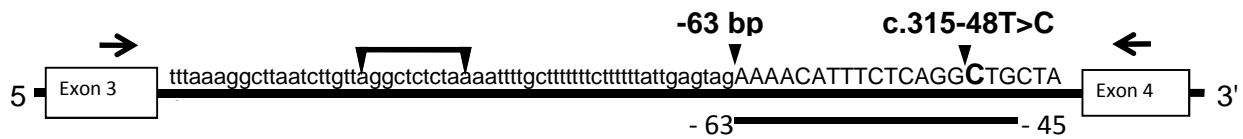
La thérapie génique intégrative est une approche prometteuse mais le risque de leucémogénèse insertionnelle souligne la nécessité d'un système plus sûr, en particulier pour une pathologie saisonnière et non létale telle que la PPE.

Plusieurs avantages à cette approche de thérapie génique non intégrative émergent :

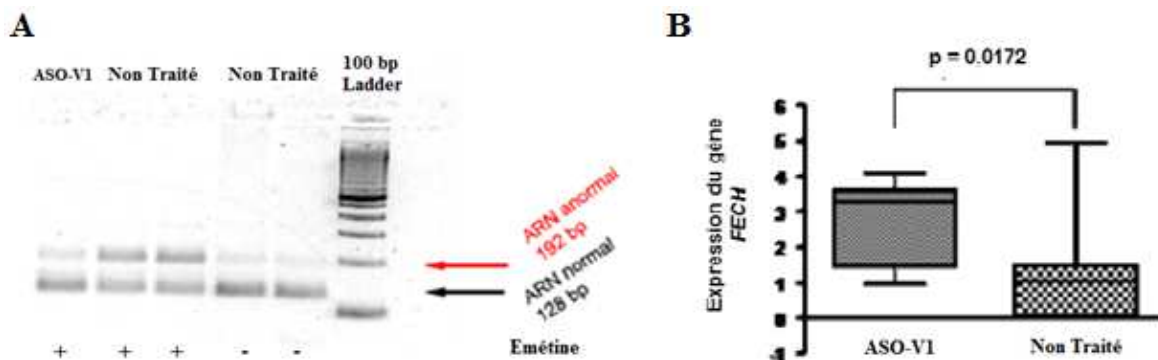
- 1- Le traitement peut n'être administré que de façon préventive et saisonnière
- 2- Le traitement peut être arrêté en cas d'effet adverse
- 3- Le globule rouge corrigé a une durée de vie de 120 jours prolongeant ainsi l'effet du traitement
- 4- La régulation physiologique de l'expression du gène *FECH* est conservée

Dans l'objectif de développer un traitement non intégratif pour la maladie PPE, Oustric et al <sup>193</sup> ont identifié un oligonucléotide antisens (ASO-V1) qui redirige l'épissage cryptique de l'intron 3

du gène *FECH* vers le site accepteur physiologique et augmente la production d'ARN *FECH* WT (Fig.26 et Fig.27).



**Figure 26) Emplacement de l'oligonucléotide antisens corrigeant l'anomalie d'épissage du gène *FECH*, modifié d'après Oustric et al, 2013<sup>193</sup>.** ASO-V1 cible le point de branchement de site cryptique (-97 à 116), le site accepteur d'épissage cryptique (-54 à 74) et le locus c.315-48 (-45 à 63). Les flèches horizontales représentent les positions des amorces de PCR utilisées pour l'analyse d'épissage. Le point de branchement théorique du site cryptique :

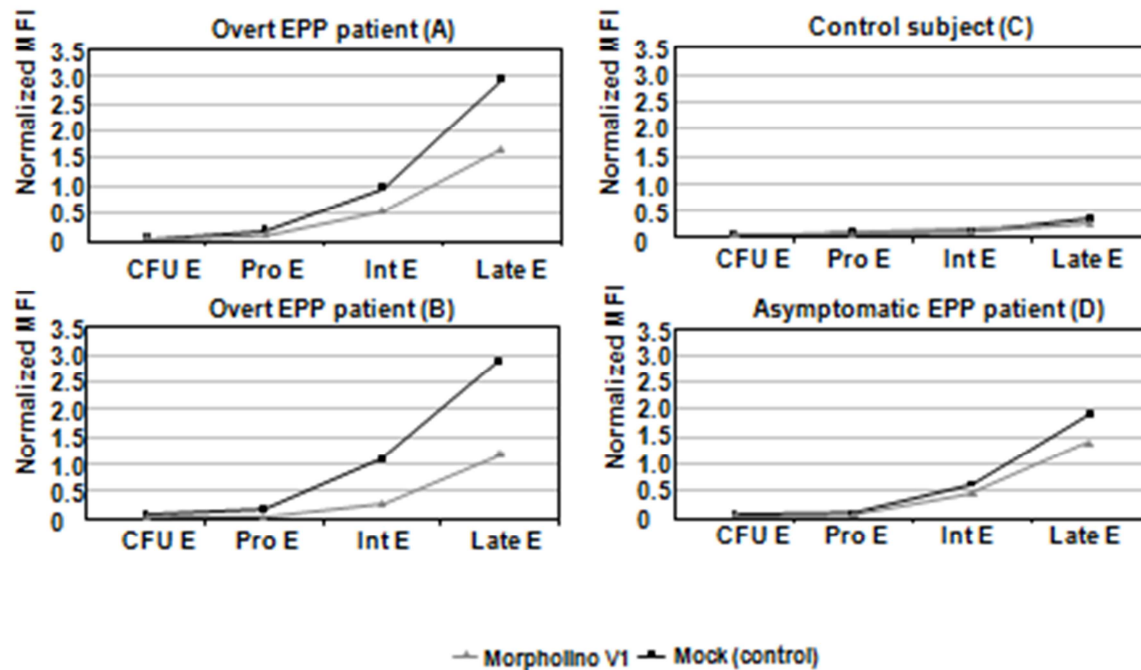


**Figure 27) Effet d'ASO-V1 transfecté par le lipofectamine 2000 dans des lignées lymphoblastoïdes issues de patients PPE, modifié d'après Oustric et al, 2013<sup>193</sup>.**

**A :** RT-PCR exon3-exon4 du gène *FECH* après la transfection des lignées lymphoblastoïdes (LBCL) de malades PPE avec ASO-V1. Les cellules traitées à l'émétine (un bloqueur de la traduction) à 30  $\mu$ M finale 3 H après la transfection sont indiquées + et celles n'ayant pas reçues d'émétine sont indiquées- en dessous de chaque colonne. Les ARNs sont extraits 24 H après. Les produits de RT-PCR sont analysés avec un gel d'agarose 3 % (p/v) et leur taille indiquée à droite.

**B :** qPCR relative du gène *FECH* faite sur les ARNs extraits 24 H après la transfection des LBCLs avec ASO-V1, sans éméline dans le milieu. Colonne ASO-V1 : transfectées avec V1. Colonne « Non Traité » : cellules non transfectées.

Ils ont en outre montré que l'utilisation de l'ASO-V1 de type morpholino, avec une administration régulière et une concentration finale de 45 $\mu$ M, dans des cultures primaires de cellules CD34+ de malades PPE permettait de réduire la quantité de protoporphyrine produite chez deux malades PPE de 44% et 58%, à un niveau comparable à ce qui est obtenu chez un porteur asymptomatique<sup>193</sup> (Fig.28). Cela suggère que cette approche pourrait être thérapeutique *in vivo*.



**Figure 28) Preuve de concept dans des progéniteurs érythroïdes de patients PPE modifié d'après Oustric et al, 2013<sup>193</sup>.** Cellules CD34+ périphériques transfectées par un ASO de type morpholino-V1 ou -Mock à J7 de la différenciation érythroïde. A et B: Patients PPE symptomatiques, génotype: M/ c.315-48C. C: Sujet contrôle ; D: Patient porteur asymptomatique, génotype: M/c.315-48C T.

#### **IV/Thérapie génique utilisant des oligonucléotides antisens**

Plusieurs approches thérapeutiques à base d'oligonucléotides antisens sont apparues au cours de ces dernières années, visant à altérer l'expression d'un gène ou à modifier l'épissage par différents moyens. Les oligonucléotides antisens sont des acides nucléiques modifiés, courts et synthétiques qui se lient à l'ARN via l'appariement de bases de Watson-Crick et modifient sa fonction. En fonction de la chimie et de la séquence, la liaison de l'oligonucléotide antisens peut entraîner une extinction génique post-transcriptionnelle ou la modulation du métabolisme de l'ARN (Fig.29). L'extinction génique se produit soit par le biais des mécanismes de dégradation, où l'ARN cible est éliminé par des nucléases endogènes, soit par des mécanismes non-dégradatifs où la liaison de l'oligonucléotide antisens inhibe la coiffe, l'épissage et la polyadénylation par encombrement stérique<sup>194</sup>.

#### **Figure 29) Mécanismes antisens, modifié d'après Southwell AL et al, 2012<sup>195</sup>.**

Les oligonucléotides antisens peuvent interagir avec des transcrits d'ARN comprenant à la fois un pré-ARNm dans le noyau et l'ARNm mature dans le cytoplasme. Ils peuvent cibler les séquences exoniques, introniques et les sites de la région non traduite (UTR, Untranslated Region). En fonction de la chimie et de la conception de l'oligonucléotide antisens, différents événements post-liaison peuvent être lancés, y compris la modulation de la maturation de l'ARNm (la coiffe, l'épissage et la polyadénylation), la dégradation médiée par RNase H et l'inhibition stérique de la traduction.

Les méthodes basées sur l'oligonucléotide antisens sont hautement spécifiques et peuvent être utilisés pour cibler un gène unique ou un groupe de gènes. Ces méthodes incluent les oligonucléotides antisens classiques (ASO, Anti-Sense Oligonucleotide), les oligonucléotides modifiant l'épissage (SSO, Splice Switching Oligonucleotide), les petits ARN interférents (siRNA, Small interfering RNAs), les microRNAs (miRNAs) et les anti-miRNAs (antimiRs) <sup>196</sup>.

## **6- Oligonucléotides modifiant l'épissage, SSOs**

Les oligonucléotides (ONs) dirigés vers le site d'épissage ou ses éléments régulateurs peuvent masquer des événements d'épissage normaux ou aberrants conduisant soit à l'exclusion ou à l'inclusion d'un exon.

Les sites d'épissage cryptiques, générées par des mutations qui conduisent à un épissage aberrant, peuvent être également ciblés par les SSOs complémentaire du site d'épissage indésirable. Ils couvrent le site accepteur cryptique et réorientent l'épissage vers le site accepteur physiologique <sup>197, 198</sup> (fig.30).

Depuis la première preuve de principe par la restauration de l'épissage d'un pré-ARNm *betaglobin* muté, responsable de l'apparition de la bêta-thalassémie, via des oligonucleotides antisens <sup>199</sup>, les ONs synthétiques sont devenus des outils intéressants pour moduler l'épissage dans un certain nombre de maladies telles que la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) <sup>200</sup>, l'Amyotrophie Spinale <sup>201</sup>, la Sclérose Latérale Amyotrophique <sup>202</sup>, la maladie de Huntington <sup>203</sup>, la maladie de Parkinson <sup>204</sup>, l'Hypercholestérolémie familiale <sup>205</sup> et l'Agammaglobulinémie liée au sexe <sup>206</sup>.

**Figure 30) Mécanismes de modulation de l'expression génique induite par l'oligonucléotide, modifié d'après Kole R et al, 2012<sup>207</sup>.**

ESE: Exonic Splicing Enhancer; ESS: Exonic Splicing Silencer. **a)** Un Oligonucléotide chimiquement modifié ciblé contre un site d'épissage ou une séquence ESE de l'exon d'un pré-ARNm empêche l'assemblage approprié du spliceosome sur l'exon et redirige l'épissage vers une autre voie en faisant sauter l'exon ciblé. **b)** Certains exons sont mal épissés, car ils contiennent des éléments ESS. Un SSO conçu pour bloquer un ESS interfère avec le rôle de cet élément dans l'épissage et favorise l'inclusion d'exon. **c)** Une mutation dans l'intron peut créer et/ou activer des sites d'épissage aberrants conduisant à l'inclusion d'un fragment intronique dans l'ARNm épissé et en créant un pseudo exon. Un SSO ciblé contre les éléments d'épissage aberrants restaure l'épissage correct et permet la traduction d'une protéine fonctionnelle.

## **7- Limitation à l'utilisation des oligonucléotides antisens**

La distribution systémique d'une molécule thérapeutique implique une série d'étapes incluant la circulation sanguine, l'extravasation, et l'absorption dans les cellules cibles dont chacune a son propre ensemble de contraintes<sup>208</sup>. De plus, le site d'action pour les différentes molécules d'acide nucléique réside dans des différents compartiments intracellulaires. Par conséquent, les molécules d'acide nucléique nues ont une biodisponibilité très limitée<sup>209, 210</sup> et pour

répondre à ce problème, différentes méthodes de distribution ont été développées. Les objectifs principaux de ces méthodes sont d'améliorer l'efficacité et la spécificité de l'entrée et l'accumulation de la molécule thérapeutique dans les cellules cibles, et de diminuer les effets secondaires indésirables liés à son action dans les tissus <sup>208</sup>.

### **8- Vectorisation d'oligonucléotides antisens**

Un vecteur est un véhicule qui permet le transport et l'internalisation de l'acide nucléique dans les cellules cibles. Un vecteur idéal devrait être très spécifique, capable de transférer efficacement la molécule thérapeutique tout en les protégeant contre les nucléases du sérum, sans être reconnu par le système réticulo-endothélial (RES) (Fig.31). Le système RES reconnaît les protéines plasmatiques liées aux nanoparticules en circulation et provoque leur captation par les RES tels que le foie, la rate et la moelle osseuse. En outre, un vecteur idéal devrait favoriser la diminution de l'excrétion rénale de la molécule thérapeutique. L'activation du système immunitaire innée médiée en particulier par les récepteurs TLRs (Toll-like Receptors) représente un effet secondaire indésirable important en raison des toxicités associées à la sécrétion excessive des cytokines et l'apparition des syndromes inflammatoires après l'administration systémique des vecteurs thérapeutiques <sup>211</sup>. Par conséquent, une fois introduit chez le patient, le vecteur idéal ne devrait pas induire une réaction allergique ou inflammatoire <sup>212, 213, 214</sup>. De plus, les vecteurs doivent extravaser de la circulation sanguine pour atteindre les tissus cibles et entraîner l'internalisation cellulaire de la molécule thérapeutique tout en favorisant son échappement endosomal (Fig.31).

**Figure 31) Les barrières membranaires limitant la distribution des acides nucléiques aux compartiments subcellulaires, modifié d'après Hao Yin et al, 2014<sup>215</sup>.**

Divers vecteurs peuvent être utilisés pour transférer les acides nucléiques. Ces vecteurs ne devraient pas être reconnus par les endonucléases du sérum et devrait échapper du système immunitaire. Ils doivent également éviter la clairance rénale et prévenir les interactions non spécifiques. De plus, ces vecteurs doivent extravaser de la circulation sanguine pour atteindre les tissus cibles. L'internalisation cellulaire et l'échappement endosomal sont également des facteurs majeurs qui affectent l'efficacité de vecteur.



A l'heure actuelle, les vecteurs utilisés en thérapie génique sont classés en deux catégories principales : **Viraux** et **Non Viraux**.

Les **Virus** peuvent être efficaces pour la distribution de matériel génétique aux cellules, car l'évolution les a optimisés dans ce but depuis des millions d'années. Récemment, en raison des progrès au niveau de la conception et la sûreté des vecteurs viraux, les approches virales de la thérapie génique ont largement été utilisées dans les essais cliniques pour de nombreuses maladies génétiques <sup>196</sup>. Cependant, en fonction du type de virus, ils conservent toujours une partie de leurs faiblesses inhérentes y compris l'immunogénicité potentielle, la tumorigénicité, leur capacité limitée pour le transport de gène et leur production complexe. D'autre part, les vecteurs viraux ne sont pas applicables à toutes les molécules à base d'acide nucléique car ils ne sont peu compatibles par exemple avec la distribution des courts oligonucléotides synthétiques. Par conséquent, dans le contexte d'une distribution efficace des oligonucléotides, l'accent a toujours été mis sur le développement des méthodes alternatives aux virus, les vecteurs non viraux <sup>196</sup>.

La stratégie de transfert du gène par les vecteurs **Non Viraux** comprend des méthodes physiques et chimiques (Fig.32). Les vecteurs chimiques sont plus fréquents que les méthodes physiques et sont basés sur de nombreuses classes de composés incluant les divers lipides cationiques, des polymères et des peptides <sup>216, 217, 196</sup>. Parmi eux, de petits peptides appelés les CPPs (Cell-Penetrating Peptides) suscitent un intérêt considérable.

**Figure 32) Différents systèmes pour le transfert de gènes, modifié d'après Nayerossadat N et al, 2012<sup>218</sup>.** Les vecteurs chimique non-viraux sont en général des complexes à base de l'ADN/lipide cationique (lipoplexes), l'ADN/polymère cationique (polyplexes) ou l'ADN/polymère cationique/lipide cationique (lipopolyplexes).

### **1- Cell Penetrating Peptides (CPPs)**

Les CPPs connus aussi sous les noms de PTDs (Protein Transduction Domain), sont de courtes séquences peptidiques possédant jusqu'à 30 acides aminés qui ont la capacité de traverser efficacement la membrane plasmique et d'introduire leurs cargos (les molécules thérapeutiques) dans les cellules d'une façon non toxique<sup>219</sup>. Notamment, ils ont démontrés un excellent potentiel pour la distribution des acides nucléiques allant des courts oligonucléotides naturels ou synthétiques a base d'ARN ou ADN jusqu'aux grandes molécules plasmidiques, à la fois *in vitro* et *in vivo*<sup>196, 220</sup>.

#### **A- Origine des CPPs**

Les premières indications que certaines protéines sont capables de traverser la membrane cellulaire ont d'abord été observées il y a environ 30 ans, lorsque TAT, la protéine trans-activatrice de la transcription, codée par le virus de l'immunodéficience humain de type 1 (HIV-1), a démontré la capacité de pénétrer dans les cellules, et même dans le noyau

cellulaire <sup>221, 222</sup>. L'homéodomaine de la protéine Antennapedia de la mouche du vinaigre, Antp <sup>223</sup>, et une protéine dérivée du virus de l'herpès, VP22 <sup>224</sup>, ont été montrés avoir les mêmes propriétés. Ces découvertes ont été suivies par l'identification des séquences minimums nécessaires pour la translocation de la protéine <sup>225, 226</sup> et ont abouti à la caractérisation d'un large éventail de CPPs naturels et synthétiques.

## **B- Classification des CPPs**

Il y a une grande variété de CPP en termes de composition d'acides aminés et les degrés de polarité. Bien que la plupart de CPPs sont chargés positivement avec une charge moyenne de +5 <sup>227</sup>, la capacité de traverser la membrane a également été mis en évidence pour les peptides anioniques <sup>228</sup>. Les CPPs peuvent être divisés essentiellement en trois classes selon leurs propriétés physico-chimiques : cationiques, amphipathiques et hydrophobes <sup>229</sup>.

### **iv- CPPs cationiques**

Les CPPs cationiques contiennent des clusters de résidus chargés positivement, principalement l'arginine et la lysine, qui sont essentiels pour leur absorption cellulaire <sup>229</sup>. Leur structure secondaire n'a pas un impact direct sur leur absorption cellulaire <sup>230</sup>.

Ces peptides interagissent peu avec les lipides membranaires mais interagissent essentiellement avec les composants anioniques de la membrane cellulaire tels que les glycosaminoglycanes (GAGs) <sup>231, 232</sup>. Les GAGs sont exprimés de façon ubiquitaire sur les surfaces des cellules et sont impliquées dans la signalisation, la régulation et la liaison cellulaire.

Des études effectuées sur les différentes longueurs de poly-arginines ont démontré que le nombre minimal de résidus d'arginine nécessaire pour favoriser l'internalisation cellulaire est de 8. Augmenter le nombre de résidus d'arginine améliore l'internalisation cellulaire mais augmente également la toxicité. Les poly-arginines les plus souvent étudiés sont R8 et R9. L'efficacité de pénétration cellulaire des Poly-arginines est supérieure à celles des poly-lysines <sup>233</sup>.

**Tableau 2) Exemples des peptides cationiques, modifié d'après Maliha Zahid, 2015 <sup>234</sup>**

#### **v- CPPs amphipathiques**

Les CPPs amphipathiques se composent de parties hydrophiles et hydrophobes, peuvent être subdivisés en peptides amphipathiques primaires et secondaires <sup>229</sup>. La plupart des CPPs amphipathiques sont cationiques, contenant des acides aminés chargés positivement (lysine et/ou arginine), et de nombreux résidus hydrophobes tels que la leucine, l'alanine, la valine, etc. Cependant, dans certains cas, la substitution des acides aminés cationiques avec d'autres résidus polaires conserve la capacité de transduction cellulaire du peptide si l'amphipathicité est conservée <sup>235</sup>.

**Tableau 3) Exemples des peptides amphipathiques, modifié d'après Julia Durzynska et al, 2015 <sup>236</sup>.** WSQ est un domaine "Spacer" qui sépare les motifs hydrophiles et hydrophobes.

##### **• CPPs amphipathiques primaires**

Les CPPs amphipathiques primaires contiennent des domaines séquentiels cationiques et hydrophobes dans le cadre de leur structure primaire. Ces peptides sont généralement constitués de plus de 20 résidus d'acides aminés avec seulement quelques résidus basiques. Les CPPs amphipathiques primaires se lient fortement aux lipides neutres et anioniques de la membrane, ce qui suggère que les interactions hydrophobes dominent dans leurs interactions membranaires <sup>237</sup>.

- **CPPs amphipathiques secondaires**

Les propriétés de CPPs amphipathiques secondaires lors de leur interaction avec la membrane cellulaire résultent d'un état conformationnel permettant la présentation de résidus hydrophobes et hydrophiles sur les faces opposés de la molécule et la création des structures secondaires en hélice  $\alpha$  ou des feuillets  $\beta$  <sup>238</sup>. En raison des interactions électrostatiques, les CPPs amphipathiques secondaires ont une plus grande affinité pour les membranes anioniques que les membranes électriquement neutres<sup>237</sup>. Certains CPPs amphipathiques peuvent être considérés à la fois primaires et secondaires, comme par exemple Transportan 10 (TP10, AGYLLGKINLKALAALAKKIL), qui contient des blocs hydrophobes et hydrophiles dans sa séquence, mais forme également une structure amphipathiques en hélice  $\alpha$  <sup>239</sup>.

- vi- **CPPs hydrophobes**

Les CPPs hydrophobes ont une charge nette faible et contiennent uniquement des résidus non polaires ou des motifs hydrophobes qui sont cruciaux pour leur internalisation. Certains CPPs hydrophobes peuvent directement se déplacer à travers des lipides de la membrane, ce qui pourrait être avantageux car le risque du piégeage dans les vésicules endosomales pourrait être diminué <sup>240</sup>.

**Tableau 4) Exemples des peptides hydrophobes, Modifié d'après Guo Z et al, 2016 <sup>241</sup>.**

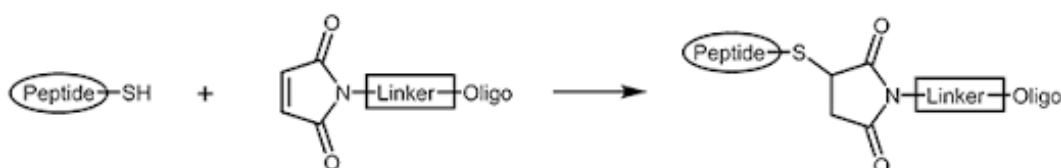
- C- **Stratégies de vectorisation des acides nucléiques par les CPPs**

L'acide nucléique peut être conjugué au CPP de manière covalente ou non-covalente.

- iii- **Conjugaisons covalentes**

La première méthode de vectorisation des oligonucléotides par les CPPs implique la synthèse chimique des peptides modifiés capables d'établir des conjugaisons covalentes avec des oligonucléotides (Fig.33). Il existe de nombreuses stratégies de conjugaison covalente y compris le thioéther, le thiol-maléimide et la formation d'ester <sup>242</sup>. Un avantage important de

l'approche de conjugaison covalente est qu'il donne une molécule CPP-acide nucléique avec une structure définie et stœchiométrie <sup>244</sup>. Cependant, cette approche est, en principe, limitée à la vectorisation des oligonucléotides neutres en particulier les PNAs (Peptide Nucleic Acid) et les PMOs (Phosphorodiamidate Morpholino). Bien que les CPPs conjugués aux oligonucléotides chargés ont été, et sont encore, rapportés dans la littérature, mais il est très compliqué de purifier ces conjugués et même lorsqu'ils sont purifiés, ils sont susceptibles de former des complexes en raison des interactions entre les oligonucléotides anioniques et les CPPs cationiques.



**Figure 33) Exemple d’une conjugaison covalente de type thiol-maléimide entre le vecteur peptidique et l’oligonucléotide**

L'acide nucléique doit être libéré une fois internalisé, afin d'obtenir son effet biologique souhaité. Pour atteindre cet objectif, en cas d'utilisation de conjugués covalents CPP/acide nucléique, des ponts biodégradables doivent être utilisés. L'une des stratégies les plus couramment utilisés est la conjugaison par l'intermédiaire d'un pont disulfure <sup>244,245</sup>, car il reste suffisamment stable dans le milieu extracellulaire et est clivé une fois atteint les compartiments intracellulaires réducteurs, en particulier le cytosol <sup>244</sup>.

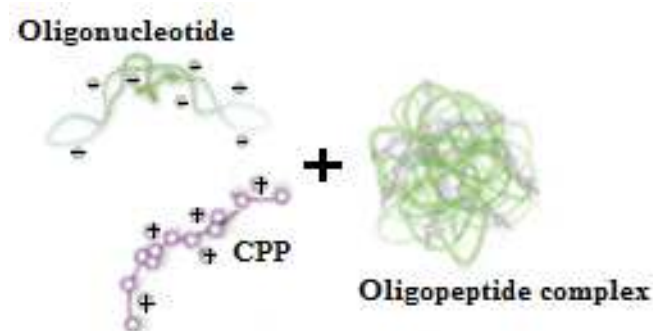
L'approche covalente est plus chère et plus laborieuse par rapport à la préparation des complexes de manière non-covalente, où l'acide nucléique est associé au CPP par une simple co-incubation.

**Tableau 5) Exemples de CPPs conjugués directement aux oligonucléotides et leurs applications, Taavi Letho 2016 <sup>196</sup>.**

#### iv- conjugaisons non-covalentes

La deuxième méthode de transfert des oligonucléotides médié par les peptides exploite les propriétés complexantes des CPPs et leur dérivés (Fig.34). La stratégie de conjugaison non-covalente peut être utilisée pratiquement pour toutes les molécules chargées négativement tels que les ASOs, les siRNAs et les ADN plasmidiques. Trois types d'interactions se produisent principalement entre les CPPs chargés positivement et les oligonucléotides chargés négativement- des liaisons électrostatiques, hydrophobes et hydrogène. Les avantages d'une complexation non-covalente sont la préparation facile des nanocomplexes, les ratios variables du CPP à l'acide nucléique permettant d'augmenter proportionnellement la quantité d'oligo thérapeutique et la préservation des activités intrinsèques du CPP et de l'acide nucléique. En outre, en cas d'utilisation de nanocomplexes non-covalents, les acides nucléiques sont protégés contre la dégradation par des nucléases dans le milieu extra- et intracellulaire, et leur demi-vie est nettement augmentée <sup>246</sup>.

En cas de conjugaison de type non-covalent, il faut optimiser empiriquement le ratio de charge entre le peptide et l'oligonucléotide pour obtenir la meilleure efficacité de transfection cellulaire.



**Figure 34) La formation du nanocomplexe entre les peptides et l'oligonucléotide par le biais des interactions électrostatiques, ou hydrophobes et/ou de l'hydrogène.**

L'élimination des nanoparticules de la circulation sanguine dépend fortement de leurs tailles et leurs propriétés de surface. La clairance rénale et l'excrétion urinaire très rapide sont démontrées pour les petites particules de diamètre hydrodynamique inférieur à 5 nm <sup>247</sup>. D'autre part, les nanoparticules ayant un diamètre hydrodynamique de plus de 200 nm présentent typiquement une opsonisation rapide et une absorption ultérieure par le système phagocytaire mononucléaire et seront séquestrés par le foie et la rate <sup>248</sup>. L'opsonisation des nanoparticules peut être réduite en modifiant leur surface par certaines molécules telles que le

polyéthylène glycol (PEG), qui protège leur charge et diminue les interactions non spécifiques avec les protéines plasmatiques <sup>249</sup>.

**Tableau 6) Exemples de nanocomplexes CPP/oligonucléotide et leurs applications, modifié d'après Taavi Letho 2016 <sup>196</sup>.**

#### **D- Mécanisme d'internalisation des nanocomplexes CPP/acide nucléique**

Les mécanismes d'internalisation cellulaire des CPPs et leur cargo biomoléculaire associé a été un sujet de controverse. Dans un premier temps, il a été considéré que le mécanisme d'internalisation des CPPs est indépendant de récepteurs et est censé être initiée par la liaison des CPPs aux glycoprotéines de la membrane contenant des groupes chargés négativement tels que les GAGs. Les groupes chargés négativement de GAGs comprennent des carboxylates et les sulfates. Les Héparanes Sulfates (HS) ont été identifiés comme une fraction glucidique importante facilitant l'absorption des peptides cationiques <sup>250,251</sup>. Cependant, des études ultérieures ont révélé des défauts techniques majeurs dans les expériences d'internalisation qui utilisaient la procédure de fixation après l'incubation des cellules avec le CPP marqué par un fluorophore, car la fixation des cellules a modifié artificiellement la distribution subcellulaire des CPP dans les cellules <sup>252</sup>.

Actuellement, deux voies mécanistiques distinctes de l'internalisation des CPPs prédominent: la voie de translocation directe indépendante de l'énergie et la voie d'endocytose dépendante de l'énergie (Fig.35) <sup>252, 227, 238</sup>. Les CPPs peuvent entrer dans les cellules à la fois par l'endocytose et la translocation directe <sup>253</sup>, alors que les nanocomplexes CPP/oligonucléotide utilisent principalement la voie d'endocytose. Les mécanismes d'internalisation de nanocomplexes CPP/acide nucléique, similaire à l'internalisation du CPP seul, dépendent



d'une multitude de facteurs tels que les propriétés physico-chimiques du peptide et du cargo, de la concentration locale de peptides, de la composition de la membrane cellulaire et certains facteurs expérimentaux<sup>253, 227</sup>.

**Figure 35) Mécanismes d'entrée de CPPs dans les cellules cibles. Modifié d'après Julia Durzyńska et al, 2015<sup>236</sup>.** (A) Les mécanismes impliquant l'invagination de la membrane cellulaire : 1) Phagocytose 2) Macropinocytose 3) Endocytose dépendante de la clathrine 4) Endocytose dépendante de la cavéoline 5) Endocytose indépendante de la clathrine ou de la cavéoline. (B) Mécanismes d'internalisation directe de CPPs dans les cellules : 6) La formation des pores, 7) L'amincissement de la membrane, 8) Le modèle micellaire inversé, 9) le modèle de "carpet-like", 10) La translocation directe.

- **Voie de translocation directe indépendante de l'énergie**

Plusieurs modèles de translocation directe de peptides ont été proposés tels que le modèle de formation des pores, le modèle micellaire inversé, le modèle de "carpet-like" et le modèle d'amincissement de la membrane<sup>238</sup>. Une caractéristique commune à la plupart de ces

modèles est que les CPPs se lient d'abord à la membrane cellulaire via des interactions électrostatiques ou hydrophobes et induisent une déstabilisation rapide ou prolongée de la membrane, conduisant à l'entrée du CPP dans les cellules. Le coefficient d'internalisation est relatif à la concentration du peptide, à la séquence peptidique et à la composition lipidique dans chaque modèle cellulaire.

Les peptides riches en arginine pénètrent dans la membrane plasmique par la formation d'une micelle inversée à l'intérieur de la bicouche lipidique <sup>241</sup>.

- **Voie d'endocytose dépendante de l'énergie**

L'endocytose est un processus naturel qui se produit dans toutes les cellules et se compose de plusieurs voies y compris la phagocytose pour l'absorption de particules solides et la pinocytose pour l'absorption de solutés et qui concerne l'internalisation des CPPs le plus souvent. La pinocytose inclue la macropinocytose, l'endocytose dépendante de la clathrine, de la cavéoline ou l'endocytose indépendante de la clathrine et de la cavéoline.

La **macropinocytose** est associée au pliage vers l'intérieur de la surface externe de la membrane plasmique qui est dépendante de la dynamine et qui conduit à la formation des vésicules appelées les macropinosomes. Les macropinosomes formées sont entourés par une bicouche lipidique similaire à la membrane cellulaire.

Dans l'**endocytose médiée par un récepteur**, la clathrine ou la cavéoline couvrent la partie intracellulaire de la membrane et sont nécessaires pour l'invagination de la membrane et aident à former des vésicules après la liaison de la molécule extracellulaire au récepteur membranaire <sup>254, 255</sup>. De nombreux groupes ont proposé que les protéoglycanes à héparane sulfate de la membrane cellulaire agissent comme des récepteurs pour l'absorption de CPPs extra cellulaire <sup>256</sup>.

Toutes les voies endocytaires sont des processus dépendants de l'énergie et peuvent être inhibées à la fois à basse température et en présence des inhibiteurs de l'ATPase qui est un élément essentiel dans la régulation du pH endosomal <sup>257</sup>.

Des études physicochimiques récentes sur les nanocomplexes CPP/ON ont montré que le nanocomplexe PepFect14/siRNA contiennent une charge nette négative. Cela va à l'encontre des attentes pour les nanocomplexes avec des CPPs cationiques qui pouvaient interagir directement avec la membrane plasmique chargé négativement. Finalement, Ezzat et al ont suggéré que le mécanisme d'internalisation de telles nanoparticules est médié par les récepteurs Scavenger Receptor Class A (**SCARA**) <sup>258</sup>. Les récepteurs Scavenger sont membres d'un groupe de récepteurs transmembranaires qui reconnaissent des lipoprotéines

extracellulaires de faible densité et les macromolécules anioniques et favorisent leurs internalisations cellulaires.

### **E- Echappement endosomal**

Puisque les nanocomplexes CPP/ON sont internalisés par endocytose, dans une large mesure, ils sont séquestrés dans le compartiment endolysosomal. La plupart des particules sont soit dégradées ou expulsées par exocytose. Ainsi, la concentration efficace de molécules capables d'exercer un effet biologique sur les processus biologiques des cellules ciblées est considérablement inférieur à la dose administrée et l'échappement endosomal constitue donc un axe majeur d'amélioration de l'efficacité de transfection.

Selon le temps d'apparition des marqueurs endocytaires, les endosomes sont classés en compartiments précoces ou tardifs. La maturation des endosomes est définie par un changement de pH intra-vésiculaire, de 6.0-6.5 dans les endosomes précoces à 4.5-5.5 dans les endosomes tardifs et les lysosomes (Fig.36) <sup>259</sup>. La maturation des endosomes est également associée à une augmentation de la taille, les changements dans la composition ionique (par exemple augmentation de la concentration d'ions Cl<sup>-</sup>), un gain d'hydrolases et une augmentation du nombre de vésicules intra-luminales (constituant des corps multi-vésiculaires) <sup>260</sup>.

**Figure 36) La route de l'endocytose médiée par un récepteur, modifié d'après Alexander Sorkin and Mark vonZastrow, 2002** <sup>259</sup>. Les molécules endocytosées peuvent être recyclées à la membrane plasmique à partir des endosomes précoces ou tardifs et, par conséquent, participer à plusieurs cycles d'endocytose. Le pH intravésiculaire diminue le long de la voie endocyttaire, de pH 6.0-6.5 dans les endosomes précoces à pH 4.5-5.5 dans les endosomes tardifs et les lysosomes. Les enzymes lysosomales et d'autres molécules sont délivrées de l'appareil de Golgi aux endosomes et à la membrane plasmique par la clathrine ou d'autres types de transport de membrane.

Plusieurs stratégies ont été développées pour faciliter l'échappement endosomal. Les stratégies ressemblant à celles utilisées par les virus, certaines plantes et des toxines bactériennes <sup>261, 262, 263</sup> ont été employées avec un certain succès. Des approches réussies incluent l'augmentation de la capacité d'interaction des peptides avec les membranes en ajoutant des composés hydrophobes (par exemple les acides gras et le cholestérol), les séquences peptidiques fusogènes dérivées de domaines endosomolytiques de virus (par exemple le domaine HA2 du virus Influenza A) <sup>264</sup>, les entités photo-inductibles <sup>265,266</sup> et l'incorporation des agents interférant avec l'acidification des endosomes tout en favorisant l'effet d'éponge à proton <sup>267,268,196</sup> (telle que la chloroquine avec une concentration élevée >100  $\mu$ M ; Fig.37).

**Figure 37) Favorisation d'effet d'éponge à proton par les polymères protonnables, modifié d'après Wanling Liang and Jenny K. W. Lam 2012 <sup>269</sup>** (A) Les polyplexes entrent dans la cellule par l'endocytose et sont piégés dans les endosomes. (B) Les pompes à protons ATPase liées à la membrane transfèrent activement les protons dans les endosomes. Les polymères deviennent protonnés et résistent à l'acidification des endosomes. (C) L'action de pompage du proton est suivie par l'entrée passive d'ions chlorures, l'augmentation de la concentration ionique et donc l'afflux d'eau. Une pression osmotique élevée provoque le gonflement et la rupture des endosomes, libérant leur contenu dans le cytosol.

**Tableau 7) Exemples des modifications favorisant l'échappement endosomal des CPPs et d'ONs, modifié d'après Carmine Pasquale Cerrato 2016<sup>270</sup>.**

#### **F- Adressage ciblé de nanocomplexes CPP/oligonucléotide**

La stratégie de transfert des acides nucléiques par les peptides présente plusieurs avantages tels que la facilité de synthèse, la faible immunogénicité, la biocompatibilité et la biodégradabilité *in vivo*. Pourtant le manque de spécificité d'adressage cellulaire pourrait limiter leur utilisation *in vivo* en raison de la toxicité qui pourrait être exercée sur certains tissus et la diminution de la biodisponibilité pour le tissu cible à cause de la dilution de l'effet des nanocomplexes dans l'ensemble des tissus et cellules qui leurs sont accessibles<sup>271</sup>. Une solution face à ce problème consiste soit à concevoir des CPPs conjugués à des ligands qui favorisent des interactions spécifiques avec les cellules ou tissus cibles, soit à utiliser la stratégie de pro-médicament où le CPP modifié est activé par les conditions environnementales (Enzymes, pH, etc.) du tissu ciblé.

Pour avoir un ciblage très spécifique, il est possible de conjuguer l'acide nucléique ou son vecteur à un ligand comme un peptide qui reconnaît sélectivement un récepteur à la surface cellulaire. Idéalement, il faut cibler un récepteur qui possède plusieurs caractéristiques : être exprimé essentiellement dans un seul tissu et à haut niveau, être rapidement et efficacement internalisé et enfin disposer de ligands de haute affinité. Pour finir, il est important que le récepteur ciblé par le CPP soit co-exprimé simultanément avec le gène intérêt en particulier si l'objectif est modifier l'épissage ou l'expression du gène.

Compte tenu du grand nombre de CPPs identifiés à ce jour ainsi que le grand nombre de cellules et de tissus à transduire, il est impossible de donner un résumé complet de tous les véhicules peptidiques bifonctionnels désignés jusqu'à présent. Nous allons donc citer brièvement quelques exemples intéressants de CPP R9 en conjugaison covalente avec des peptides ou un anticorps spécifiques à certains tissus pour qui les tests d'efficacité de transfert d'acide nucléique ont été effectués *in vivo*.

**1-**Dans une approche très intéressante, **Kumar et al** ont utilisé un peptide dérivé d'une glycoprotéine du virus de la rage (RVG, Rabies Virus Glycoprotein) qui permet une administration ciblée à travers la barrière hémato-encéphalique pour atteindre le cerveau. Ce peptide de 29 acides aminés reconnaît spécifiquement le récepteur de l'acétylcholine exprimé par des cellules neuronales. Pour permettre la formation d'un nanocomplexe avec un siRNA ciblant le gène murin codant la Cu/Zn superoxyde dismutase (SOD-1), ils ont, en outre, synthétisé un peptide chimérique composé de la partie RVG et une partie CPP de type R9 (oligo-D-arginine). Ces nanocomplexes RVG-R9/siRNA ont démontré une excellente aptitude à induire l'inhibition de l'expression du gène dans le cerveau lors d'une administration systémique et par conséquent la protection des souris contre l'encéphalite virale mortelle. En plus, l'administration répétée de nanocomplexes RVG-R9/siRNA n'a pas induit des cytokines inflammatoires ou des anticorps anti-peptidiques<sup>272</sup>.

**2-**Dans une étude ultérieure, **Kumar et al** ont utilisé un anticorps spécifique anti-CD7, présent à la surface des lymphocytes T, lié à un CPP R9. Dans plusieurs études de distribution systémique effectuées dans un modèle murin humanisé d'HIV, ils ont montré comment le nanocomplexe formé avec des siRNAs ciblant différents gènes importants pour l'infection par le HIV étaient capable de contrôler la réplication virale, d'empêcher la perte des cellules T associées à l'infection par le HIV et de réprimer activement la virémie chez les souris humanisées infectées<sup>273</sup>.

**3- Gong C et al** ont exploré une approche d'adressage des acides nucléiques dans les cellules neuronales. Ils ont désigné un peptide bifonctionnel RVG-R9 avec quatre résidus d'histidine en tant que spacer entre le CPP 9R et le peptide RVG. Ils ont injecté le nanocomplexe RVG-R9/pGL3 chez les souris via la veine de la queue et ont mesuré dans de nombreux tissus l'expression de pGL3 à 24h, 48 H, 72 H et 120 H après l'injection de nanocomplexes. L'expression de luciférase médiée par le nanocomplexe RVG-9R/pGL3 dans le cerveau a atteint son niveau maximum à 72 H et elle a été environ 3 fois plus élevée par rapport à celle du groupe de témoin (Plasmide pGL3 nu)<sup>274</sup>.

**4-Young-Wook Won et al** <sup>275</sup> ont développé une méthode thérapeutique sûre pour régresser et traiter l'obésité ainsi que les syndromes métaboliques induits par l'obésité, dans un modèle murin, en ciblant la prohibitine qui est une protéine exprimée principalement dans la membrane interne de mitochondrie et le cytoplasme, mais est déplacée vers la membrane cellulaire et le noyau dans des cellules adipocytaires différenciées. Les auteurs ont couplé un peptide court appelé "Adipocyte-Targeting Sequence" avec un CPP R9 (ATS-R9) ciblant la prohibitine pour transfecter sélectivement les adipocytes matures.

Le FABP4 (Fatty-Acid-Binding Protein 4) est un chaperon clé dans l'absorption des acides gras et du stockage des lipides dans les adipocytes. Ils ont donc adressé de façon spécifique un shRNA inhibant l'expression de *FABP4* via le peptide bifonctionnel ATS-R9 dans les adipocytes matures. Le traitement des souris obèses avec le nanocomplexe ATS-R9/shFABP4 a entraîné la régression du syndrome métabolique et la diminution du poids corporel (>20%).

**5-**Dans un autre travail effectué par **Young-Wook Won et al**, le polymère cystamine bisacrylamide-diaminohexane (CD) a été modifié par les peptides D-9-arginine et IMTP ciblant le myocarde ischémique. IMTP-CD-R9 peut donc se localiser au myocarde ischémique et a une efficacité de transfection améliorée due à la présence de 9R. Les auteurs ont observé une localisation élevée d'IMTP-CD-R9/ pSV-Luci dans la zone ischémique du ventricule gauche d'un modèle de rat d'ischémie/reperfusion (I/R) lors d'une administration systémique <sup>276</sup>.

**6-**Dans l'objectif de trouver un traitement pour les leucémies humaines, un immuno-nanoplexe composé d'un anticorps anti JL1, un épitope de domaine extracellulaire de CD43 humain qui est exprimé dans les cellules des leucémies aiguës myéloïdes et lymphoïdes mais pas dans les tissus sains a été développé par l'équipe **Lee YK**. Cette équipe a montré que l'immuno-nanoplexe anti-JL1-R9/siRNA cible efficacement les cellules leucémiques positives pour JL1 inoculés dans la moelle osseuse de souris <sup>277</sup>.

### **G- Adressage subcellulaire des acides nucléiques**

Adressage subcellulaire efficace de l'acide nucléique est nécessaire afin d'obtenir son effet thérapeutique maximal, comme par exemple le ciblage nucléaire pour les oligonucléotides antisens modifiant l'épissage ou cytoplasmique pour les siRNA <sup>278</sup>.

Des CPPs avec des séquences de localisation nucléaire (NLS, Nuclear Localization Sequences) ont été utilisés pour améliorer l'efficacité de l'import nucléaire et faciliter la localisation nucléaire des acides nucléiques <sup>279</sup>. Les NLS sont des petits peptides cationiques à

base de lysine, arginine ou proline qui peuvent être reconnus par des membres de la famille des Importins (les protéines de transport nucléaire). L'Importin- $\alpha$  joue un rôle important en raison du fait qu'il se lie directement au signal NLS. Le complexe est ensuite transloqué dans le noyau par le biais des pores nucléaires via sa fixation successive à l'Importin- $\beta$  et aux nucléoporines. Ainsi, le NLS permet de passer la membrane nucléaire et favorise donc la translocation nucléaire <sup>280</sup>. La séquence NLS, PKKKRKV, issue de l'antigène grand T du virus simien 40 (SV40) est le plus connu et largement étudié dans le domaine de la thérapie génique <sup>281</sup>.

Récemment, le mécanisme d'absorption cellulaire de CPPs riches en lysine et arginine a été décrit en montrant leur accumulation dans les noyaux et plus particulièrement dans les nucléoles. Il a été démontré qu'au moins six résidus arginine pour un CPP simple et quatre résidus arginines pour un CPP combiné avec un NLS sont nécessaires pour permettre une accumulation dans le noyau <sup>282</sup>.

Kadi-Liis Veimant et al ont montré que PepFect14 (la version modifiée de stéaryl-TP10) possède également la capacité de pénétrer dans la membrane nucléaire <sup>283</sup>.

#### **H- Poly (oligo-D-arginine) avec ponts disulfures internes**

La présence d'un groupement guanidinium dans les résidus arginines permet sa liaison bidentée aux molécules chargées négativement à la surface cellulaire, par opposition aux résidus lysines, qui donnent seulement une charge positive par l'intermédiaire de son groupement ammonium <sup>284</sup>.

Young- Wook Won et al ont développé un CPP réductible, rPOA (réductible Poly-Arginine), composé d'unités peptidiques Cys-(D-R9)-Cys reliées entre elles par des ponts disulfures entre les groupements cysteinyl et thiol du peptide. La polymérisation du Cys-(D-R9)-Cys en rPOA augmente la masse molaire, ainsi la stabilité des nanocomplexes dans des conditions extracellulaires et diminue sa cytotoxicité dans l'espace cytoplasmique par une dégradation rapide puisque le rPOA peut se fragmenter en Cys-(D-R9)-Cys dans des environnements cellulaires réduits tels que le cytosol, les endosomes et les lysosomes. Bien que le mécanisme exact de la distribution subcellulaire de rPOA n'est pas complètement élucidé, on suppose que la concentration de glutathion contrôle le niveau d'oxydoréduction dans les différents compartiments et peut moduler la stabilité de rPOA et donc la libération d'acide nucléique dans le cytosol et son orientation vers le noyau.

Dans un travail effectué par Young- Wook Won et al en 2010, le transfert d'ADN codant pour luciférase a été réalisé, *in vivo*, dans le poumon par l'administration intratrachéale d'un



polyplex d'ADN/poly (oligo-d-arginine). Les auteurs ont réussi à montrer que l'expression de luciférase dans ce tissu est d'environ dix fois plus élevée par rapport au polyplex ADN/polyéthylénimine. En plus d'une expression génétique élevée, le rPOA a présenté *in vivo* un effet prolongé de l'expression du gène jusqu'à 7 jours <sup>285</sup>. Quatre ans plus tard, la même équipe a testé avec succès le peptide rPOA conjugué à ATS pour effectuer un adressage ciblé *in vivo* dans les adipocytes matures (voir paragraphe F-4, page 77) <sup>276</sup>.

## **I- PepFect14**

PepFect 14 (PF14) est une version modifiée et optimisée d'un CPP développé précédemment par l'équipe d'Ulo Langel, le Stéaryl-transportan10 (stéaryl- TP10). Les auteurs ont remplacé des acides aminés lysines et isoleucine par des acides aminés ornithines et leucines. Ces modifications améliorent la formation de complexes avec les oligonucléotides. De plus, l'ornithine, un acide aminé non-protéinogénique, est moins sensible à des protéases sériques, et limite donc la dégradation du peptide dans le sérum. La présence du groupement stéaryl à l'extrémité N-terminale de PepFect 14 améliore à la fois sa capacité de complexation avec des oligonucléotides et son échappement endosomal. Il est intéressant de noter que PepFect 14 est un vecteur très efficace pour transfecter de nombreux acides nucléiques et les molécules à base d'oligonucléotide comprenant les SSOs, les siRNA et les pDNAs dans des cellules réputées difficiles à transfecter <sup>286,258, 283</sup>.

Ulo Langel a montré que PepFect 14 peut être formulé avec un SSO en présence de différents excipients pharmaceutiques et dessiqué sous forme solide et réutilisé plusieurs mois plus tard avec une activité maintenue, ce qui indique que le peptide pourrait être utilisé pour une administration orale <sup>286,258</sup>.

Les études d'internalisation des nanocomplexes PepFect14/oligonucléotide liés entre eux par des liaisons non covalentes ont montré que les récepteurs scavenger de classe A (SCARA) et l'endocytose médiée par des cavéoles sont les voies principales de l'internalisation de ces nanocomplexes. Lorsque SCARA est inhibé ou est sous-exprimé par un siRNA, l'internalisation du nanocomplexe est bloquée. L'échappement endosomal du nanocomplexe PepFect14/oligonucléotide n'est pas encore bien comprise, mais l'utilisation des stratégies qui favorisent l'échappement endosomal tel que la co-incubation du nanocomplexe avec la chloroquine en tant qu'un agent endosomolytique a augmenté l'efficacité de transfection. En raison de problème de toxicité liée aux additifs endosomolytiques, leur utilisation est limitée aux applications *in vitro*.

Il a été montré que des nanoparticules PepFect14/SCO étaient capables d'induire efficacement la correction d'épissage *in vitro*, même en présence de sérum, dans un modèle cellulaire de la DMD : les myotubes mdx de la souris. Une correction d'épissage de plus de 60% est observée dès 8 H après la transfection. Cela démontre que, en dépit d'être très stable, les nanocomplexes sont rapidement dissociés à l'intérieur des cellules. Cependant, la diminution de la correction d'épissage a eu lieu dès 48 H après la transfection quand la concentration en nanocomplexes diminue en raison de leur dégradation et de la division cellulaire.

Enfin, pour souligner le potentiel du PepFect14 en tant que véhicule de transfert de gène, ils ont montré que ce peptide permet également une transfection efficace des cellules primaires tel que les cellules MEF (les fibroblastes embryonnaires de souris) et mES (les cellules souches embryonnaires de souris), en plus des lignées de cellules adhérentes<sup>283, 258, 287</sup>.

### **J- Peptides ciblant RTf1 humain**

Puisque le RTf1 est exprimé de manière ubiquitaire et surexprimé dans de nombreuses cellules tumorales, des cellules capillaires endothéliales du cerveau et des cellules érythroïdes, il est une cible intéressante pour les maladies tumorales, le système nerveux central et les maladies érythroïdes. À l'heure actuelle, les scientifiques ont réussi à relier de nombreuses molécules thérapeutiques au ligand naturel du RTf1 humain, la Tf, et ils ont obtenu des résultats encourageants en oncologie et les maladies du système nerveux central<sup>288, 289</sup>. Cependant, la forte concentration de Tf endogène et son poids molaire relativement élevé dans le sang, rendent cette molécule difficile pour l'élaboration de systèmes d'administration de médicaments<sup>290</sup>.

Afin d'identifier des peptides ciblant le RTf1 humain, la méthodologie de phage display a été largement utilisée. Le phage display est une technique de sélection permettant d'étudier les interactions protéine-protéine, protéine-peptide et protéine-ADN en utilisant des bactériophages (les virus qui infectent les bactéries) pour relier les protéines aux informations génétique qui les codent. Dans cette technique, un gène codant pour une protéine d'intérêt est inséré dans un gène codant pour la protéine d'enveloppe de phage, ce qui entraîne l'expression de protéine d'intérêt à la surface du phage. Ces phages peuvent ensuite être ciblés contre autres protéines, peptides ou séquences d'ADN, afin de trouver les interactions possible entre la protéine exprimée et ces autres molécules<sup>291</sup>.

A ce jour, différents peptides ciblant le RTf1 humain avec une forte affinité ont été trouvés par la méthodologie du phage display (Tableau 8).

NOM	séquence	référence
P1	HAIYPRH	290
P2	THRPPMWSPVWP	290
B2	GHKVKRPKG	292
B6	GHKAKGPRK	292
B18	SPRPRHTLRLSL	293

**Tableau 8) Peptides ciblant le RTf1 humain.**

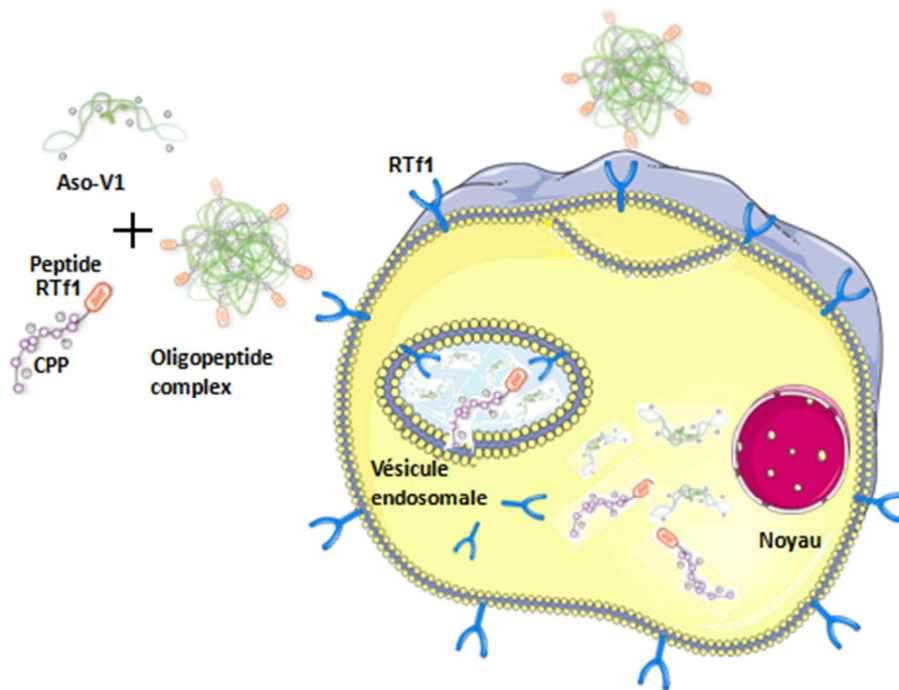
Il a été démontré, par les expériences de compétition, qu'il n'existe pas des compétitions significatives entre la Tf et le peptide P1 ou la Tf et le peptide P2 pour cibler le RTf1 humain et ils se lient tous à des sites distincts sur ce récepteur. Il est donc intéressant d'utiliser ces peptides pour un adressage spécifique de RTf1 humain, en particulier dans les cas où il n'est pas souhaitable de perturber le transfert du fer par la Tf <sup>290</sup>.

## V/ OBJECTIF DU PROJET

Dans la perspective d'un traitement *in vivo* chez l'homme, il est impossible d'utiliser par voie systémique l'ASO-V1 nu qui présente une clairance rénale élevée, nécessitant des concentrations importantes de molécules thérapeutiques avec un risque de toxicité considérable. Il est donc essentiel d'adresser de façon ciblée l'oligonucléotide antisens aux cellules érythroïdes médullaires afin de diminuer sa concentration et par conséquent les risques liés à sa toxicité. Cela permettra également d'augmenter l'efficacité du traitement. Afin d'optimiser l'adressage de l'oligonucléotide antisens aux cellules érythroïdes, nous avons proposé de cibler le RTf1 qui est exprimé fortement à la surface des progéniteurs érythroïdes. Le RTf1 permet d'internaliser le fer dans toutes les cellules de l'organisme. Le fer est indispensable au métabolisme de l'hème et des clusters fer-soufre. Les progéniteurs érythroïdes sont des cellules de l'organisme qui expriment le plus haut niveau du RTf1 dont l'expression débute juste avant celle de la FECH durant l'érythropoïèse. La liaison de l'holotransferrine à son récepteur induit son internalisation dans des vésicules endosomales.

Ce projet a comme objectif la conception rationnelle de véhicules peptidiques ciblant RTf1 pour adresser l'ASO-V1 aux érythroblastes en maturation (figure 38). Plusieurs peptides qui lient avec une forte affinité le RTf1 humain sont déjà disponibles dans la littérature. Un des avantages principaux de certains de ces peptides est l'absence d'interférence avec le site de liaison de la Tf sur RTf1. Cependant, lorsqu'ASO-V1 entre dans les cellules par endocytose du RTf1, il sera piégé dans la vésicule endosomale. Pour surmonter ce problème, nous avons développé des peptides bi-fonctionnels à partir des séquences peptidiques ciblant le RTf1 tout en les ajoutant des séquences CPP qui facilitent la formation du nanocomplexe et la sortie de l'ASO-V1 de la vésicule endosomale. Les liaisons entre ces peptides et l'ASO-V1 sont des liaisons non covalentes, ce qui augmente la biodisponibilité de l'oligonucléotide antisens.

Deux CPPs différents ont été utilisés dans ce projet; l'un est un CPP cationique formé de 9 résidus d'arginine (rPOA) qui favorise la formation de pores dans des bicouches lipidiques et facilite les interactions électrostatiques entre le peptide chargé positivement et l'ADN de charge négative. L'autre est PepFect14 qui est un CPP hydrophobe constitué de 22 acides aminés et qui possède un groupement stéaryl endosomolytique à l'extrémité N-ter. Le pepFect14 contient également une charge nette positive qui lui permettra d'avoir des interactions électrostatiques avec l'ASO-V1. En tout, nous avons fait synthétiser dix peptides bifonctionnels avec cinq séquences différentes ciblant RTf1 conjugués chacun à deux types de CPP.



**Figure 38) La stratégie d'adressage d'ASO-V1 aux progéniteurs érythroïdes.** Les peptides bi-fonctionnels sont composés de deux parties, une partie CPP et une partie ciblant le RTf1. Les charges négatives de l'ASO-V1 lui permettent d'avoir des interactions électrostatiques avec le peptide bifonctionnel de charge positive. Une fois que le complexe CPP-RTf1/ASO-V1 est formé, il peut être internalisé dans les cellules par endocytose du RTf1. Grâce aux caractéristiques endosomolytiques du peptide bi-fonctionnel, l'ASO-V1 s'échappe de la vésicule endosomale. Une fois rentré dans le noyau, l'ASO-V1 reconnaît l'ARNm pré-messager *FECH* et corrige l'anomalie d'épissage.

Dans un premier temps, par une approche *in vitro*, nous avons déterminé le meilleur ratio de charge entre le peptide (+) et l'oligonucléotide (-) en évaluant directement l'effet sur l'épissage exon3-exon4 du gène *FECH*. Nous avons également montré l'effet prolongé de la correction d'épissage par les nanocomplexes jusqu'à 120 H après la transfection. Nous avons ensuite montré avec différents nanocomplexes CPP-RTf1/ASO-V1 que la quantité d'ARN *FECH* WT a été augmentée dans des LBCLs issues de Patients PPE. Nous avons observé une redirection efficace de l'épissage à partir de 48 H jusqu'à 120 H après la transfection des nanocomplexes dans des progéniteurs érythroïdes CD34+ en différenciation érythroïde d'un porteur de l'allèle hypomorphe. Finalement, nous avons montré, *ex vivo*, dans les progéniteurs CD34+ en différenciation érythroïde des patients PPE, transfectés par CPP-RTf1/ASO-V1, une augmentation d'ARN *FECH* WT et la diminution significative de la surproduction de PPIX.

### **1-Synthèse des peptides et des oligonucléotides antisens**

Les peptides utilisés dans ce travail ont été synthétisés par la société Mimotops avec une pureté de 95%, évaluée via la chromatographie en phase inverse. Tous les peptides nous ont été fournis sous forme d'aliquots de 5 x 1 mg et la solubilité de chaque séquence a été évaluée.

Les peptides avec une partie CPP 9R (C-rrrrrrrr-C) contiennent deux cystéines aux extrémités N-Ter et C-Ter permettant d'avoir une polymérisation entre les peptides par l'interaction des cystéines formant des ponts disulfures (peptide rPOA, déjà expliqué au chapitre précédent page 79). Pour ces derniers, les produits de poids moléculaire les plus élevés ont été séparés après la polymérisation par filtration sur gel.

Nous avons en tout dix peptides combinant deux CPP et 5 ligands RTf1 différents :

- 1- Les peptides bifonctionnels composés du CPP 9R qui sont conjugués de manière covalente à cinq séquences peptidiques différentes ciblant chacune le RTf1 humain (les ligands RTf1).
- 2- Les peptides bifonctionnels composés du CPP PepFect14 (Stéaryle-AGYLLGKLLOOLAAAALLOLL) qui ont un groupement stéaryl N-Ter et sont également conjugués de manière covalente aux cinq ligands RTf1 humain.

Pour les études d'internalisation et la distribution subcellulaire des peptides, le ligand RTf1 humain P1 (HAIYPRH) et CPP 9R ont été conjugués à Rhodamine B et le peptide bifonctionnel P1-9R (C-HAIYPRHrrrrrrrr-C) a été conjugué à FITC.

Les oligonucléotides antisens de type "Locked Nucleic Acid", LNA-ASO-V1 (5' TTTTGTAAGAGTCCGACG 3'), couvrant la position -45-63 de l'intron 3 du gène *FECH*<sup>193</sup> et la séquence LNA-ASO-Mock (5' ATAAAAAAGAAAAA 3'), couvrant la position -71-85 de l'intron 3 du gène *FECH*, ont été achetées chez Eurogentec. Le LNA-ASO-V1 est complémentaire d'une séquence qui couvre le polymorphisme c.315-48C et le site accepteur cryptique d'épissage et ainsi réduit l'inclusion de l'intron 3 et favorise l'utilisation du site accepteur d'épissage physiologique de la jonction intron3-exon4.

Pour les études d'internalisation et la distribution subcellulaire de l'oligonucléotide antisens, LNA-ASO-V1 a été conjugué à une molécule d'Alexafluor 594.

N°	Peptide ID	Length	Sequence	MW	Charge
1	9R	11	CrrrrrrrrrC	1629.99	9
2	P1-9R	16	C-HAIYPRHrrrrrrrrr-C	2298.71	10
3	P2-9R	21	C-THRPPMWSPVWPrrrrrrrrr-C	2896.45	10
4	B2-9R	18	C-GHKVKRPKGrrrrrrrrr-C	2411.91	13
5	B6-9R	18	C-GHKAKGPRKrrrrrrrrr-C	2383.86	13
6	B18-9R	21	C-SPRPRHTLRLSLrrrrrrrrr-C	2838.39	12
7	9R-Rhodamine B	9	CrrrrrrrrrC	2168.7	9
8	P1-9R-FITC	7	HAIYPRH	1318.6	1
9	P1-Rhodamine B	16	C-HAIYPRHrrrrrrrrr-C	3007.6	10
10	PepFect14	21	Ste-AGYLLGKLLLOOLAAAALOOLL	2407.2	5
11	P1-PepFect14	28	Ste-AGYLLGKLLLOOLAAAALOOLLHAIYPRH	3282.2	6
12	P2-PepFect14	33	Ste-AGYLLGKLLLOOLAAAALOOLLTHRPPMWSP	3879.94	6
13	B2-PepFect14	30	Ste-AGYLLGKLLLOOLAAAALOOLLGHKVKRPKG	3395.41	9
14	B6-PepFect14	30	Ste-AGYLLGKLLLOOLAAAALOOLLGHKAKGPRK	3367.35	9
15	B18-PepFect14	33	Ste-AGYLLGKLLLOOLAAAALOOLLSPRPRHTLRLSL	3821.85	8

**Tableau 9) Liste des peptides ligands RTf1 +/- CPP.**

Les CPPs utilisés dans ce projet de thèse sont soit des CPPs de type 9R (C-rrrrrrrrr-C) soit PepFect14 (AGYLLGKLLLOOLAAAALOOLL). Les poids moléculaires des peptides avec la séquence CPP 9R indiquent les poids moléculaires des peptides avant la polymérisation.

## 2-Culture cellulaire

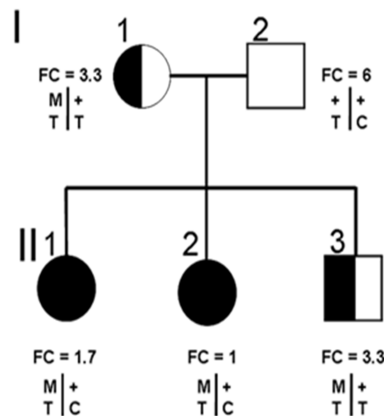
### e- Lignée UT7-Epo

Les cellules UT7, hétérozygote pour l'allèle hypomorphe c.315-48C, proviennent d'un patient souffrant de leucémie mégacaryoblastique chronique. Elles expriment fortement le récepteur de la transferrine à leur surface en particulier en situation de carence en sérum. Nous avons utilisé la version de cette lignée dépendante à l'érythropoïétine (EPO) pour sa croissance et survie en culture et pour maintenir ses caractéristiques érythroïdes. La culture se fait en milieu  $\alpha$ MEM, supplémenté avec 1% de L-glutamine 200 mM, 1% de mélange d'antibiotiques (pénicilline (10.000 UI/ml)/ streptomycine (10.000  $\mu$ g/ml)) et 10% du sérum de veau fœtal (SVF) dans des conditions normales de culture cellulaire (5% de CO<sub>2</sub> et 37°C). Elles sont diluées deux fois par semaine par une dilution au 1/10 dans un milieu  $\alpha$ MEM avec 2 UI/ml de l'EPO.

### f- Lignées lymphoblastoïdes (LBCL)

Les lignées lymphoblastoïdes sont des lymphocytes B issus d'un patient PPE (II1) et d'un porteur asymptomatique (I1) immortalisés par le virus Epstein-Barr. Les cellules utilisées appartiennent à une même famille PPE décrite dans le pedigree (Fig.39). Ces cellules nous ont été fournies par la banque de cellules de l'hôpital Cochin et proviennent du CRMR

Porphyries. Les sujets II1 et II2 présentent des signes classiques de PPE avec une photosensibilité cutanée dès l'enfance. Chez ces sujets, le niveau de PPIX érythrocytaire est augmenté et l'activité FECH lymphocytaire est réduite. Les sujets I1 et II3 sont porteurs asymptomatique de la mutation *FECH* délétère avec un niveau de PPIX érythrocytaire normal et une activité FECH à ~ 50% de la normale.



**Figure 39) Pédigree de la famille PPE.**

**M** indique la mutation *FECH* délétère c.709delT. **T** indique l'allèle 315\_48T. **C** indique l'allèle 315-48C. **+** indique l'allèle sauvage. **FC** indique l'activité FECH lymphocytaire en Nmole de Zn-mésoporphyrine formé à 37 °C/mg de protéine/heure.

Le génotype de sujet II : *FECH* délétère hétérozygote ex7 709delT + c.315-48T/T.

Le génotype de sujet II1: *FECH* délétère hétérozygote ex7 709delT + c.315-48C/T.

Les cellules sont cultivées dans du milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) avec 10% du SVF, 2% L-glutamine 200 mM, 1% 1M HEPES (pH 7,8) et un mélange d'antibiotiques constitué de pénicilline/streptomycine à 1%. Elles sont diluées au demi deux fois par semaine dans des conditions normales de culture cellulaire.

### **g- Les Fibroblastes**

Les cultures primaires de fibroblastes humains, isolés à partir d'un sujet contrôle non porphyrique, nous ont été fournies par Pr Catherine Boileau, de l'Inserm U1148, laboratoire de recherche vasculaire translationnelle. Les fibroblastes sont cultivés dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) complet supplémenté avec 10% du SVF et un mélange d'antibiotiques constitué de pénicilline/streptomycine à 1%. Les cellules ont été



incubées à 37 °C et 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont repiquées une fois par semaine en utilisant un mélange de trypsin-EDTA (0.05% de trypsin et 1 mM EDTA).

#### **h- Cellules primaires de progéniteurs érythroïdes à partir de cellules CD34<sup>+</sup> périphériques**

Trois patients atteints de PPE (sujets A, B et C), un porteur asymptomatique (sujet D) et des témoins ont été prélevés pour nos études *ex vivo*. Les patients sont suivis au CRMR Porphyries.

NOM	Génotype	PPIX érythrocytaire μmol/LGR N< 1.9	Activité FECH Nmol meso-Zn/mg prot/h N= 5 +/- 1.5
Sujet A	<i>FECH</i> délétère hétérozygote C.170_171 del AA/c.315 48C/T	96	2
Sujet B	<i>FECH</i> délétère hétérozygote C.479 A > G/c.315 48C/T	50	1.2
Sujet C	En cours	79	1.4
Sujet D	<i>FECH</i> WT+c.315 48C/T	1.5	4.9

**Tableau 10) Caractéristique clinique et biologique des patients PPE et du sujet control porteur de l'allèle hypomorphe.** L'activité enzymatique FECH a été déterminée pour chaque patient par une méthode fluorimétrique par la mesure de la transformation de Mésoporphyrine et Zn<sup>2+</sup> en Mésoporphyrine-Zn qui est une molécule fluorescente. Le taux de PPIX érythrocytaire a été évalué par la fluorimétrie après hémolyse et extraction des porphyrines. Les mesures sont faites sur un Spectrofluorimètre SHIMADZU RF540.

Dans un premier temps, les cellules mononucléaires ont été isolées à partir du sang périphérique (60 ml) par gradient de Ficoll (LSM; PAA Laboratories). Ensuite, les CD34<sup>+</sup> ont été purifiées grâce à l'utilisation de billes magnétiques cotées par un anticorps CD34 (kit CD34<sup>+</sup> Micro Bead isolation, Miltenyi Biotec). Les CD34<sup>+</sup> ont été finalement cultivés dans du milieu IMDM + GlutaMax contenant le plasma (Human Peripheral Blood Plasma, Stemcell Technologies), le sérum AB (Human Serum Type AB (male), Sigma-Aldrich), l'insuline (Sigma-Aldrich), l'holo-transferrine humaine (Sigma-Aldrich), l'héparine (Sigma-Aldrich), le SCF humaine (Miltenyi Biotec), l'IL-3 (Stem Cell Technologies), l'EPO (Janssen-Cilag) et la pénicilline/streptomycine.

Ce protocole se divise en quatre étapes principales (J0-J6/J6-J10/J10-J14/J14-J21) et les concentrations de certains réactifs varient selon différentes phases du protocole (Tableau 11). Le nombre des cellules a été normalisé tout au long du protocole à 200 000 cellules/ml. Elles ont été incubées à 37 °C et à 5 % de CO<sub>2</sub>.

**Milieu des jours 0 à 6**

<b>Elément</b>	<b>Concentration finale</b>
<b>AB sérum</b>	3%
<b>Plasma</b>	2%
<b>Insuline</b>	10 µg/ml
<b>Héparine</b>	3 U/ml
<b>Transferrine</b>	200 µg/ml
<b>SCF</b>	10 ng/ml
<b>IL-3</b>	1 ng/ml
<b>EPO</b>	3 U/ml
<b>Pénicilline/Stréptomycine</b>	1 X

**Milieu des jours 7 à 10**

<b>Elément</b>	<b>Concentration finale</b>
<b>AB sérum</b>	3%
<b>Plasma</b>	2%
<b>Insuline</b>	10 µg/ml
<b>Héparine</b>	3 U/ml
<b>Transferrine</b>	200 µg/ml
<b>SCF</b>	10 ng/ml
<b>EPO</b>	1 U/ml
<b>Pénicilline/Stréptomycine</b>	1 X

**Milieu des jours 11 à 14**

<b>Elément</b>	<b>Concentration finale</b>
<b>AB sérum</b>	3%
<b>Plasma</b>	2%
<b>Insuline</b>	10 µg/ml
<b>Héparine</b>	3 U/ml
<b>Transferrine</b>	1 mg/ml
<b>EPO</b>	0.1 U/ml
<b>Pénicilline/Stréptomycine</b>	1 X

**Milieu des jours 15 à 21**

<b>Elément</b>	<b>Concentration finale</b>
<b>AB sérum</b>	3%
<b>Plasma</b>	2%
<b>Insuline</b>	10 µg/ml
<b>Héparine</b>	3 U/ml
<b>Transferrine</b>	1 mg/ml
<b>Pénicilline/Stréptomycine</b>	1 X

**Tableau 11) Protocole de préparation du milieu de culture des CD34+ en fonction des jours de culture.**

### 3-Expression de RTf1 (CD71) dans différentes lignées cellulaires

L'expression de CD71 a été mesurée dans différentes lignées cellulaires à l'aide du cytomètre de flux (CMF) BD LSR Fortessa (Becton dickinson, USA). L'analyse au Cytomètre a été effectuée avec 100 000 cellules. Les cellules ont été lavées 2 fois en PBS-SVF 2% avec une centrifugation rapide (1 minute, à 1800 g) entre chaque lavage et elles ont été remises en suspension. Puis elles ont été incubées 25 minutes à 4 °C avec un anticorps CD71-FITC à 1/100 (Beckman Coulter). Ensuite les cellules ont été lavées deux fois en PBS-SVF 2%. Enfin, elles ont été diluées dans 300 µl de tampon de CMF et ont été transvasées dans des tubes de 5 ml en polystyrène. Les fibroblastes ont été filtrés par un tamis de 0.40 µM avant de passer au CMF. Le tampon de CMF est composé de DPBS 1X, NaN3 0.02%, SVF 1%. Les données de l'analyse sont enregistrées par le logiciel BD FACS Diva et traitées avec le logiciel FlowJo.

### 4- Etude de transfection *in vitro* des nanocomplexes ligands RTf1-CPP/ASO-V1

L'effet des nanocomplexes " ligands RTf1-CPP 9R/ASO-V1" ou " ligands RTf1-CPP PepFect14/ASO-V1", par rapport aux nanocomplexes " ligands RTf1-CPP 9R/ASO-Mock " ou " ligands RTf1-CPP PepFect14/ASO-Mock ", a été évalué dans les cellules LBCLs et UT7-Epo, en mesurant l'efficacité de correction d'épissage de l'intron 3 du gène *FECH*.

#### f- Formation des nanocomplexes peptides/ASOs

Dans un premier temps, la charge de surface de chaque peptide (Tableau 9) a été calculée d'après la formule suivante :

$$\text{Charge de surface de peptide (A)} = (n_K + n_R) - (n_D + n_E)$$

La charge de surface de LNA-ASO-V1 avec 19 nucléotides est de -19. A partir de ces données, les ratios ont été calculés en ratio de charge entre le peptide et l'ASO-V1. La concentration fixe d'ASO-V1 est 428 nM finale. Le peptide et l'ASO-V1 ont été incubés ensemble dans de l'eau distillée pendant 1 H à température ambiante.

Pour calculer un ratio de charge la formule suivante a été utilisée:

**A : La charge du peptide**

**B : La charge d'ASO**

**C : Le ratio de charge envisagé**

**D : Le facteur multiplicatif**

**E : La concentration finale d'ASO**

**F : La concentration finale de peptide**

$$D = \frac{B \times C}{A}$$

Et

$$F = D \times E$$

Par exemple, pour le peptide P1-9R qui a été souvent utilisé dans nos études, la charge de surface de peptide (**A**) est de +10. Pour calculer le ratio de charge (**C**) 5 :1, Le facteur multiplicatif (**D**) est 9.5.

Puisqu'on transfecte les cellules avec l'ASO-V1 à 428nM (**E**), la concentration finale de peptide (**E**) est donc 4 µM.

#### **g- Transfection des cellules par les nanocomplexes Peptide/oligonucléotides**

Les cellules LBCLs et UT7-Epo ont été transfectées par différents nanocomplexes et ont été incubées à 37 °C pendant 48 H. Afin d'analyser la cinétique de l'effet correcteur des nanocomplexes sur l'épissage, les cellules ont été incubées en présence de nanocomplexes jusqu'à 120 H après la transfection.

Pour les expériences évaluées par PCR qualitative qui permet d'évaluer l'épissage exon3-exon4, l'émétine, un bloqueur de la traduction, a été ajoutée à une concentration finale de 30 µM, vingt quatre heures avant l'extraction de l'ARN pour bloquer la dégradation par NMD des ARNs utilisant le site cryptique exon3-exon4 et possédant un codon stop prématuré.

L'ARN total a été extrait en utilisant une méthode au thiocyanate de guanidium (RNA-PLUS™, MP Biomedecines). La quantité totale d'ARN totale ainsi que la pureté des échantillons ont été mesurées au spectrophotomètre (Nanodrop Thermo Scientific) à 230, 260 et 280 nm.

#### **h- Transcription reverse**

La transcription reverse a été faite avec le kit Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase (Thermo Scientific) à partir de 500 ng à 1µg d'ARN total extrait, selon le protocole du fabricant.

#### **i- PCR qualitative**

Pour la PCR qualitative, des amorces spécifiques humaines ciblant les exons 3 et 4 du gène *FECH*, ont été utilisées :

Amorce sens: FECH\_E3\_GA\_S 5' TGG ACC GAG ACC TCA TGA CA 3'

Amorce antisens: FECH\_E4\_CT\_AS 5' AGT CCA TAT CTT GAT GGG GGA T 3'

Les PCR sont faites avec le mixte suivant pour un volume final de 15 µl : 7.5 µl de buffer Go Tag G2 Hot start (Promega), 0.5 µl de chaque amorce à 10 µM et 1.5 µl d'eau stérile. 10 µl de mixte est mélangé avec 5 µl d'ADNc.

Le programme de PCR est 3 mn à 95 °C, 35 cycles de 3 étapes : 30 s à 95 °C, 30 s à 62 °C et 20 s à 72 °C, 5 mn à 72 °C et fin à 4°C.

Les produits PCR ont été analysés par l'électrophorèse sur un gel d'agarose à 3%, et la densité des bandes de PCR a été mesurée en utilisant le logiciel Image J. Les résultats ont été calculés sous la forme du rapport de l'intensité de la bande épissée de manière aberrante sur l'intensité des bandes épissées correctement et de manière aberrante (ARNm anormal/ARNm total).

#### **j- PCR quantitative**

Pour les expériences analysées par PCR quantitative, il n'y a pas d'émétine ajoutée au milieu de culture.

Des amorces *FECH* spécifiques pour l'humain ont été utilisées :

FECH\_E1\_S1: 5' GCGTCCTGCTCCGCGATCC 3'

FECH\_E2\_AS1: 5'TTCTGTGGTGACGGCCGCTG 3'

Pour la normalisation, les gènes de référence *B2M* et *HPRT1* ont été utilisés.

hB2M.S: 5' TGC TGT CTC CAT GTT TGA TGT ATC T 3'

hB2M.AS: 5' TCT CTG CTC CCC ACC TCT AAG T 3'

hHPRT1.S: 5' TGA CAC TGG CAA AAC AAT GCA 3'

hHPRT1.AS: 5' GGT CCT TTT CAC CAG CAA GCT 3'

La PCR quantitative a été réalisée par un mixte composé de 10 µL de solution buffer d'Abgene 10 x (Absolute Blue qPCR SYBR GREEN Kit, Thermo Scientific) mélangé avec 5 µl d'ADNc, 1 µl de chaque amorce sens et antisens et 3 µl d'eau stérile pour un volume réactionnel final de 20 µl.

Le programme est lancé sur une machine Light Cycler® 480 II (Roche) aux conditions suivantes : 15 mn à 95 °C, 40 cycles de 3 étapes : 15 s à 95 °C, 30 s à 60 °C et 30 s à 72 °C. L'exploitation des résultats est faite sous le logiciel Light Cycler® 480 SW 1.5.

Les quantités d'ARN sont mesurées à partir d'une courbe de titration obtenue après amplification d'un cDNA témoins dilué de 1/2 en 1/2 jusqu'à 1/16<sup>ème</sup>. Les dosages d'ARN *FECH* cible sont normalisés par la moyenne géométrique des quantités mesurées sur les gènes de références *HPRT1* et *B2M*.

Les statistiques (moyennes et écarts-types) ont été faites entre les valeurs obtenues pour six expériences différentes pour chaque nanocomplexe dans des études *in vitro* et six répliques intra-séries dans des études *ex vivo*. Le test Mann Whitney a été utilisé pour calculer les significativités des différences obtenues entre les conditions contrôles (non-transfecté) et les autres conditions.

## **5- Etude de transfection *ex vivo* des nanocomplexes ligands RTf1-CPP/ASO-V1 dans des progéniteurs érythroïdes à partir des cellules CD34+**

Le protocole de culture primaire de progéniteur érythroïdes à partir des cellules CD34<sup>+</sup> est déjà expliqué dans le Paragraphe 2-d, page 88. Les cellules érythroïdes primaires venant de différents sujets (Tableau 10) ont été transfectées à J7 (pour le sujet porteur de l'allèle hypomorphe) et à J9 (pour les patients PPE) au début de la différenciation érythroïde terminale quand le gène *FECH* est exprimé à haut niveau. L'ARN total a été extrait 72 H après la transfection à J12. Afin d'analyser la cinétique de l'effet correcteur des nanocomplexes sur l'épissage, les cellules ont été incubées en présence de nanocomplexes jusqu'à 120 H après la transfection.

La **PCR qualitative** *FECH* exon3-exon4 des cellules érythroïdes primaires permet d'évaluer la correction de l'épissage exon3-exon4.

La **PCR quantitative** *FECH* exon1-exon2 des cellules érythroïdes primaires permet de mesurer l'augmentation de l'ARN *FECH* WT.

### **a- Mesure de la PPIX intracellulaire**

Les cellules ont été centrifugées à 1800 g pendant 1 minute et ont été lavées deux fois dans de tampon de CMF. Après le deuxième lavage, les culots ont été re-suspendus dans 300 µL du tampon de CMF et transvasés dans des tubes de 5 ml en polystyrène. Les expériences ont été réalisées à l'abri de la lumière. La mesure de la PPIX est réalisée par cytométrie en flux. L'excitation de la PPIX a lieu à 405 nm et l'émission est à 630 nm, ce qui permet l'utilisation d'un filtre à 670 +/- 20 et un filtre à 610 +/- 20 sur l'appareil BD LSR Fortessa pour la détection de la fluorescence naturelle de la PPIX. La procédure de gating et le réglage du voltage a eu lieu avec les cellules progéniteur WT en différenciation au même stade des cellules malades. Le voltage de FSC (Forward Scatter) concernant la taille et celui de SSC (side Scatter) concernant la granulosité ont été modifiés de telle sorte que l'ensemble de la population soit située au milieu de la fenêtre et l'intégralité des cellules ont été choisie. Le gate des cellules WT a été ensuite appliqué pour les cellules des patients.

#### **b- Etude de marquage phénotypique**

Les marquages phénotypiques des cellules érythroïdes primaires ont été étudiés par cytométrie en flux à J12. Les cellules ont été lavées et mises en suspension dans du tampon de CMF. Elles ont été ensuite incubées 30 mn à 4 °C avec les anticorps CD34-PE 1/100 (Beckman Coulter), CD36-FITC 1/100 (Beckman Coulter), CD71-FITC 1/100 (Beckman Coulter) et GPA-PE 1/50 (Invitrogen). Les cellules ont été ensuite lavées deux fois dans du tampon PBS-SVF 2 % et diluées dans 300 µl de tampon du CMF.

#### **c- Etude de la morphologie des cellules au cours de la différenciation érythroïde**

La morphologie cellulaire a été étudiée à J12 à partir de 100 000 cellules par condition. Les cellules ont été lavées deux fois dans du PBS et re-suspendues dans 100 µL du PBS. Elles ont été étalées sur les lames à l'aide d'une centrifugeuse Cytospin à une vitesse de 300 rpm pendant 3 minutes. Après une coloration MGG (May-Grünwald-Giemsa), les cellules ont été observées par la microscopie optique avec un grossissement 100 X.

#### **d- Test de prolifération**

Le nombre des cellules érythroïdes primaires a été déterminé tous les deux jours après une coloration au bleu trypan 0.04 % et en utilisant un compteur de cellules automatique (Bio-Rad). Les cellules ont été maintenues à un nombre équivalent de 200 000 cellules/ml tout au long du protocole.

### **6- Détermination de la taille de nanocomplexe P1-9R/ASO-V1**

Une méthode physico-chimique couramment utilisée pour étudier la formation non covalente des conjugués CPP/ON est la diffusion dynamique de lumière (DLS) qui permet de mesurer la taille hydrodynamique des nanocomplexes formés dans un liquide. La DLS est une technique spectroscopique qui mesure les fluctuations de l'intensité de la diffusion lumineuse en fonction des échelles de temps. Ces fluctuations sont dues au mouvement brownien des particules diffusantes. Lorsque la lumière d'un laser atteint des petites particules dans une micro-cuvette, la lumière diffuse dans toutes les directions. On peut mesurer l'intensité de la lumière diffusée par les particules à un angle considéré (90° typiquement) au cours du temps. L'échelle temporelle des fluctuations de diffusion est directement liée au coefficient de translation des particules diffusantes dans le solvant, qui à son tour est lié au diamètre hydrodynamique des nanoparticules.

Les tailles hydrodynamiques des nanocomplexes P1-9R/ASO-V1 ont été mesurées par un appareil DynaPro (Wyatt) qui appartient à Stéphanie FINET (laboratoire IMPMC, Jussieu).

Dans les analyses par DLS dans de l'eau, la taille des nanocomplexes P1-9R/ASO-V1 sont mesurées à différents ratios de charge, en partant soit d'une concentration fixe d'ASO-V1 et en ajoutant le peptide à différentes quantités pour obtenir trois ratios de charge différents 1 :1, 3 :1 et 6 :1, et l'autre en partant du peptide à une concentration fixe sur lequel nous avons ajouté l'ASO-V1 en quantité variable pour obtenir trois ratios de charge différents 6 :1, 3 :1 et 1 :1. Les mélanges avec 2  $\mu$ M d'ASO-V1 et 12  $\mu$ M du peptide P1-9R (le ratio de charge 3 :1) ont été également préparé dans du PBS ainsi que dans du milieu  $\alpha$ MEM complet.

#### **7- Mesure de potentiel zêta de nanocomplexe P1-9R/ASO-V1**

L'analyse de potentiel zêta permet de déterminer la charge de surface qu'une nanoparticule acquiert grâce aux ions qui l'entourent quand elle est en solution. Chaque nanoparticule dispersée dans une solution est entourée par des ions de charge opposée, qui forme la couche fixe. En dehors de cette couche fixe, il existe une composition variable d'ions électriques formant une zone nuageuse, appelé la double couche diffuse. Lorsqu'un voltage particulier est introduit dans des particules dispersées en solution, toutes les particules accompagnées d'une couche fixe bien définie et une partie de la double couche diffuse sont attirées à l'électrode de polarité opposée. On mesure le potentiel zêta en mesurant la vitesse de déplacement des nanoparticules dans un champ électrique. Il s'agit donc des forces électrostatiques de répulsion entre les particules. Plus le potentiel zêta des nanoparticules est élevé, plus les nanoparticules ont tendance à se repousser mutuellement, ce qui favorise la stabilisation de la dispersion.

**Figure 40) Le potentiel zêta représente la charge de surface d'une nanoparticule (www.horiba.com).**



Le potentiel Zêta des nanocomplexes P1-9R/ASO-V1 avec différents ratio de charge 1 :1, 2 :1, 3 :1 et 4 :1, dilués dans de l'eau ou du PBS, ont été mesurés par un appareil Zetasizer Nano ZS apparatus (Malvern Instruments) chez Jérôme Fresnais (laboratoire PHENIX, Jussieu).

## **8-Etude de la biodisponibilité intracellulaire des peptides et des nanocomplexes par la microscopie confocale**

### **c- Internalisation des peptides dans des fibroblastes humains**

Les fibroblastes ont étéensemencés la veille de l'expérience sur des lamelles traitées au collagène de type I (Gibco). Les cellules adhérentes ont été transférées dans du milieu sans SVF pendant 1 H à 37 °C afin de les priver de tout apport de transferrine et fer et d'augmenter l'expression de RTf1. Elles ont été ensuite incubées pendant 30 mn sur la glace dans du milieu contenant 4 µM du peptide pour chaque condition +/- 20 µg/ml de la Transferrine-Alexa 647 (Life Technologies) puis remplacées à 37 °C pendant 30 mn. Les cellules ont été ensuite lavées avec le PBS et fixées par la PFA à 4 % pendant 10 mn à température ambiante. Après deux lavages successifs au PBS, les cellules ont été finalement montées par un milieu de montage contenant le DAPI (Fluorescent Mounting Medium with DAPI, GBI Labs). Les lames ont été observées par le microscope confocal Leica SP8. L'intensité de fluorescence et la co-localisation entre le peptide et la transferrine a été mesurée à l'aide du logiciel d'analyse Imaris.

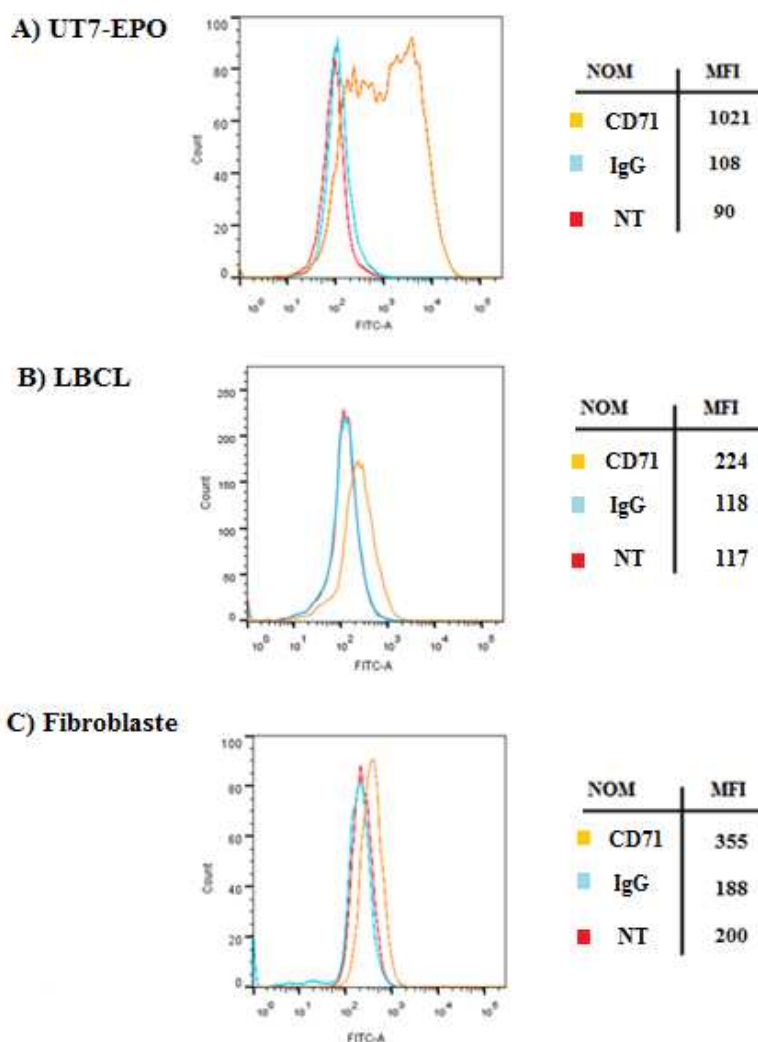
### **d- Internalisation de l'ASO-V1 par le peptide dans des fibroblastes humains**

Pour étudier la distribution subcellulaire de l'ASO-V1-Alexa 594 dans des fibroblastes, les nanocomplexes ont été formés selon le protocole de transfection à un ratio de charge 5 :1 à partir de 428 nM d'ASO-V1 Alexa 594 et 4 µM du peptide bifonctionnel P1-9R froid ou marqué. Les nanocomplexes ont été ajoutés sur les fibroblastes déprivés auparavant en SVF. Après 30 mn d'incubation sur la glace, les cellules ont été ensuite transférées à 37 °C pour 30 mn. La procédure de la fixation des cellules et le milieu de montage utilisés sont identiques.

### 1-Expression de CD71 (RTf1) dans différentes lignées cellulaires

Nous avons sélectionné des peptides qui reconnaissent spécifiquement le RTf1 pour adresser l'ASO-V1 dans des cellules par l'intermédiaire de ce récepteur. Le RTf1 est indispensable pour l'internalisation de l'holo-transferrine dans toutes les cellules pour synthétiser l'hème et les clusters fer-soufre. Une expression ubiquitaire est donc nécessaire pour la survie des cellules.

Dans un premier temps, nous avons comparé le niveau d'expression de CD71 (le marqueur de RTf1) à la surface de différents modèles cellulaires par cytométrie en flux pour avoir une vision globale du potentiel de chaque modèle.



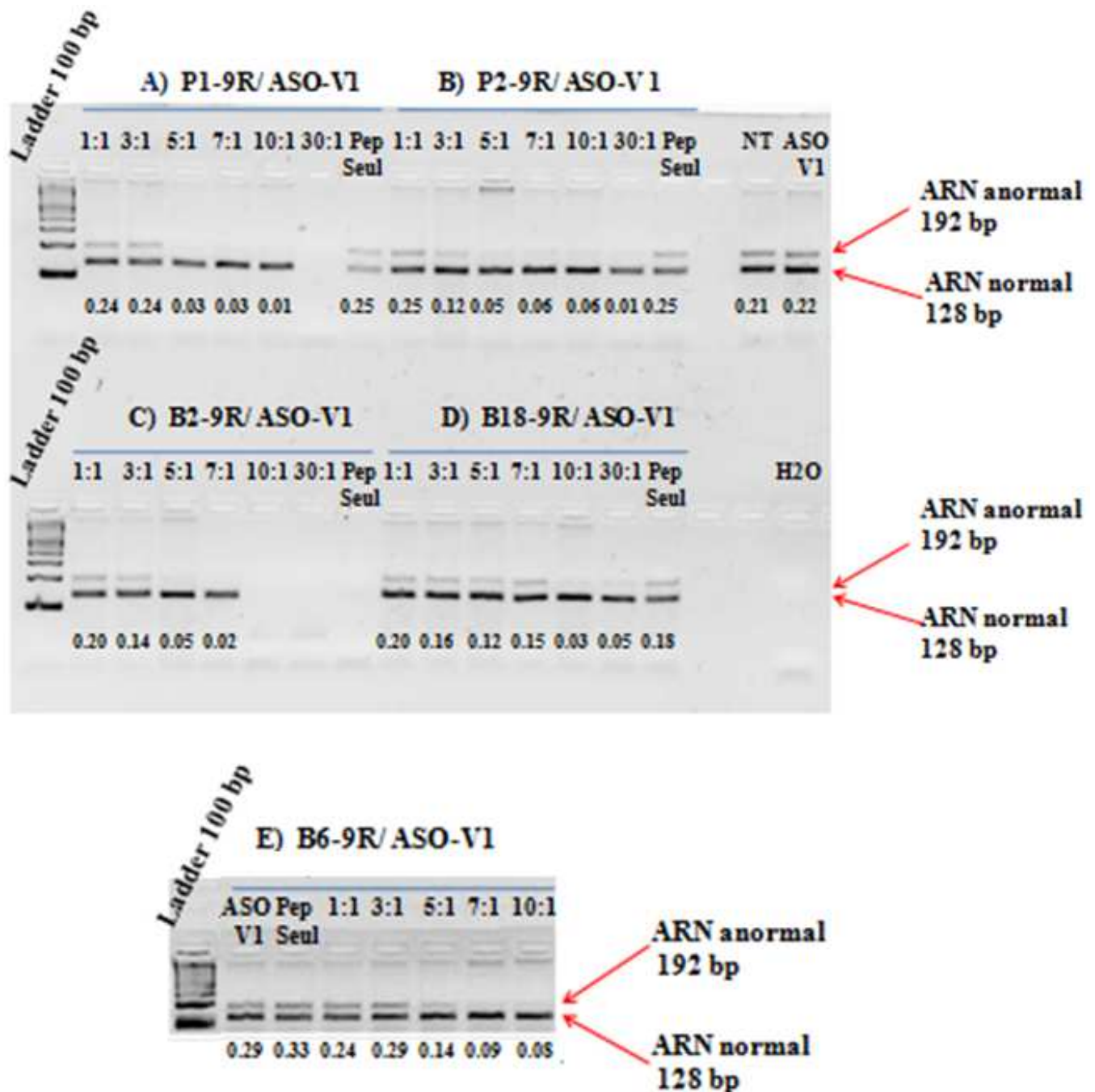
**Figure 41) Mesure de l'expression de CD71 par cytométrie en flux.** Les cellules sont déprivées en SVF pendant 1 H. Elles sont ensuite marquées avec un anticorps anti-CD71 conjugué à FITC ou l'anticorps IgG conjugué à FITC, l'isotype contrôle de CD71, pendant 45 mn à 4 °C. Après 2 lavages successifs, la fluorescence est mesurée par cytométrie en flux.

On a observé qu'après la déprivation des cellules en SVF pendant 1 H, les UT7-EPO, étant des cellules érythroïdes, expriment le plus le CD71. Cependant, les LBCLs et les fibroblastes expriment également le CD71 mais à des niveaux beaucoup plus faible (Fig.41). Bien que la lignée UT7-EPO soit un très bon modèle cellulaire considérant leur caractère érythroïde, le niveau d'expression de RTf1 et la présence de l'allèle hypomorphe, certaines de leurs caractéristiques nous ont amenés à restreindre leur usage à l'étude qualitative de la redirection de l'épissage cryptique exon3-exon4 du gène *FECH*. En effet ces cellules sont polyploïdes (globalement tétraploïdes) avec un ratio d'expression entre les deux allèles inconnu, ce qui complique la quantification de l'ARN *FECH* WT après correction d'épissage. De plus, ce sont des cellules en suspension avec des gros noyaux et peu de cytoplasme, ce qui complique leur utilisation pour les études par microscopie confocale.

Les lignées lymphoblastoïdes de malades PPE, cellules diploïdes possédant un allèle hypomorphe permettent l'étude à la fois qualitative et quantitative de l'épissage exon3-Exon4. Nous avons utilisé des cultures primaires de fibroblastes humains isolées à partir d'un sujet control non porphyrique pour les études de distribution subcellulaire et nucléaire des peptides et l'ASO-V1 ainsi que leurs co-localisations avec la Tf.

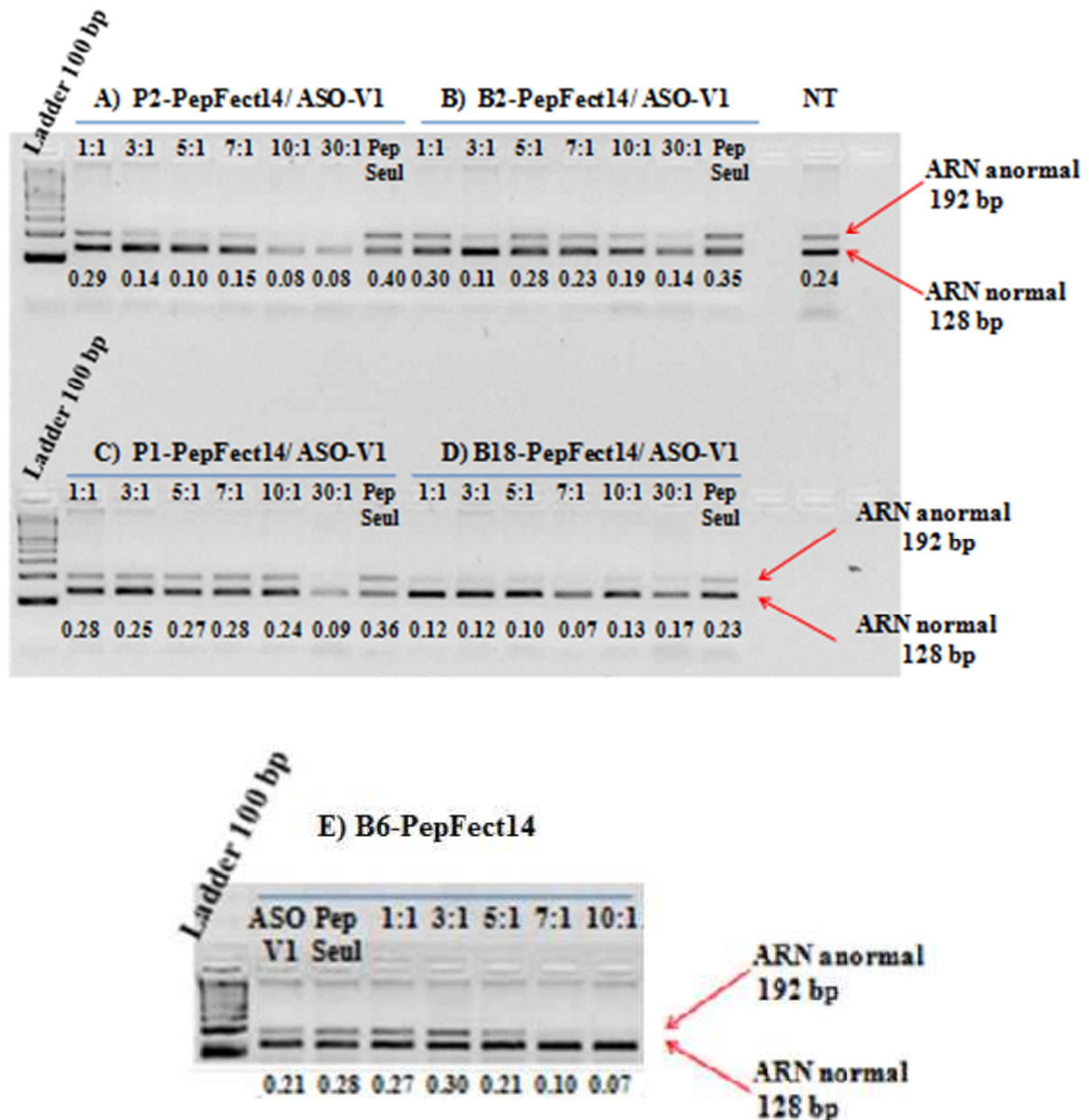
## **2-Recherche du meilleur ratio de charge entre peptides et ASO en utilisant des lignées lymphoblastoïdes de malades PPE**

Nous avons recherché pour chaque peptide, en évaluant directement l'effet sur l'épissage, le meilleur ratio de charge entre le peptide (+) et l'oligonucléotide (-) permettant de former des nanoparticules ayant un effet protecteur du peptide sur l'oligonucléotide. Nous avons utilisé des lignées lymphoblastoïdes issues de patients PPE qui possèdent l'anomalie d'épissage d'intérêt (Sujet II1, Fig 39), nous permettant ainsi d'étudier la correction de l'anomalie d'épissage au niveau qualitatif et quantitatif. Ces cellules ne produisent pas de PPIX, ce qui représente la seule limite à leur utilisation. Après la transfection des LBCLs par nos différentes combinaisons peptidiques, nous avons choisi le ratio de charge le plus faible permettant de limiter les risques de toxicité tout en conservant une bonne efficacité sur l'épissage exon3-exon4. Ceci a été étudié pour les dix peptides bifonctionnels ligand RTf1-CPP.



**Figure 42) Exemple de la mesure qualitative de l'effet d'une gamme de ratio sur l'épissage exon3-exon4 du gène *FECH* par des ligands RTf1 conjugués au CPP 9R.**

Les cellules LBCLs issues de patients PPE (Sujet II1) sont transfectées par les nanocomplexes RTf1-CPP/ASO-V1 à différents ratios de charge. Les différents ratios de charge sont calculés selon la formule mentionnée à la page 90 et à partir d'une concentration fixe d'ASO-V1 à 428 nM. La concentration de la condition contrôle « peptide seul » est équivalente à celle utilisée pour le ratio de charge 10 :1. Les cellules sont traitées à l'émétine 24 H après la transfection. Les ARN sont extraits 48 H après la transfection. Les produits de RT-PCR sont analysés sur un gel d'agarose à 3%. La taille de l'ARN anormal (épissage cryptique) et la taille de l'ARN normal (épissage physiologique) sont indiquées à droite. La densité des bandes de PCR qualitative est mesurée en utilisant le logiciel Image J. Cette expérience a été effectuée en 2 séries indépendantes.



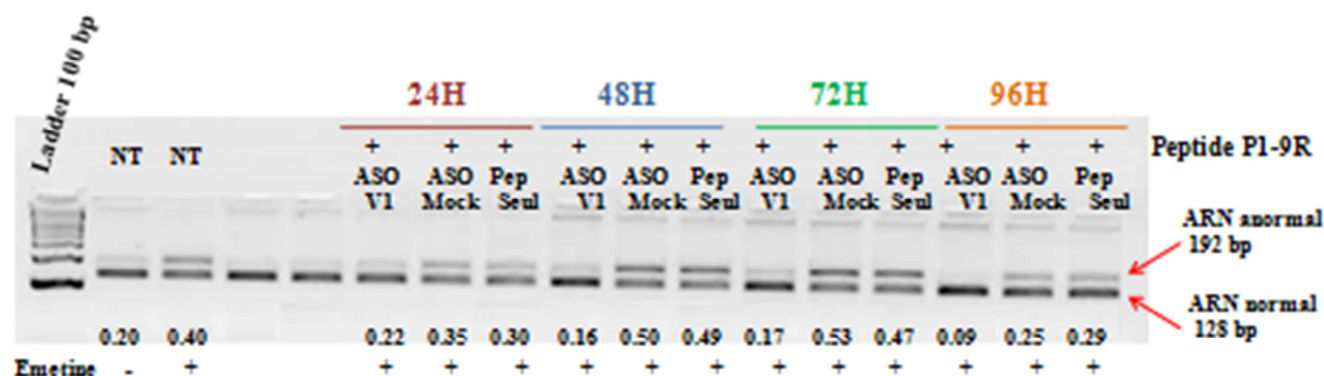
**Figure 43) Exemple de la mesure qualitative de l'effet d'une gamme de ratio sur l'épissage exon3-exon4 du gène *FECH* par des ligands RTf1 conjugués au CPP PepFect14.** Les cellules LBCLs issues de patients PPE sont transfectées par les nanocomplexes RTf1-CPP/ASO-V1 à différents ratios de charge. Les différents ratios de charge sont calculés selon la formule mentionnée à la page 90 et à partir d'une concentration fixe d'ASO-V1 à 428 nM. La concentration de la condition contrôle « peptide seul » est équivalente à celle utilisée pour le ratio de charge 10 :1. Les cellules sont traitées à l'émétine 24 H après la transfection. Les ARN sont extraits 48 H après la transfection. Les produits de RT-PCR sont analysés sur un gel d'agarose à 3%. La taille de l'ARN anormal (épissage cryptique) et la taille de l'ARN normal (épissage physiologique) est indiquée à droite. La densité des bandes de PCR qualitative est mesurée en utilisant le logiciel Image J. Cette expérience a été effectuée en 2 séries indépendantes.

On observe que les peptides P1-9R, P2-9R et B2-9R corrigent efficacement l'épissage cryptique exon3-exon4 du gène *FECH* à partir d'un ratio de charge 5 :1 alors que les peptides B6-9R et B18-9R corrigent efficacement l'épissage respectivement à partir de ratio de charge 7 :1 et 10 :1 (Fig.42). Globalement, les peptides ligand RTf1-PepFect14 ont des effets sur l'épissage à des ratios de charge plus élevés par rapport aux peptides ligands RTf1-9R. Parmi eux, le peptide B18-PepFect14 corrige l'épissage à partir d'un ratio de charge 1 :1 (Fig.43). L'absence des points 10 :1 et 30 :1 sur le gel est la conséquence d'une forte toxicité induite par la forte concentration du peptide qui a entraîné la mort cellulaire dans certaines conditions. Ces résultats nous montrent que le CPP 9R favorise la complexation du peptide à l'oligonucléotide à des ratios de charge plus bas et permet de travailler dans des conditions moins toxiques par rapport au CPP PepFect14.

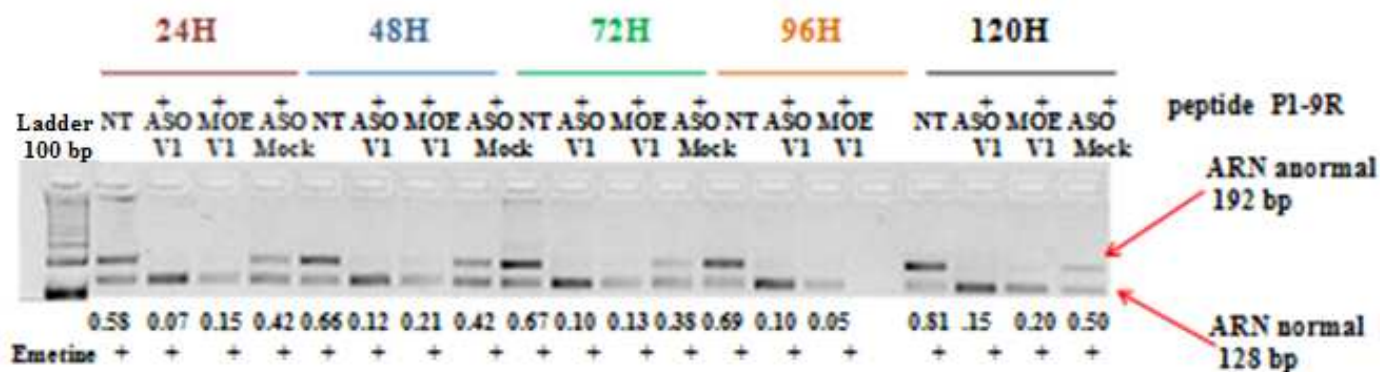
### **3- Cinétique de l'effet des complexes RTf1-CPP/ASO dans le temps**

Les tests des différents ratios de charges des complexes Peptide-CPP/ASO-V1, nous ont permis de trouver différentes combinaisons qui corrigent l'anomalie d'épissage par l'ASO-V1 dans des lymphoblastes PPE (III). Nous avons ensuite mesuré la durée de l'effet de l'ASO-V1 transfecté par certains de nos peptides à des ratios de charge les plus faibles, permettant de diminuer les risques de toxicité tout en conservant une bonne efficacité, dans des LBCLs de patient PPE et des UT7-EPOs. Nous avons testé en même temps, dans des UT7-EPO, l'efficacité dans le temps d'un oligonucléide antisens -45-63 de type methoxy-ethyl (MOE, ISIS Pharmaceuticals) complexé avec P1-9R. LNA et MOE sont des oligonucléotides chimiquement modifiés qui sont très résistants à la dégradation par des enzymes cellulaires et n'activent pas l'activité de la RNase H. Ces oligonucléotides modifiés ont une charge négative et une faible toxicité.

Ici, nous allons donner un exemple obtenu avec les nanocomplexes peptide P1-9R/ASO-V1 à un ratio de charge 5 :1.



**Figure 44) Cinétique de l'effet sur l'épissage en lignées lymphoblastoïdes PPE.** PCR qualitative exon3-exon4 du gène *FECH* après une transfection avec les nanocomplexes P1-9R/ASO-V1, P1-9R/ASO-Mock et P1-9R seul avec correction de l'épissage jusqu'à 96 H dans la lignée lymphoblastoïde des patients PPE (Sujet II1). Le ratio de charge entre le peptide P1-9R et les oligonucléotides antisens est 5 :1. L'oligonucléotide antisens est à 428 nM finale. Le peptide seul est ajouté dans le milieu à une concentration finale équivalente à un ratio de charge 5 :1. L'émétine est ajoutée dans le milieu à une concentration finale de 30  $\mu$ M, 24 H avant de collecter les cellules pour extraire l'ARN.



**Figure 45) Cinétique de l'effet sur l'épissage en lignée UT7-EPO.** PCR qualitative exon3-exon4 après une transfection avec les nanocomplexes RTf1-CPP/ASO-V1, RTf1-CPP/MOE-V1 et RTf1-CPP/ASO-Mock avec correction de l'épissage jusqu'à 120 H est effectué dans la lignée UT7-EPO. Le ratio de charge entre le peptide P1-9R et les oligonucléotides antisens est 5 :1. L'oligonucléotide antisens est à 428 nM finale. L'émétine est ajoutée dans le milieu à une concentration finale de 30  $\mu$ M, 24 H avant de collecter les cellules pour extraire l'ARN.

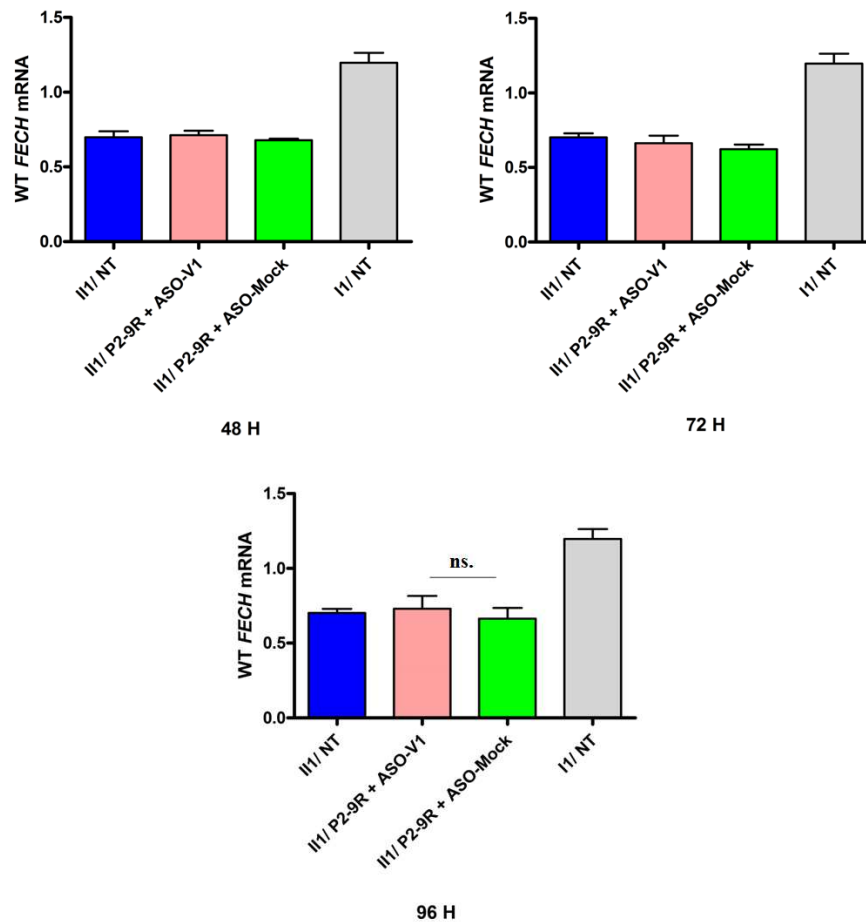


Ces expériences montrent un effet prolongé de la transfection unique par les nanocomplexes peptides-ASO pouvant aller au moins jusqu'à 120 H (Fig.44-45). Cette persistance suggère un effet protecteur du complexe peptidique sur l'oligonuclotide antisens. On a également observé que le peptide P1-9R peut favoriser une complexation aussi efficace et stable dans le temps avec LNA-V1 qu'avec MOE-V1(Fig.45).

#### **4- Etude de l'impact quantitatif sur l'ARN *FECH* WT de la transfection de l'ASO-V1 par des nanocomplexes RTf1-CPP/ASO dans des lignées lymphoblastoïdes de malades PPE.**

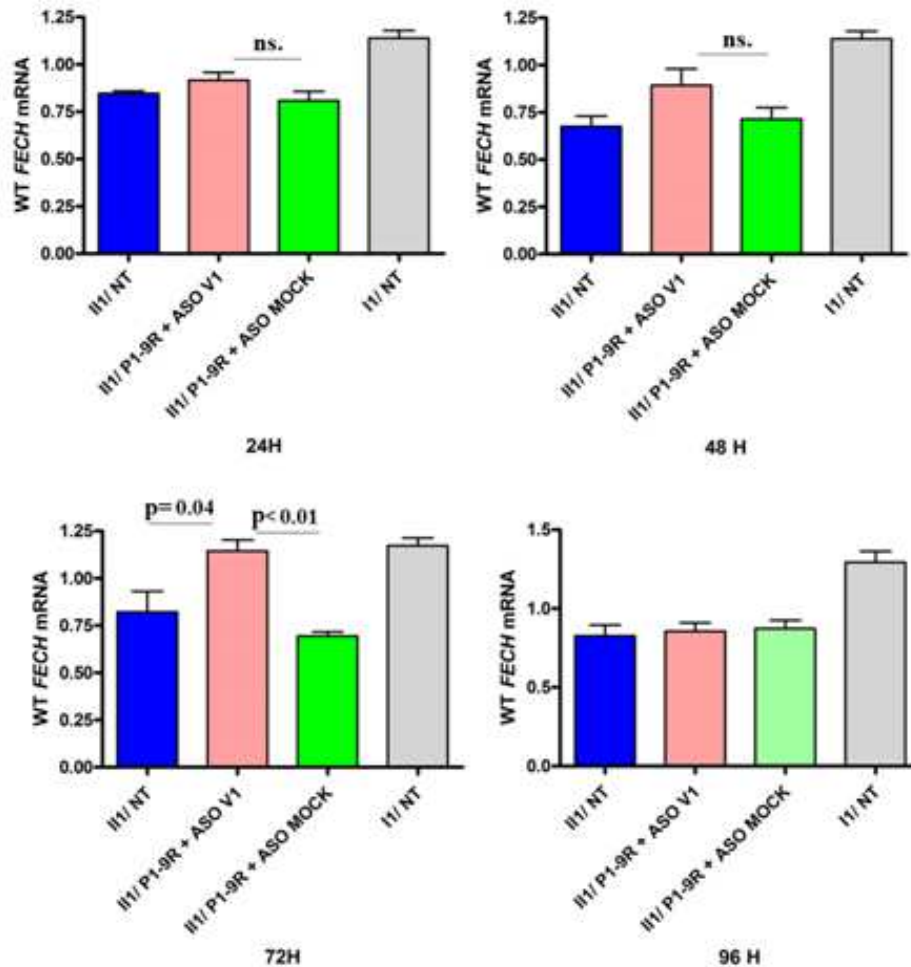
Nous avons ensuite mesuré après les transfections effectuées par différents nanocomplexes, l'effet de l'ASO-V1 sur la quantité d'ARN *FECH* WT. Puisque les peptides ligand RTf1-PepFect 14 ont corrigé l'épissage exon3-exon4 dans des lignées lymphoblastoïdes de patients PPE à des ratios de charge élevés et avec une forte toxicité, nous avons donc préféré nous concentrer sur les peptides ligand RTf1-9R qui corrigeaient l'épissage efficacement à partir d'un ratio de charge 5 :1. Le seul peptide ligand RTf1-PepFect14 pour qui nous avons étudié l'effet sur la quantité d'ARN *FECH* WT après sa complexation avec l'ASO-V1 et son transfert dans des lymphoblastoïdes est peptide B18-PepFect14. Ce dernier avait montré une forte efficacité de correction de l'épissage à partir de ratio de charge 1:1.





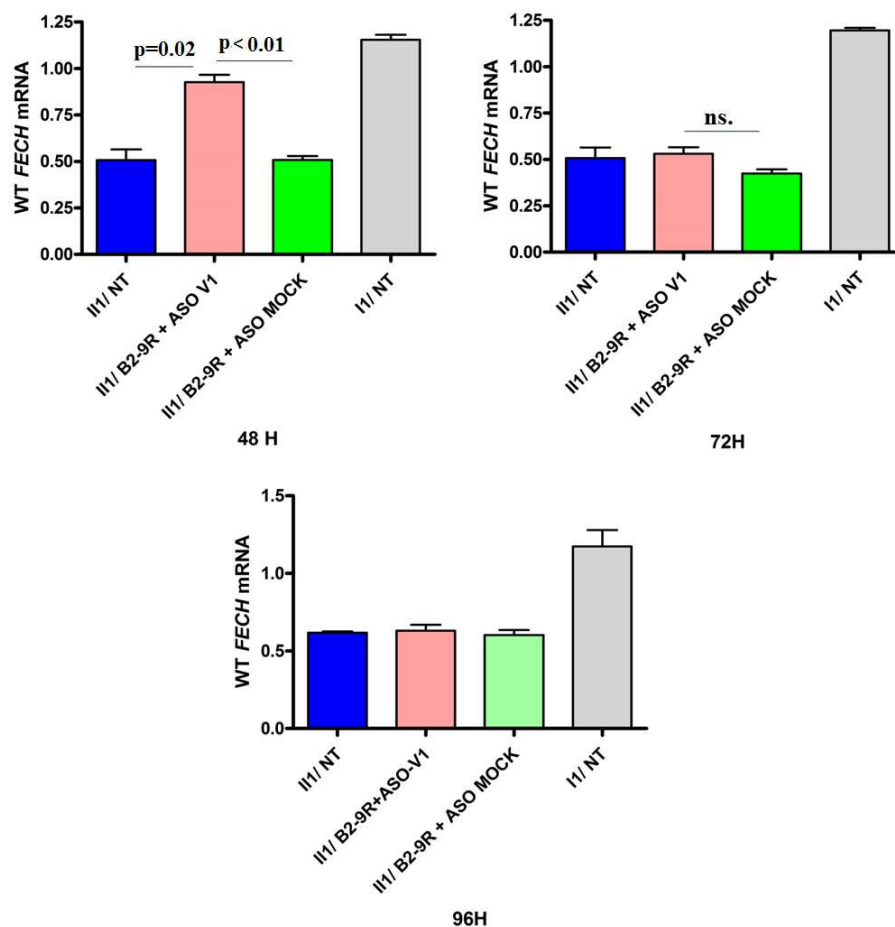
**Figure 46) Quantification de l'ARN *FECH* WT après transfection de nanocomplexes P2-9R/ASO.** La RT-qPCR exon1-exon2 après une transfection par les nanocomplexes P2-9R/ASO-V1 ou P2-9R/ASO-Mock à 72 H dans la lignée lymphoblastoïde du patient PPE II1; Le sujet I1 est un porteur asymptomatique de la mutation délétère sans allèle hypomorphe. Les résultats sont analysés par le test Mann Whitney à partir de 6 expériences indépendantes.

La quantité d'ARN *FECH* WT dans des lymphoblastoïdes de malade (II1) transfectées par le nanocomplexe P2-9R/ASO-V1 commence à augmenter 48 H après la transfection. 96 H après la transfection, le niveau d'ARN *FECH* WT est toujours plus élevé dans des cellules transfectées par le nanocomplexe P2-9R/ASO-V1 en comparaison avec des cellules transfectées par P2-9R/ASO-Mock, mais cette différence n'est pas significative (Fig.46).



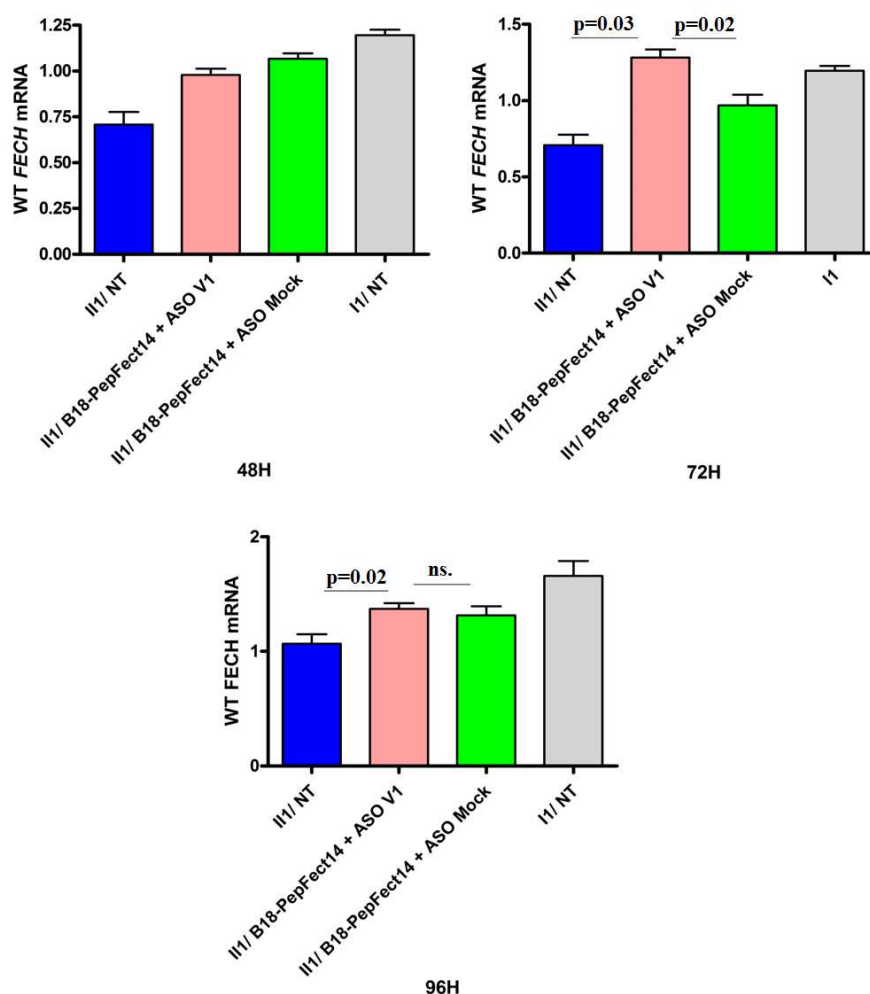
**Figure 47) Quantification de l'ARN *FECH* WT après transfection de nanocomplexes P19R/ASO.** La RT-qPCR exon1-exon2 après une transfection par les nanocomplexes P1-9R/ASO-V1 ou P1-9R/ASO-Mock à 72 H dans la lignée lymphoblastoïde du patient PPE II1; Sujet I1 est un porteur asymptomatique de la mutation délétère sans allèle hypomorphe. Les résultats sont analysés par le test Mann Whitney à partir de 6 expériences indépendantes.

La quantité d'ARN *FECH* WT dans des lymphoblastoïdes de malade (II1) transfectées par le nanocomplexe P1-9R/ASO-V1 commence à augmenter 24 H après la transfection. 72 H après la transfection, le niveau d'ARN *FECH* WT est augmenté de manière significative par rapport à celui des cellules transfectées par le nanocomplexe P1-9R/ASO-Mock. En plus, le niveau d'ARN *FECH* WT dans des lymphoblastoïdes de malade à 72 H est équivalent à ce qu'on observe chez le porteur asymptomatique, sujet I1 (Fig.47).



**Figure 48) Quantification de l'ARN *FECH* WT après transfection de nanocomplexes B2-9R/ASO.** La RT-qPCR exon1-exon2 après une transfection par les nanocomplexes B2-9R/ASO-V1 et B2-9R/ASO-Mock à 72 H dans la lignée lymphoblastoïde du patient PPE II1 ; Le sujet I1 est un porteur asymptomatique de la mutation délétère sans allèle hypomorphe. Les résultats sont analysés par le test Mann Whitney à partir de 6 expériences indépendantes.

La quantité d'ARN *FECH* WT dans des lymphoblastoïdes de malade (II1) transfectées par le nanocomplexe B2-9R/ASO-V1 commence à augmenter significativement par rapport aux cellules transfectées par B2-9R/ASO-Mock et les cellules non transfectées, 48 H après la transfection. L'effet d'ASO-V1 sur le niveau d'ARN commence à diminuer à partir de 72 H (Fig.48).



**Figure 49) Quantification de l'ARN *FECH* WT après transfection de nanocomplexes B18-PepFect14/ASO.** La RT-qPCR exon1-exon2 après une transfection par les nanocomplexes B18-PepFect14/ASO-V1 ou B18-PepFect14/ASO-Mock à 72 H dans la lignée lymphoblastoïde du patient PPE II1; Le sujet I1 est un porteur asymptomatique de la mutation délétère sans allèle hypomorphe. Les résultats sont analysés par le test Mann Whitney à partir de 6 expériences indépendantes.

La quantité d'ARN *FECH* WT dans des lymphoblastoïdes de malade (II1) transfectées par le nanocomplexe B18-PepFect14/ASO-V1 est augmentée de manière significative par rapport aux cellules transfectées par B18-PepFect14/ASO-Mock et les cellules non transfectées 72 H après la transfection. Ce niveau est équivalent à ce qu'on observe chez le porteur asymptomatique (Sujet I1). 96 H après la transfection l'effet persiste mais il est diminué (Fig.49).

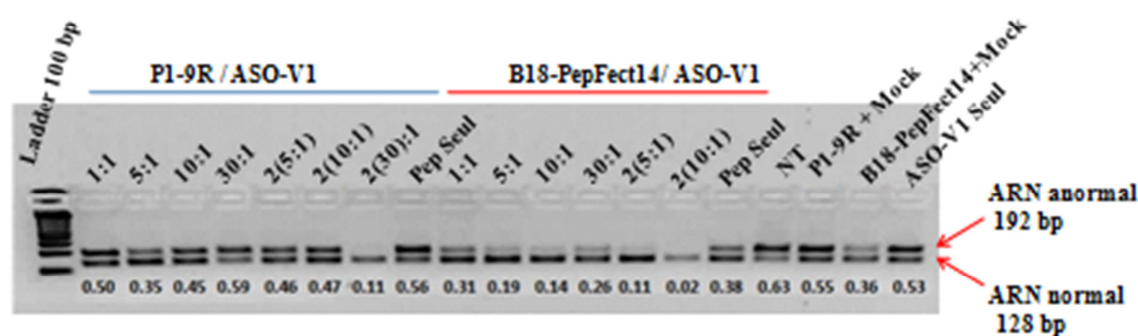
**Au total** nous avons pu montrer dans des lignées lymphoblastoïdes de malades PPE que plusieurs des peptides bifonctionnels utilisés permettaient une redirection efficace et prolongée de l'épissage cryptique vers l'épissage physiologique exon3-exon4 et que cela permettait une correction des taux d'ARN *FECH* WT. Parmi eux, les peptides P1-9R et B18-PepFect14, complexés avec l'ASO-V1, qui nous ont permis de restaurer un taux d'ARN *FECH* WT à niveau comparable à ce qu'on observe chez un porteur asymptomatique, nous semblent être les candidats potentiels pour notre approche. Ces résultats encourageant nous ont conduits à tester dans un premier temps cette méthode de transfection dans des cultures primaires de progéniteurs érythroïdes d'un sujet porteur de l'allèle hypomorphe c.315-48C.

#### **5- Etude de l'efficacité de la transfection de l'ASO-V1 par les peptides bifonctionnels ligand RTf1-CPP dans les progéniteurs érythroïdes d'un sujet porteur de l'allèle hypomorphe c.315-48C.**

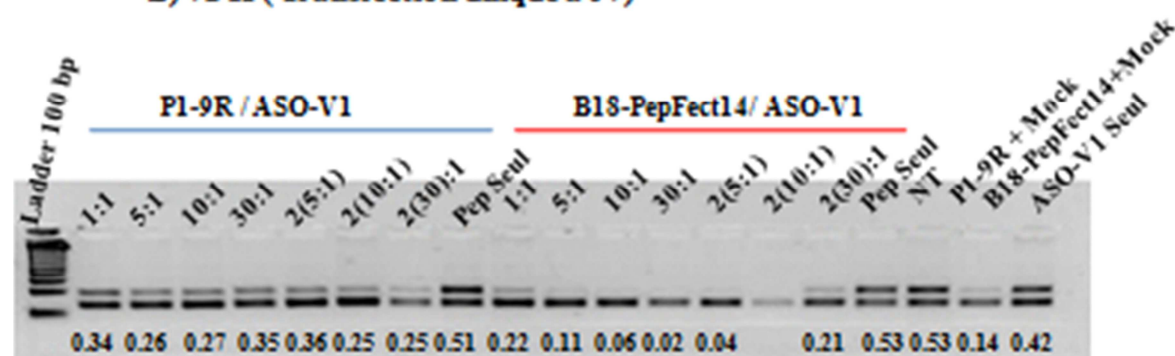
Nous avons testé *ex vivo* l'effet des nanocomplexes ligand RTf1-CPP appartenant à deux group de CPP différents et donnant de bons résultats dans les expériences sur les lignées, les peptides P1-9R et B18-PepFect14, sur l'épissage exon3-exon4 du gène *FECH* dans des progéniteurs CD34+ en différenciation érythroïde présentant un allèle hypomorphe mais sans mutation *FECH* délétère (Fig.50). Différents ratio de charges entre les peptides et ASOs ont été utilisés pour choisir le ratio de charge le plus faible permettant de diminuer les risques de toxicité tout en conservant une bonne efficacité. La quantité de peptide et d'ASO-V1 est multipliée par 2 pour les ratios de charges 2(5 :1), 2(10 :1) et 2(30 :1). Les peptides seuls sont administrés avec une concentration finale équivalente à un ratio de charge 10 :1. Les cellules sont divisées en deux séries 48 H après la première transfection à J7:

- 1- Les cellules avec une simple transfection à J7 (Transfection unique)
- 2- Les cellules qui ont reçu une deuxième transfection avec les mêmes peptides RTf1-CPP/ ASO à J9 et une troisième transfection à J11 (Transfection multiples)

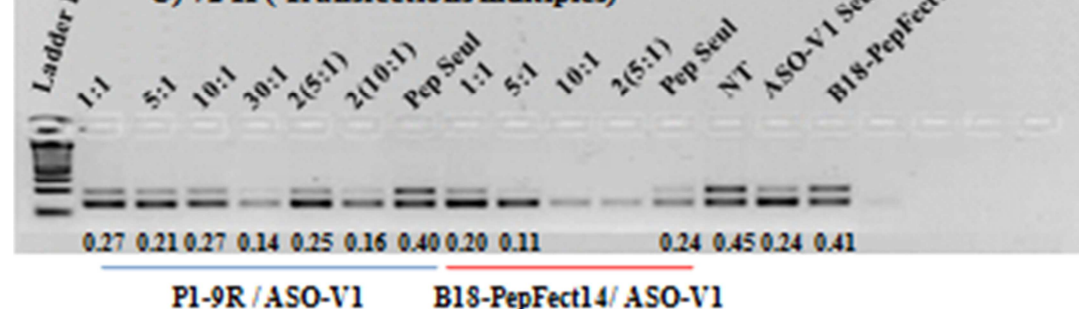
# A) 48 H

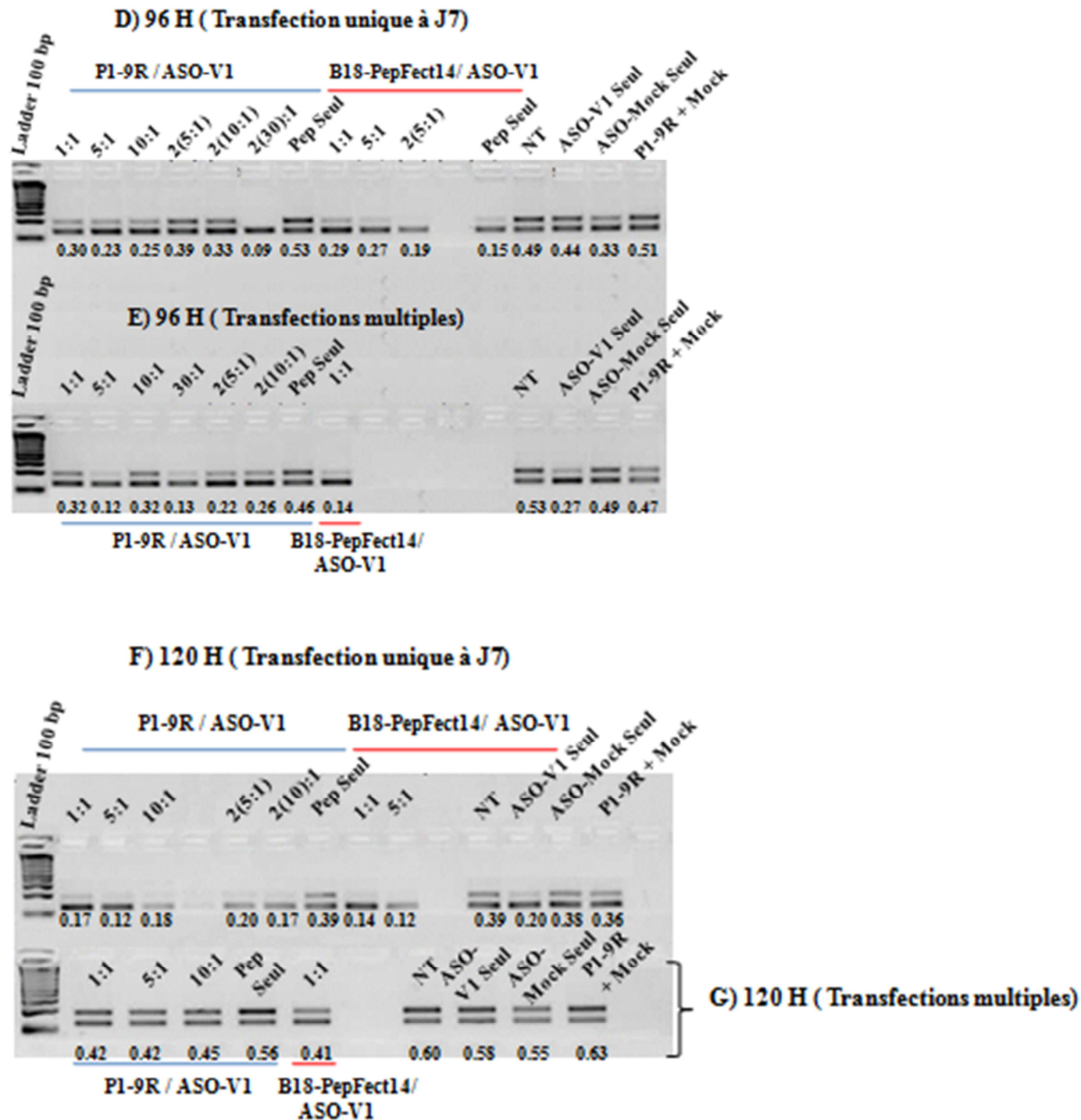


# B) 72 H ( Transfection unique à J7)



# C) 72 H ( Transfections multiples)





**Figure 50) Redirection de l'épissage du site cryptique vers le site physiologique exon3-exon4 par les nanocomplexes RTf1-CPP/ASO-V1 en culture de progéniteurs érythroïdes en différenciation d'un sujet porteur de l'allèle hypomorphe.** La RT-PCR exon3-exon4 à différents temps est réalisée après une transfection à J7 par des nanocomplexes RTf1-CPP/ASO-V1 à différents ratios de charge. Les peptides seuls sont administrés avec une concentration finale équivalente à un ratio de charge 10 :1. Les ratios de charge entre les peptides et l'ASO-Mock sont 10 :1. Les oligonucléotides sont à une concentration finale de 428 nM. Toutes les cellules sont transfectées à J7. Les cellules avec les transfections multiples sont re-transfectées par des nanocomplexes RTf1-CPP/ASO à J9 et J11. L'émétine est ajouté dans le milieu 24 H avant de collecter les cellules pour extraire l'ARN.

Pour la série avec les transfections multiples, le renouvellement de la transfection a entraîné une forte toxicité et la mort cellulaire. C'est pour cette raison que nous n'avons pas pu isoler l'ARN à partir des cellules re-transfectées par des nanocomplexes à des ratios de charge élevés, en particulier celles re-transfectées par les nanocomplexes B18-PepFect14/ASO-V1. Par contre, la toxicité avec une simple transfection à J7 est très faible. Dans ces cellules, une redirection efficace de l'épissage commence à partir de 48 H après la transfection et dure jusqu'à 120 H. Au total, l'efficacité de correction d'épissage est plus forte avec des peptides possédant un CPP PepFect14 mais la toxicité est aussi plus élevée par rapport à un peptide ayant un CPP 9R.

L'aptitude à transfecter des progéniteurs érythroïdes CD34+ en différenciation qui sont connus pour être des cellules très difficiles à transfecter et qui nécessitent des vecteurs viraux, est un résultat important qui nous a encouragés à essayer notre approche d'adressage dans des progéniteurs érythroïdes des patients PPE.

#### **6- Etude de l'efficacité de la transfection de l'ASO-V1 par les peptides bifonctionnels RTf1-CPP précédemment sélectionnés, dans les progéniteurs érythroïdes de malade PPE.**

Finalement, nous avons testé *ex vivo* l'effet des nanocomplexes RTf1-9R/ASO-V1 sur la correction de l'épissage exon3-exon4, le niveau d'ARN *FECH* WT et la surproduction de PPIX dans des progéniteurs CD34+ en différenciation érythroïde présentant un allèle hypomorphe en trans d'une mutation délétère *FECH*. Nous avons observé que B18-PepFect14/ASO-V1 a induit une toxicité élevée dans des cultures primaires de CD34+ d'un sujet porteur de l'allèle hypomorphe (Fig.50). Nous avons donc décidé de tester uniquement les peptides P1-9R et B2-9R sur les cellules de patients.

Toutes les expériences effectuées dans des progéniteurs érythroïdes de malades PPE sont effectuées en 6 répliques intra-séries pour chaque condition. Les cellules sont transfectées une fois à J9. Les nombres des cellules et leurs viabilités sont déterminées par le bleu trypan à J11. Elles sont ensuite remises à 200 000 cellules/ml. La densité des bandes de PCR qualitative est mesurée en utilisant le logiciel Image J. Les analyses statistiques de la quantité d'ARN *FECH* WT et la surproduction de PPIX sont effectuées par le test Mann-Whitney à partir des 6 répliques intra-séries.

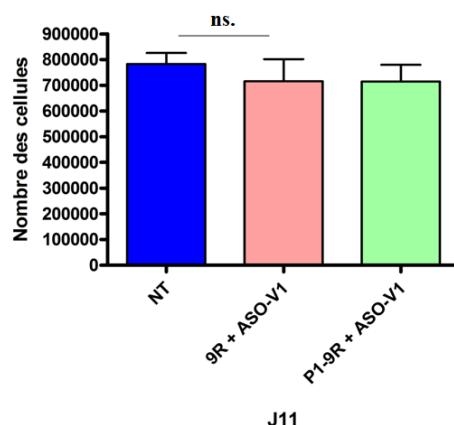
Concernant la mesure de la surproduction de PPIX, nous avons choisi la cytométrie en flux plutôt que la méthode fluorimétrique après hémolyse et extraction des porphyrines car nous avons observé une concordance entre les résultats de la mesure de PPIX par le test



fluorimétrie et la cytométrie en flux respectivement dans les érythrocytes et les progéniteurs érythroïdes en différenciation issus de même sujet malade. Il est également nécessaire d'effectuer le test fluorimétrique avec une quantité importante de cellules.

- **Patient A**

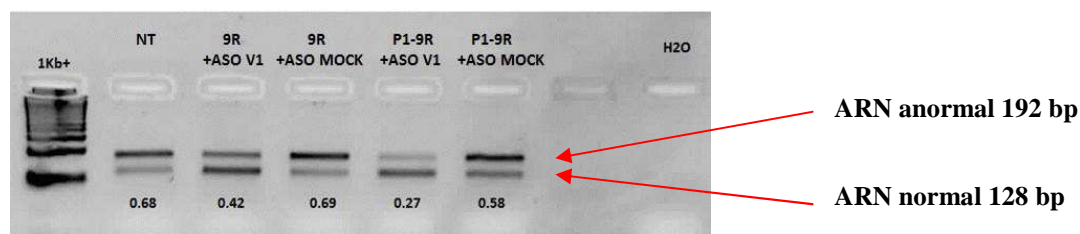
**a) Impact des nanocomplexes Peptide/ASO sur la prolifération et la viabilité des cellules**



**Figure 51) Impact des nanocomplexes Peptide/ASO sur la prolifération des cellules après la transfection de progéniteurs érythroïdes d'un malade PPE (Sujet A).** Le test de prolifération est effectué par le bleu trypan à J11, deux jours après une transfection à J9 avec des nanocomplexes peptides/ASOs, peptides seuls et ASO-V1 seul dans les progéniteurs érythroïdes en différenciation d'un malade PPE (Sujet A).

Les viabilités des cellules non transfectées et transfectées par 9R/ASO-V1 et P1- 9R/ASO-V1 à J11 varient de 75% à 95%. Les nombres des cellules sont diminués de manière non significative dans des conditions transfectées par 9R/ASO-V1 et P1- 9R/ASO-V1 deux jours après la transfection à J11 (Fig.51).

**b) Redirection de l'épissage exon3-exon4 du site cryptique vers le site physiologique**

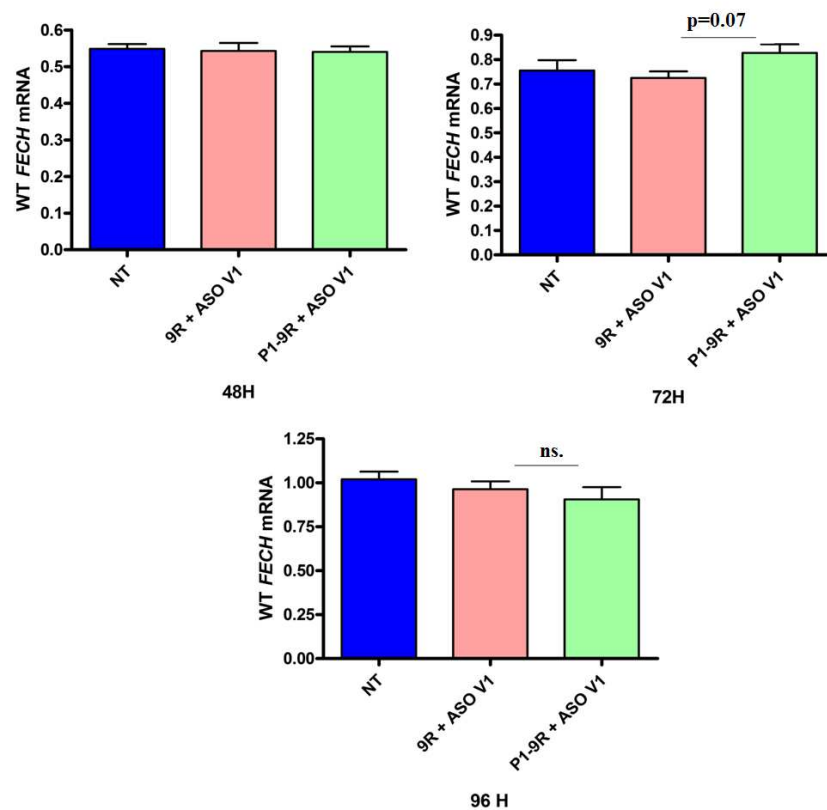


**Figure 52) Redirection de l'épissage exon3-exon4 du site cryptique vers le site physiologique après transfection de progéniteurs érythroïdes d'un patient PPE (Sujet A).** La RT-PCR qualitative exon3-exon4 est effectuée 72 H après une transfection à J9 avec des nanocomplexes P1-9R/ASO et 9R/ASO dans les progéniteurs érythroïdes en

différenciation d'un malade PPE (A). L'évétine est ajoutée dans le milieu à une concentration finale de 30  $\mu$ M, 24 H avant la collecte des cellules et l'extraction d'ARN.

Nous avons observé que le ratio entre ARN anormale et l'ARN total était plus faible pour P1-9R/ASO-V1 par rapport à celui de P1-9R/ASO-Mock. Par conséquent, la correction d'épissage exon3-exon4 du gène *FECH* est plus élevée dans des cellules transfectées par P1-9R/ASO-V1 par rapport aux cellules transfectées par P1-9R/ASO-Mock (Fig.52). Il existe une légère diminution de la proportion de l'ARNm anormal avec 9R/ASO-V1 mais elle est plus faible qu'avec P1-9R/ASO-V1. Cela confirme la spécificité des peptides ayant le ligand ciblant RTf1 par rapport aux peptides 9R seuls.

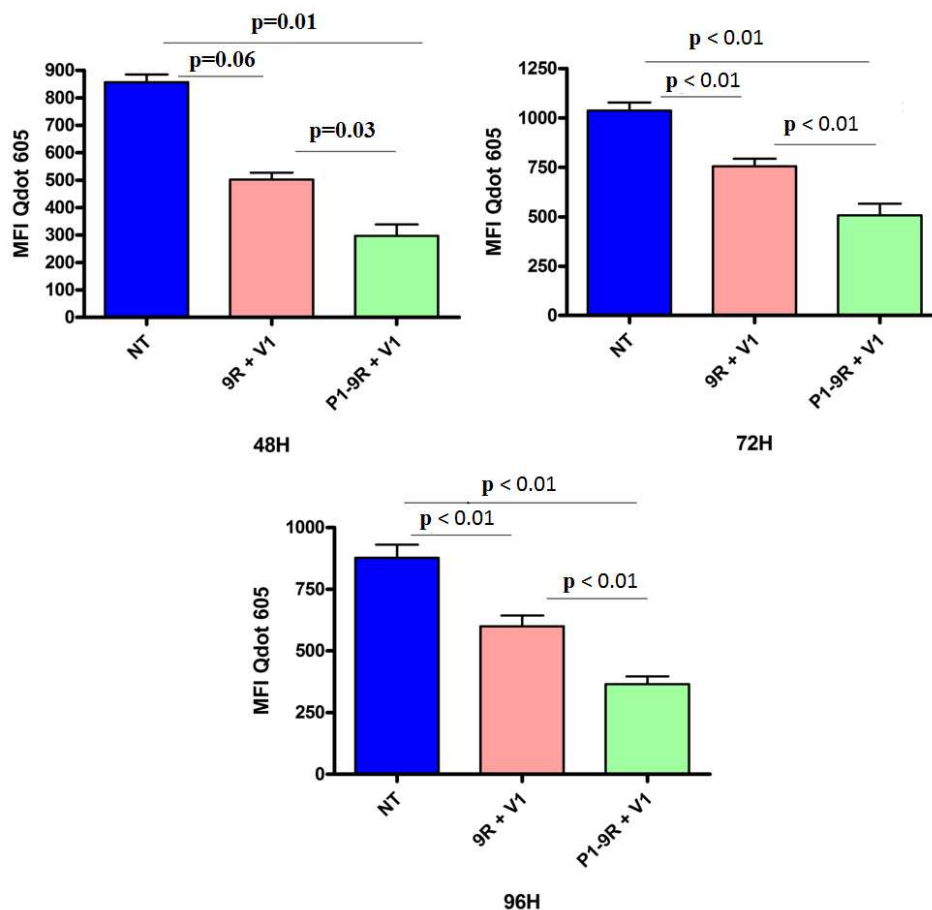
### c) Quantité d'ARN *FECH* WT



**Figure 53) Augmentation de la quantité d'ARN *FECH* WT après la redirection de l'épissage exon3-exon4 du site cryptique vers le site physiologique dans des progéniteurs érythroïdes d'un malade PPE (Sujet A).** Les RT-qPCR exon1-exon2 sont effectuées 48 H, 72 H et 96 H après une transfection à J9 avec des nanocomplexes P1-9R/ASO-V1 et 9R/ASO-V1 dans des progéniteurs érythroïdes en différenciation d'un malade PPE (Sujet A).

La quantité d'ARN *FECH* WT est augmentée de manière non significative dans des cellules transfectées par P1-9R/ASO-V1 par rapport aux cellules non transfectées, 72 H après la transfection (Fig.53).

#### d) Mesure de la production de PPIX

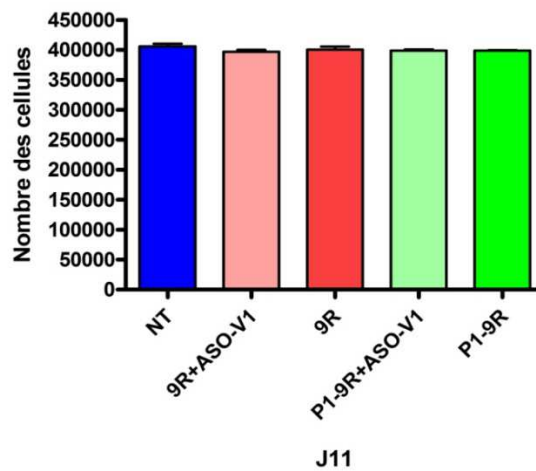


**Figure 54) Mesure de la production de la PPIX après une redirection de l'épissage exon3-exon4 du site cryptique vers le site physiologique dans des progéniteurs érythroïdes d'un malade PPE (Sujet A).** Les mesures de la production de PPIX dans des progéniteurs érythroïdes en différenciation d'un malade PPE sont effectuées par cytométrie en flux à 48 H, 72 H et 96 H après une transfection à J9 par des nanocomplexes P1-9R/ASO-V1 et 9R/ASO-V1.

Le niveau d'accumulation de PPIX est diminué de manière significative dans des cellules transfectées par P1-9R/ASO-V1 par rapport aux cellules non transfectées 48 H, 72 H et 96 H après la transfection (Fig.54). On peut conclure qu'une légère augmentation au niveau d'ARN *FECH* WT pourrait être à l'origine de la diminution significative et prolongée de l'accumulation de la PPIX.

- Patient B

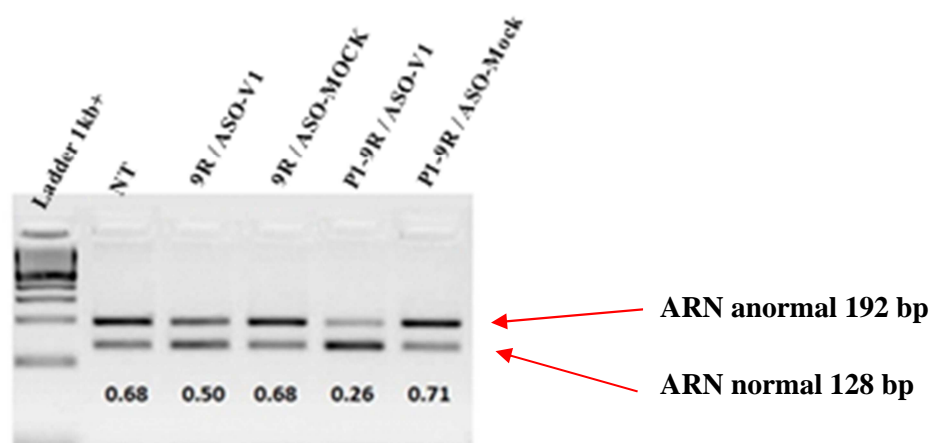
a) Impact des nanocomplexes Peptide/ASO sur la prolifération et la viabilité des cellules



**Figure 55) Impact des nanocomplexes Peptide/ASO sur la prolifération des cellules après la transfection de progéniteurs érythroïdes d’une malade PPE (Sujet B).** Le test de prolifération est effectué par le bleu trypan à J11, deux jours après une transfection à J9 par des nanocomplexes peptides/ASOs et les peptides seuls dans les progéniteurs érythroïdes en différenciation d’un malade PPE (Sujet B).

Les viabilités des cellules non transfectées et transfectées par 9R/ASO-V1, 9R seul, P1-9R/ASO-V1 et P1-9R seul à J11 varient de 80% à 95%. Les nombres des cellules sont identiques entre les conditions deux jours après la transfection à J11 (Fig.55). Cela indique que ces peptides n’induisent pas de toxicité importante et la mort cellulaire à un ratio de charge 5 :1.

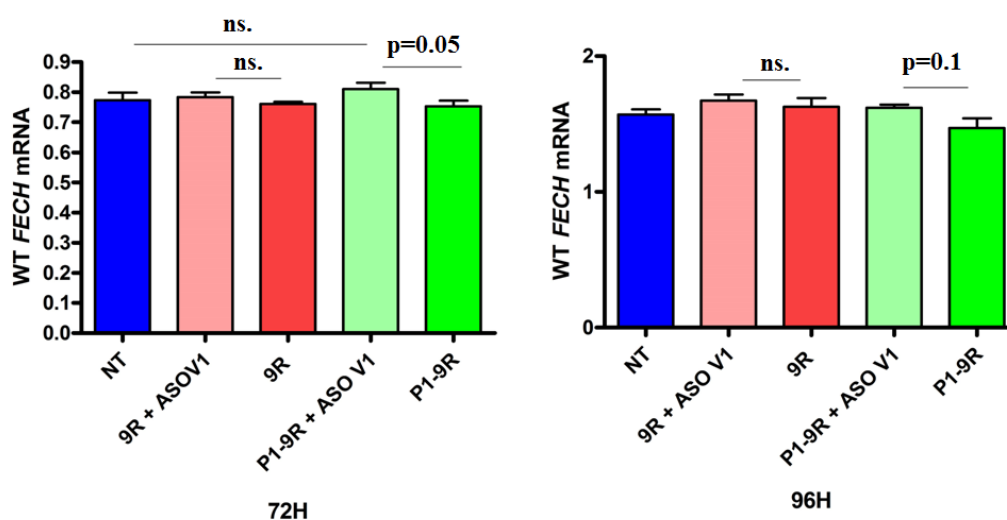
## b) Redirection de l'épissage exon3-exon4 du site cryptique vers le site physiologique



**Figure 56) Redirection de l'épissage exon3-exon4 du site cryptique vers le site physiologique après transfection de progéniteurs érythroïdes d'un patient PPE (Sujet B).** La RT-PCR qualitative exon3-exon4 est effectuée 72 H après une transfection à J9 avec des nanocomplexes P1-9R/ASO et 9R/ASO dans des progéniteurs érythroïdes en différenciation d'un malade PPE (B). L'émétine est ajoutée dans le milieu à une concentration finale de 30  $\mu$ M, 24 H avant la collecte des cellules et l'extraction d'ARN.

La correction d'épissage exon3-exon4 du gène *FECH* est plus élevée dans des cellules transfectées par P1-9R/ASO-V1 par rapport aux cellules transfectées par 9R/ASO-V1.

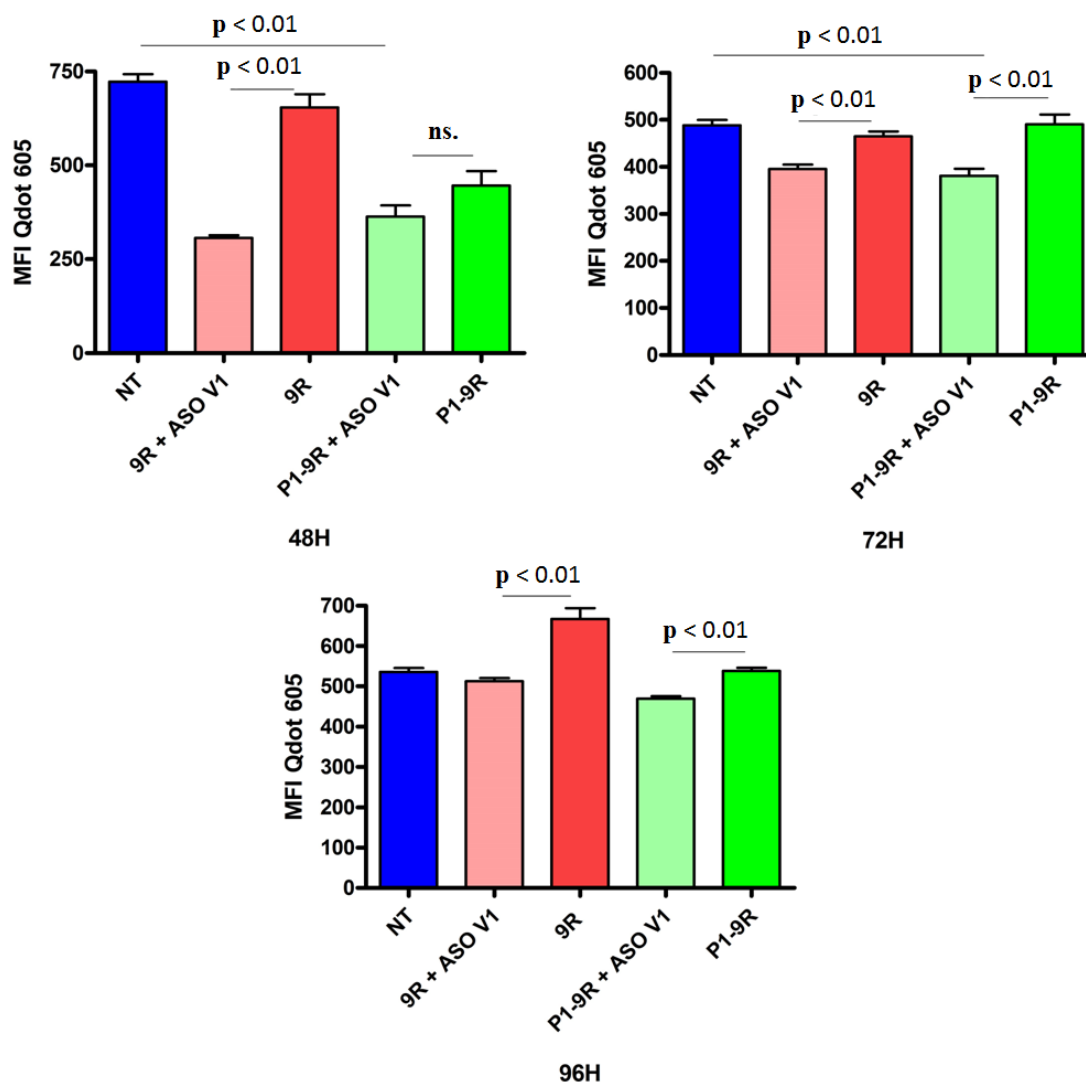
## c) Quantité d'ARN *FECH* WT



**Figure 57) Augmentation de la quantité d'ARN *FECH* WT après la redirection de l'épissage exon3-exon4 du site cryptique vers le site physiologique dans des progéniteurs érythroïdes d'un malade PPE (Sujet B).** Les RT-qPCR exon1-exon2 sont effectuées 72 H et 96 H après une transfection à J9 avec des nanocomplexes P1-9R/ASO-V1 et 9R/ASO-V1 dans des progéniteurs érythroïdes en différenciation d'un malade PPE (Sujet B).

72 H et 96 H après la transfection, on observe une légère augmentation non significative du niveau d'ARN *FECH* WT dans des cellules transfectées par P1-9R/ASO-V1 par rapport aux cellules transfectées par P1-9R seul (Fig.57).

#### d) Mesure de la production de PPIX



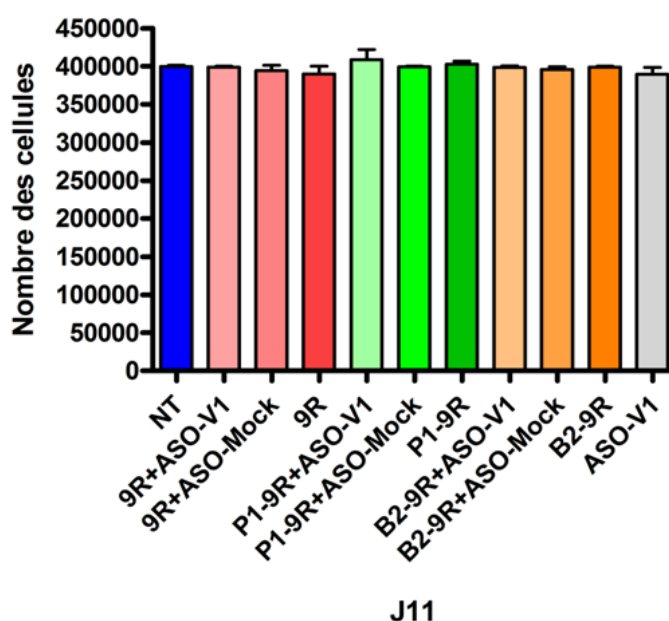
**Figure 58) Mesure de la PPIX après une redirection de l'épissage exon3-exon4 du site cryptique vers le site physiologique dans des progéniteurs érythroïdes d'un malade PPE (Sujet B).** Les mesures de PPIX dans des progéniteurs érythroïdes d'un malade PPE sont effectuées par la cytométrie en flux à 48 H, 72 H et 96 H après une transfection à J9 par des nanocomplexes P1-9R/ASO-V1 et 9R/ASO-V1 dans des progéniteurs érythroïdes en différenciation d'un malade PPE (Sujet B).

Le niveau d'accumulation de PPIX est diminuée dans des cellules transfectées par 9R/ASO-V1, P1-9R/ASO-V1 par rapport aux cellules non transfectées ou transfectées par 9R seul et P1-9R seul 48 H, 72 H et 96 H après la transfection (Fig.58).

- **Patient C**

**a) Impact des nanocomplexes Peptide/ASO sur la prolifération et la viabilité des cellules**

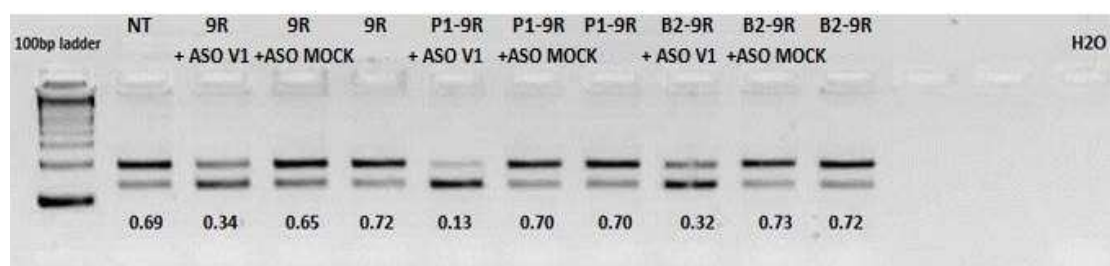
Les cellules de patient C proliféraient particulièrement bien et nous avons pu faire plus de conditions expérimentales.



**Figure 59) Impact des nanocomplexes Peptide/ASO sur la prolifération des cellules après la transfection de progéniteurs érythroïdes d'un malade PPE (Sujet C).** Le test de prolifération est effectué par le bleu trypan à J11, deux jours après une transfection à J9 par des nanocomplexes P1-9R/ASO, P1-9R seuls, B2-9R/ASO, B2-9R seul, 9R/ASO, 9R seul et ASO-V1 seul dans des progéniteurs érythroïdes en différenciation d'un malade PPE (Sujet C).

Les viabilités des cellules non transfectées et transfectées par 9R/ASO-V1, 9R seul, P1-9R/ASO-V1, P1-9R seul et ASO-V1 seul à J11 varient de 77% à 96%. Les nombres des cellules sont quasiment identiques entre toutes les conditions deux jours après la transfection (Fig.59). On peut conclure que le peptide B2-9R n'induit pas de toxicité majeure à un ratio de charge 5 :1, comme ce que nous avons observé pour le peptide P1-9R.

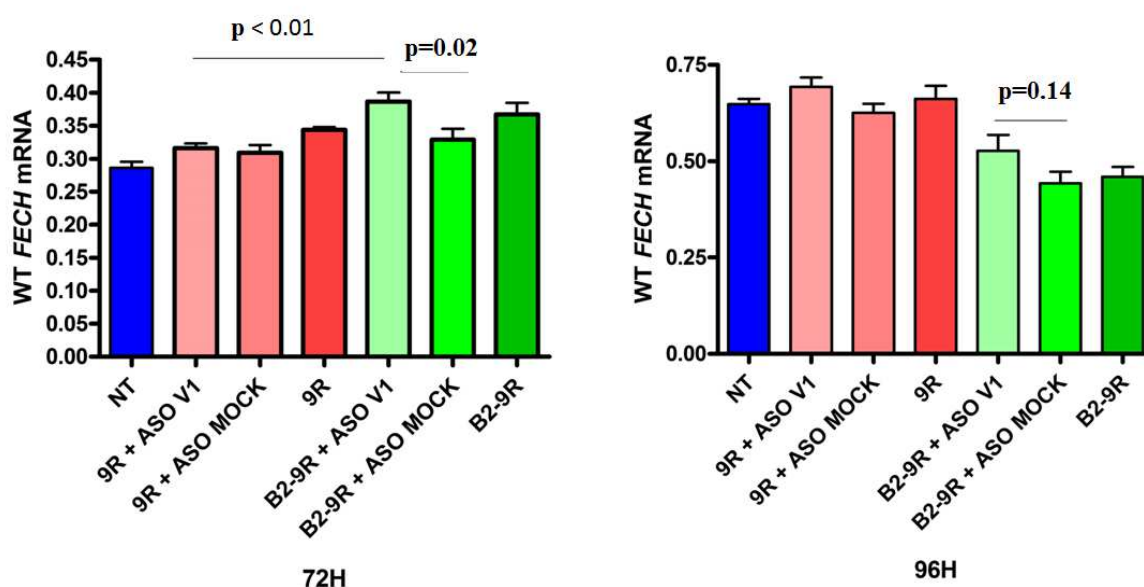
## b) Redirection de l'épissage exon3-exon4 du site cryptique vers le site physiologique



**Figure 60) Redirection de l'épissage exon3-exon4 du site cryptique vers le site physiologique après transfection de progéniteurs érythroïdes d'un patient PPE (Sujet C).** La RT-PCR qualitative exon3-exon4 est effectuée 72 H après une transfection à J9 avec des nanocomplexes P1-9R/ASO, B2-9R/ASO et 9R/ASO dans les progéniteurs érythroïdes en différenciation d'un malade PPE (C). L'émétine est ajoutée dans le milieu à une concentration finale de 30  $\mu$ M, 24 H avant la collecte des cellules et l'isolation d'ARN.

La correction de l'épissage exon3-exon4 du gène *FECH* est plus efficace dans des cellules transfectées par P1-9R/ASO-V1 par rapport aux cellules transfectées par B2-9R/ASO-V1 et 9R/ASO-V1 (Fig.60). Le peptide P1-9R est donc le meilleur candidat pour un adressage spécifique aux progéniteurs érythroïdes en différenciation.

## c) Quantité d'ARN *FECH* WT, Peptide B2-9R

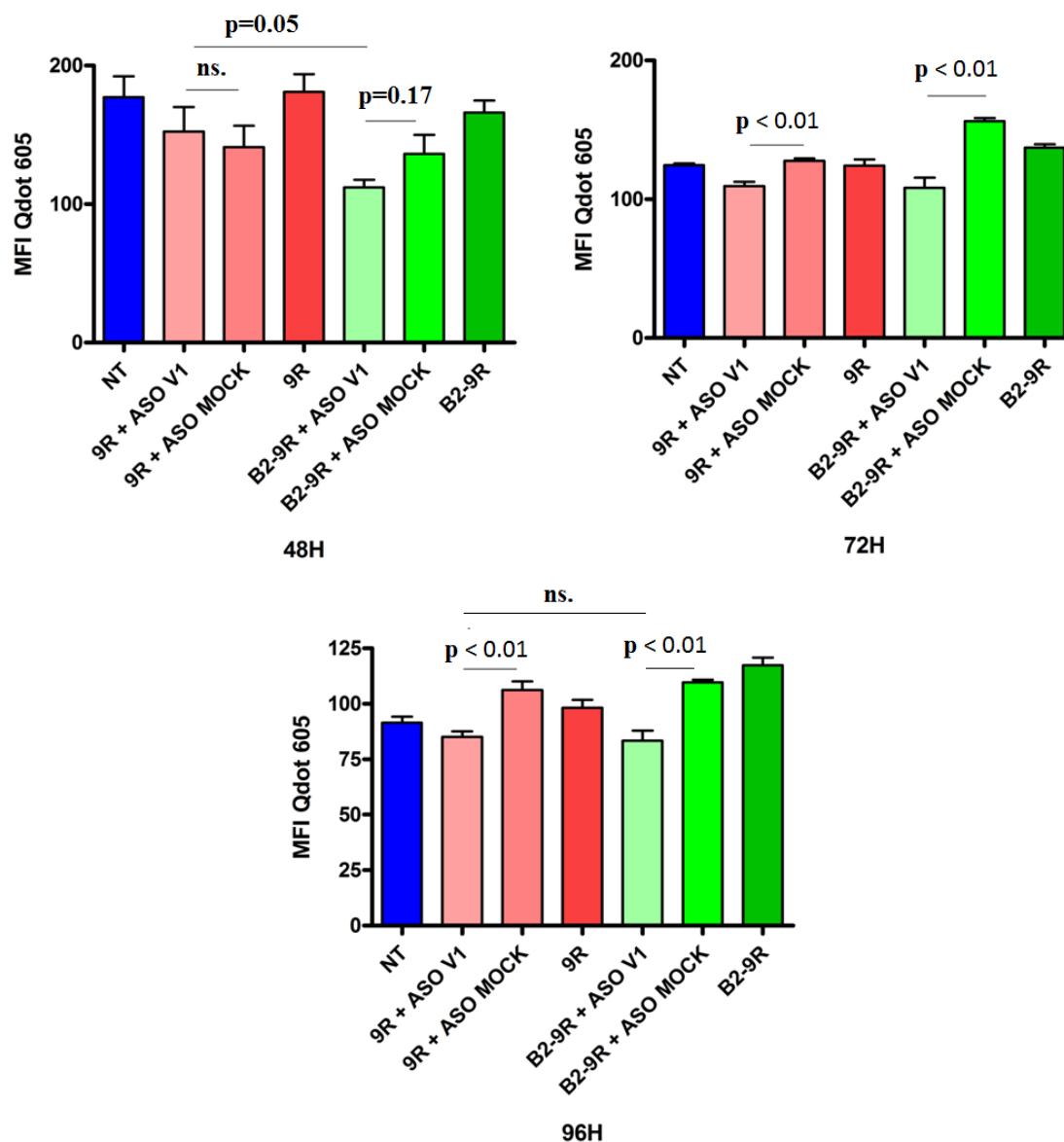


**Figure 61) Augmentation de la quantité d'ARN *FECH* WT après la redirection de l'épissage exon3-exon4 du site cryptique vers le site physiologique dans des progéniteurs érythroïdes d'un malade PPE (Sujet C).** Les RT-qPCR exon1-exon2 sont effectuées 72 H et 96 H après une transfection à J9 avec des nanocomplexes B2-9R/ASO, 9R/ASO, B2-9R seul et 9R seul dans les progéniteurs érythroïdes en différenciation d'un malade PPE (Sujet C).



La quantité d'ARN *FECH* WT est augmentée de manière significative dans des cellules transfectées par B2-9R/ASO-V1 par rapport aux cellules non transfectées, les cellules transfectées par B2-9R/ASO-Mock et 9R/ASO-V1 à 72 H après la transfection. À 96 H, le niveau d'ARN est toujours augmenté de manière significative dans des cellules transfectées par B2-9R/ASO-V1 par rapport aux cellules transfectées par B2-9R/ASO-Mock (Fig.61).

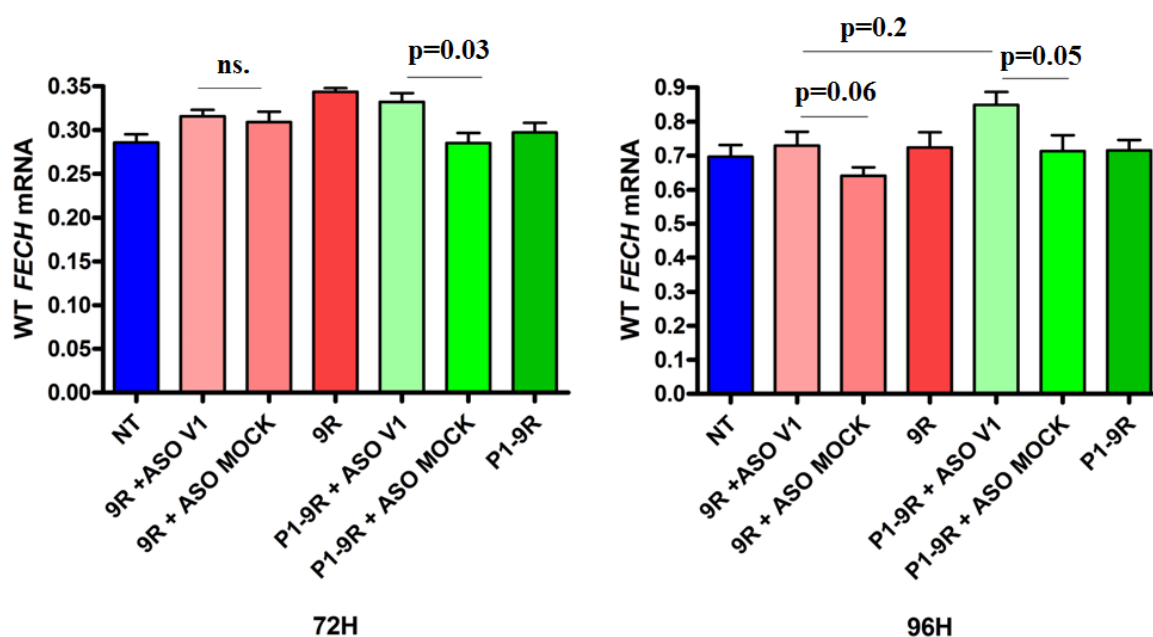
#### d) Mesure de la production de PPIX, Peptide B2-9R



**Figure 62) Mesure de la production de PPIX après une redirection de l'épissage exon3-exon4 du site cryptique vers le site physiologique dans des progéniteurs érythroïdes d'un malade PPE (Sujet C).** Les mesures de PPIX sont effectuées par cytométrie en flux à 48 H, 72 H et 96 H après une transfection à J9 avec des nanocomplexes B2-9R/ASO, 9R/ASO, B2-9R seul et 9R seul dans les progéniteurs érythroïdes en différenciation d'un malade PPE (Sujet C).

Le niveau d'accumulation de PPIX est diminué de manière significative dans des cellules transfectées par B2-9R/ASO-V1 par rapport aux cellules transfectées par B2-9R/ASO-Mock 48 H, 72 H et 96 H après la transfection. On observe que dans des cellules transfectées par 9R/ASO-V1, le niveau d'accumulation de PPIX à 48 H après la transfection est plus élevé par rapport aux cellules transfectées par B2-9R/ASO-V1 (Fig.62). Cela confirme l'importance de la partie ligand RTf1 pour établir un adressage plus spécifique.

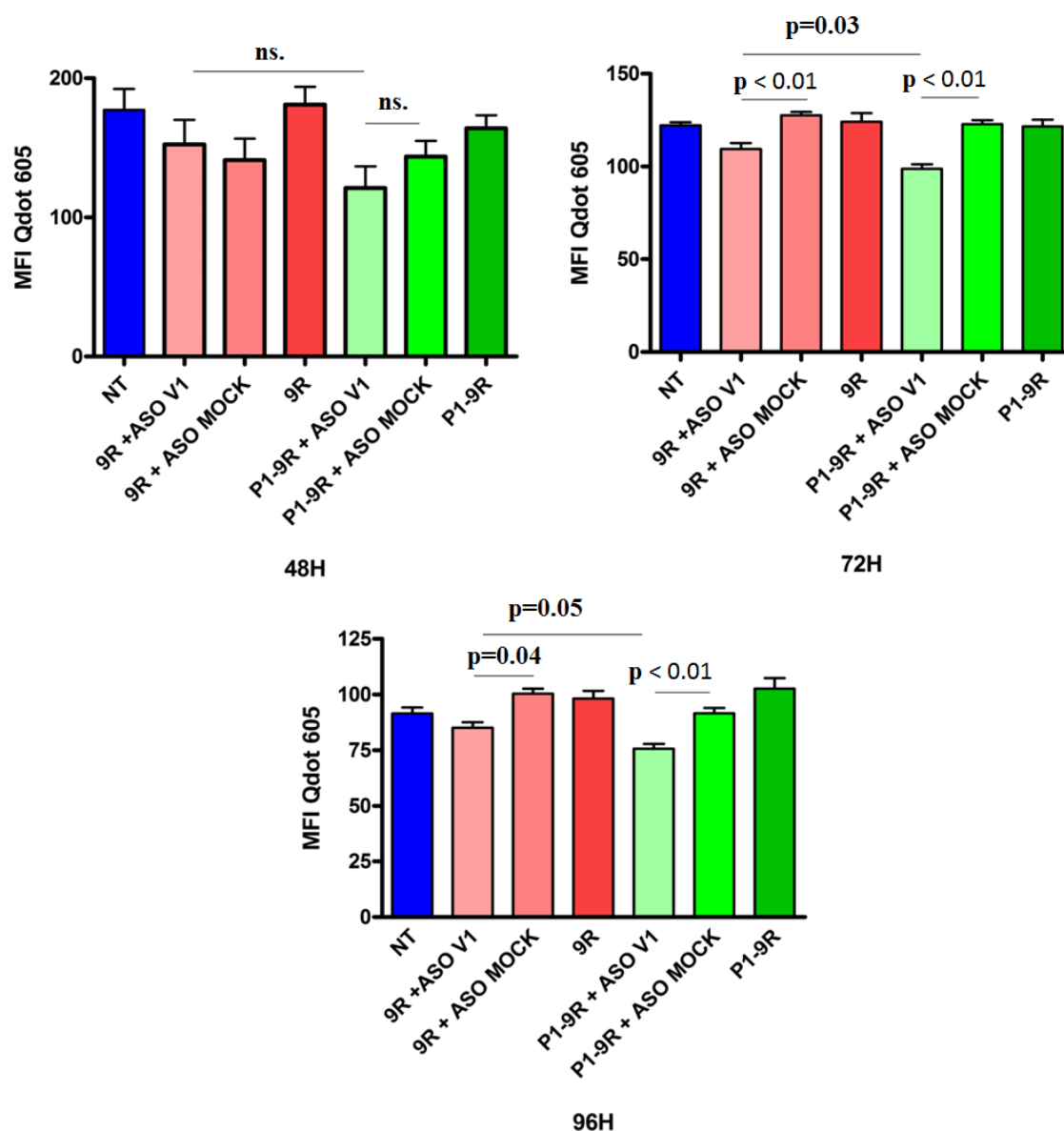
#### e) Quantité d'ARN *FECH* WT, Peptide P1-9R



**Figure 63) La quantité d'ARN *FECH* WT après la redirection de l'épissage exon3-exon4 du site cryptique vers le site physiologique dans des progéniteurs érythroïdes d'un malade PPE (Sujet C).** Les RT-qPCR exon1-exon2 sont effectuées 72 H et 96 H après une transfection à J9 avec des nanocomplexes P1-9R/ASO, 9R/ASO, P1 seul et 9R seul dans les progéniteurs érythroïdes en différenciation d'un malade PPE (Sujet C).

La quantité d'ARN *FECH* WT est augmentée de manière significative dans des cellules transfectées par P1-9R/ASO-V1 par rapport aux cellules transfectées par P1-9R/ASO-Mock, 72 H après la transfection. Le nanocomplexe 9R/ASO-V1 ne présente pas la même efficacité que le nanocomplexe P1-9R/ASO-V1 à 72 H, alors qu'à 96 H son effet augmente mais reste toujours plus faible par rapport à P1-9R/ASO-V1 (Fig.63).

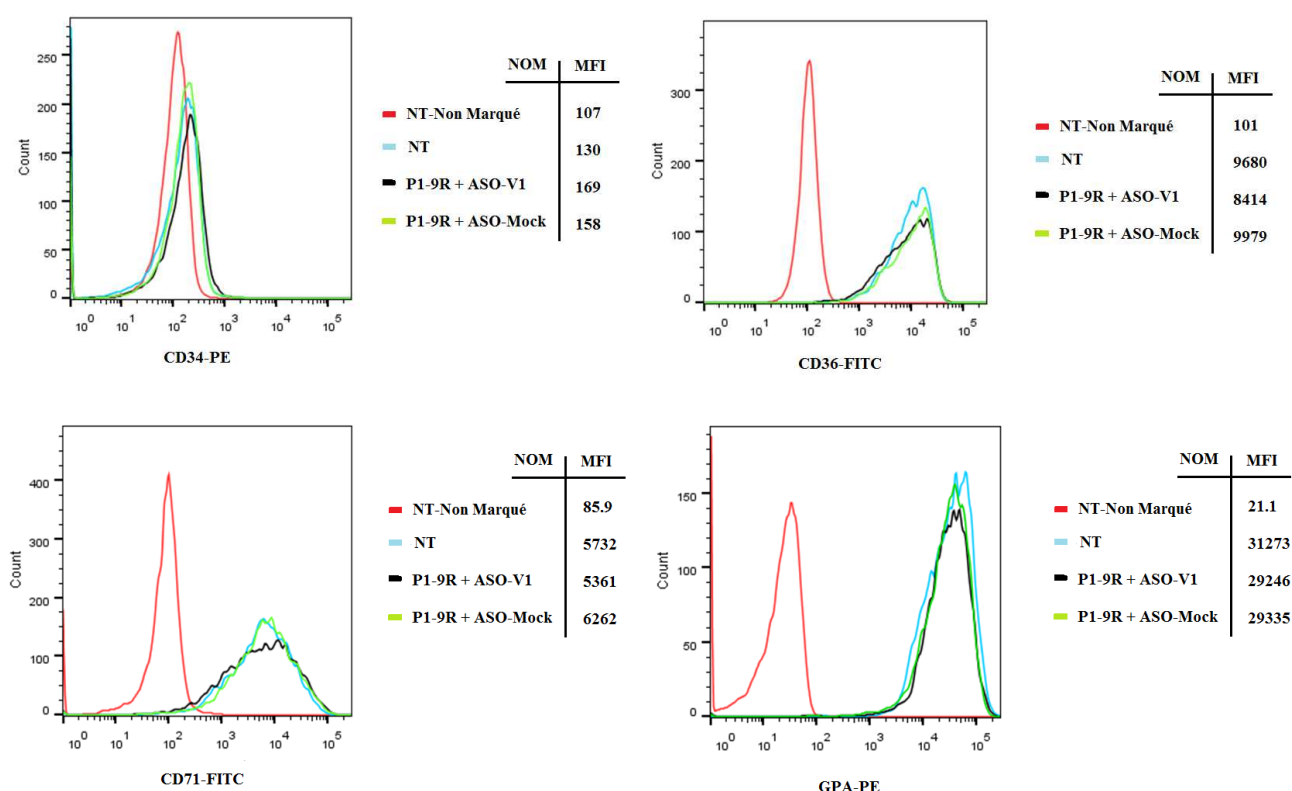
#### f) Mesure de la production de PPIX, Peptide P1-9R



**Figure 64) Mesure de la production de PPIX après une redirection de l'épissage exon3-exon4 du site cryptique vers le site physiologique dans des progéniteurs érythroïdes d'un malade PPE (Sujet C).** Les mesures de PPIX sont effectuées par cytométrie en flux à 48 H, 72 H et 96 H après une transfection à J9 avec des nanocomplexes P1-9R/ASO, 9R/ASO, P1-9R seul et 9R seul dans les progéniteurs érythroïdes en différenciation d'un malade PPE (Sujet C).

Le niveau d'accumulation de PPIX est diminué de manière significative dans des cellules transfectées par P1-9R/ASO-V1 par rapport aux cellules transfectées par P1-9R/ASO-Mock 72 H et 96 H après la transfection. On observe que dans des cellules transfectées par 9R/ASO-V1, le niveau d'accumulation de PPIX à 48 H, 72 H et 96 H reste toujours plus élevé par rapport aux cellules transfectées par P1-9R/ASO-V1 (Fig.64).

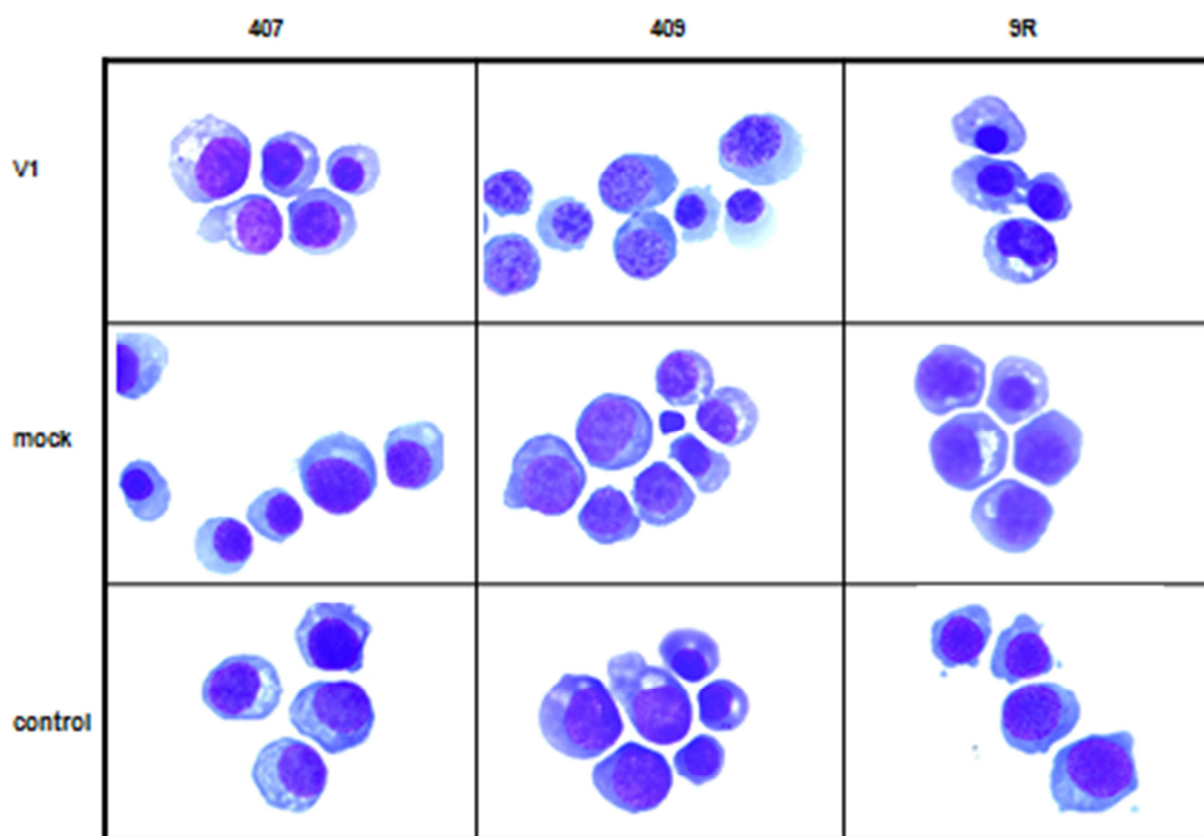
### g) Etude phénotypique de la différenciation érythroïde, Peptide P1-9R



**Figure 65) Effet des nanocomplexes P1-9R/ASOs sur la différenciation érythroïde dans des progéniteurs érythroïdes d'un malade PPE(C).** Les marquages phénotypiques des cellules érythroïdes primaires avec des anticorps CD34-PE, CD36-FITC, CD71-FITC et GPA-PE sont étudiés à J12, par cytométrie en flux, pour les cellules transfectées par les nanocomplexes P1-9R/ASO-V1 et P1-9R/ASO-Mock. Les cellules NT-Non marquées présentent des cellules non transfectées par les nanocomplexes sans aucun marquage par les anticorps. Par contre, Les NTs sont des cellules non transfectées par les nanocomplexes mais marquées par les anticorps correspondants.

Les marquages phénotypiques de la différenciation érythroïde sont déterminés à J12 dans des progéniteurs érythroïdes en différenciation du dernier patient (C). Les cellules étant en phase terminale d'érythropoïèse, elles n'expriment pas le marqueur phénotypique CD34. Par contre, les marqueurs phénotypiques CD36, CD71 et GPA s'expriment fortement et de manière équivalente dans les cellules non transfectées, transfectées par P1-9R/ASO-V1 et P1-9R/ASO-Mock (Fig.65).

## h) Morphologies des cellules, P1-9R et B2-9R



**Figure 66) Effet de nanocomplexe peptide/ASOs sur la différenciation érythroïde dans des progéniteurs érythroïdes d'un malade PPE(C).** La morphologie des cellules transfectées par les nanocomplexes P1-9R/ASOs, B2-9R/ASOs et 9R/ ASOs, P1-9R seul, B2-9R seul et 9R seul, ASO-V1 seul et ASO-Mock seul est étudiée à J12. Les cellules sont étalées sur les lames à l'aide d'une centrifugeuse Cytospin. Après une coloration MGG (May-Grünwald-Giemsa), les cellules sont observées par la microscopie optique avec un grossissement 100 X.

Au cours de la différenciation érythroïde on observe une réduction progressive de la taille cellulaire, de la taille du noyau et du rapport nucléo-cytoplasmique ainsi qu'une condensation progressive de la chromatine et une hémoglobinisation progressive des cellules. Après la coloration des cellules au MGG (May-Grünwald Giemsa), nous avons observé que la plupart des cellules venant de différentes conditions appartiennent au même stade de différenciation et sont situées majoritairement entre le stade érythroblaste basophile II et le stade érythroblaste polychromatophile (Fig.66). Cette observation confirme les résultats obtenus par la mesure d'expression des marqueurs phénotypiques des cellules au cours de la différenciation érythroïde, car à ce stade elles sont censées exprimer GPA, RTf1 (CD71) pour

importer du fer et le marqueur CD36 qui est exprimé jusqu'au stade polychromatophile inclus (Fig.65).

**Pour conclure**, nous avons étudié l'efficacité sur l'épissage cryptique exon3-exon4 du gène *FECH* de 10 peptides ligands RTf1 différents conjugués de manière covalente soit à un CPP 9R soit à un CPP PepFect14 (Tableau 9) complexés avec l'ASO-V1 ou l'ASO-Mock, à différents ratios de charge dans des lignées lymphoblastoïdes de patients PPE. Nous avons choisi les peptides qui ont présenté une bonne efficacité de correction de l'épissage à des ratios de charge les plus bas pour éviter les risques de toxicité. Nous avons ensuite testé l'effet des nanocomplexes sélectionnés sur le niveau d'ARN *FECH* WT dans des lignées lymphoblastoïdes de patients PPE. Nous avons choisi les peptides permettant augmenter l'ARN *FECH* WT à un niveau équivalant à ce qu'on observe dans des lignées lymphoblastoïdes d'un porteur asymptomatique.

Nous avons ensuite testé ces peptides complexés à l'ASO-V1 dans des progéniteurs érythroïdes CD34+ en différenciation d'un porteur de l'allèle hypomorphe et nous avons observé que dans ces cellules le peptide ayant un CPP 9R corrige efficacement l'épissage exon3-exon4 et est moins toxique par rapport à peptide avec un CPP PepFect14.

Par conséquent, Nous avons testé uniquement les peptides P1-9R et B2-9R complexés à ASO-V1 dans des progéniteurs érythroïdes CD34+ en différenciation de patients PPE. Nous avons pu corriger l'épissage cryptique exon3-exon4, augmenter la quantité d'ARN *FECH* WT et diminuer l'accumulation de la PPIX sans induire une toxicité importante chez les patients. La morphologie des cellules et le test de la différenciation chez le dernier patient montrent que les cellules ont été maintenues au même stade de différenciation tout au long de l'expérience quel que soit la condition expérimentale.

Nous avons ensuite étudié la taille hydrodynamique et la charge de surface de nanocomplexe P1-9R/ASO-V1 à différents ratio de charge qui affecteront le niveau de protection de l'ASO-V1 par le peptide ainsi que la stabilité des nanocomplexes. Ces informations sont nécessaires pour la suite de projet qui consistera à apporter la preuve de concept *in vivo*, de cette stratégie adressage.

## 7- Mesure de la taille des nanocomplexes par DLS et de leur potentiel zêta

Pour mesurer la taille hydrodynamique et la stabilité des nanocomplexes P1-9R/ASO-V1, l'analyse par DLS et le potentiel zêta sont effectués respectivement par l'appareil DynaPro et Zetasizer Nano ZS apparatus. Ces évaluations sont réalisées dans l'eau, du PBS et du milieu  $\alpha$ MEM en présence de 10% du sérum pour permettre d'étudier des corrélations possibles entre tels paramètres et l'efficacité de transfection aux conditions physiologiques. Dans les analyses effectuées dans de l'eau, la taille des nanocomplexes P1-9R/ASO-V1 est mesurée à différents ratios de charge, en partant soit d'une concentration fixe d'ASO-V1 et en ajoutant le peptide à différentes quantités, soit en partant du peptide à une concentration fixe sur lequel nous avons ajouté l'ASO-V1 en quantité variable. Globalement, les tailles des nanocomplexes P1-9R/ASO-V1 dans de l'eau à différents ratio de charge 1:1, 3:1 et 6:1 sont situées à 90 +/- 10 nm et sont stables dans le temps (Tableau 12).

Nous avons observé que dans du PBS, l'ASO-V1 seul est polydispersé et lorsqu'on ajoute le peptide sur l'ASO-V1, on a une formation de nanocomplexes qui commence à partir de 100 nm et qui s'élève jusqu'à 400 nm avec une cinétique qui prends environ 1 H. Par contre, lorsqu'on ajoute d'abord le peptide P1-9R dans du PBS à 12  $\mu$ M finale, il n'y a pas de grosse particules, et dès qu'on ajoute sur le peptide l'ASO-V1 à 2  $\mu$ M finale on observe la formation de nanocomplexes ayant une taille d'environ 180 +/- 20 nm et stable dans le temps (Tableau 12). Globalement, les nanocomplexes formés dans du PBS sont plus gros que des nanocomplexes formés dans de l'eau et il y a probablement une instabilité selon la manière dont on prépare le mélange.

Enfin, Pour l'analyse de DLS dans du milieu  $\alpha$ MEM complet, nous avons comparé les populations détectées dans le milieu contenant du sérum seul et après l'addition de nanocomplexes P1-9R/ASO-V1 à un ratio de charge 3:1. Il a été possible de distinguer les agrégats protéiques constants (inhérents au sérum) et une population totalement indépendante associée aux nanocomplexes P1-9R/ASO-V1. La taille des nanocomplexes P1-9R/ASO-V1 est stable dans le milieu et est environ de 95 +/- 60 nm, ce qui est relativement cohérent avec ce que nous avons mesuré dans de l'eau (Tableau 12).

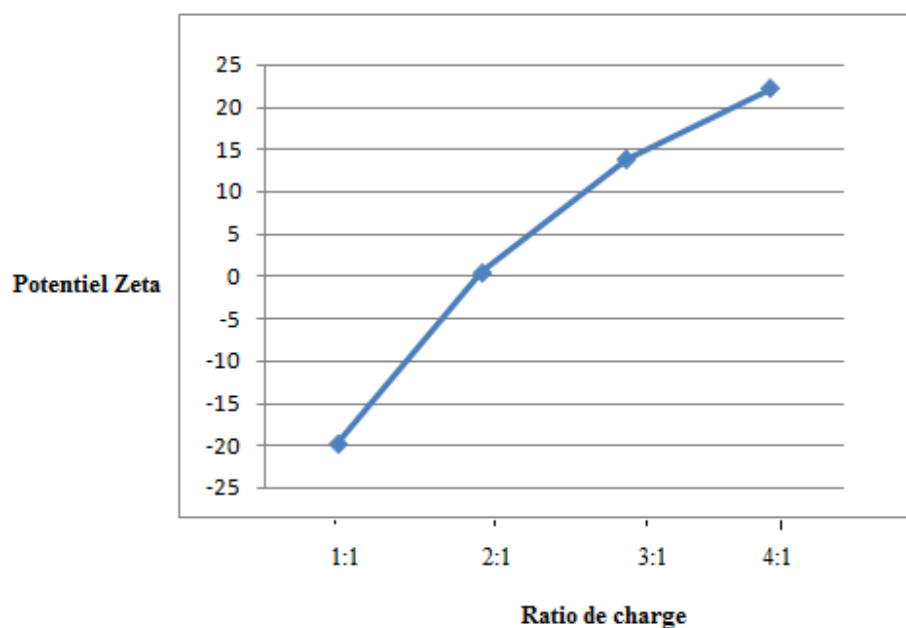
Pour étudier la charge de surface des nanocomplexes P1-9R/ASO-V1, les mesures de potentiel zêta sont effectuées dans de l'eau et du PBS pour les ratios de charge 1:1, 2:1, 3:1 et 4:1. Nous avons mesuré d'abord le potentiel zêta pour les nanocomplexes P1-9R/ASO-V1 avec un ratio de charge 1:1 soit dans de l'eau soit dans le PBS. Nous avons ensuite augmenté les ratios de charge à 2 :1, 3 :1 et 4 :1 en ajoutant le peptide P1-9R sur les mélanges des

nanocomplexes déjà formés. Nous avons observé une transition de potentiel zêta négative vers positive à partir de ratio de charge 2 :1 dans de l'eau et 3 :1 dans du PBS (Fig.67-68).

Milieu	EAU	PBS	$\alpha$ MEM
Taille (nm)	90 +/- 10	180 +/- 20	95 +/- 60

**Tableau 12) Analyse DLS.** Les tailles hydrodynamiques des nanocomplexes P1-9R/ASO-V1 sont mesurées dans de l'eau et du PBS à des différents ratios de charge, l'un partant de l'ASO-V1 à une concentration fixe sur lequel on a ajouté du peptide, et l'autre en partant du peptide à une concentration fixe sur lequel on a ajouté l'ASO-V1 pour former des nanocomplexes à des ratios de charge 1:1, 3:1 et 6:1. La taille hydrodynamique des nanocomplexes P1-9R/ASO-V1 de ratio de charge 3 :1 est mesurée dans du milieu  $\alpha$ MEM.

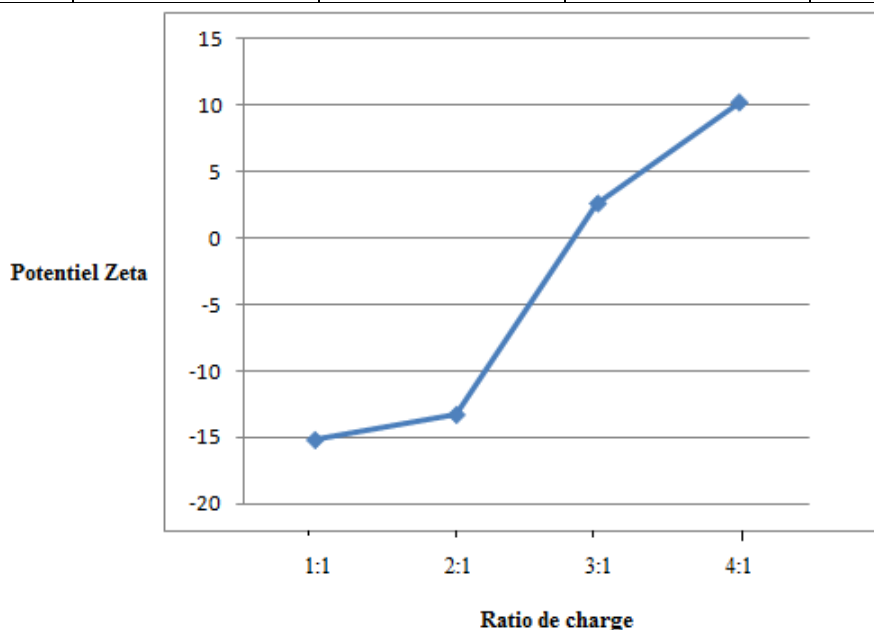
Ratio de Charge	1:1	2:1	3:1	4:1
Potentiel Zeta	- 19.8 mV	+ 0.4 mV	+ 13.8 mV	+ 22.2 mV



**Figure 67) Mesure de potentiel Zeta dans de l'eau.** La mesure du potentiel zêta de nanocomplexes P1-9R/ASO-V1 à des ratios de charge 1:1, 2:1, 3:1 et 4:1 est effectuée dans de l'eau. Le graphe démontre la transition de charge négative vers la charge positive des nanocomplexes en ajoutant du peptide.



Ratio de Charge	1 :1	2 :1	3 :1	4 :1
Potentiel Zeta	-15.2 mV	-13.3 mV	+ 2.6 mV	+ 10.2 mV

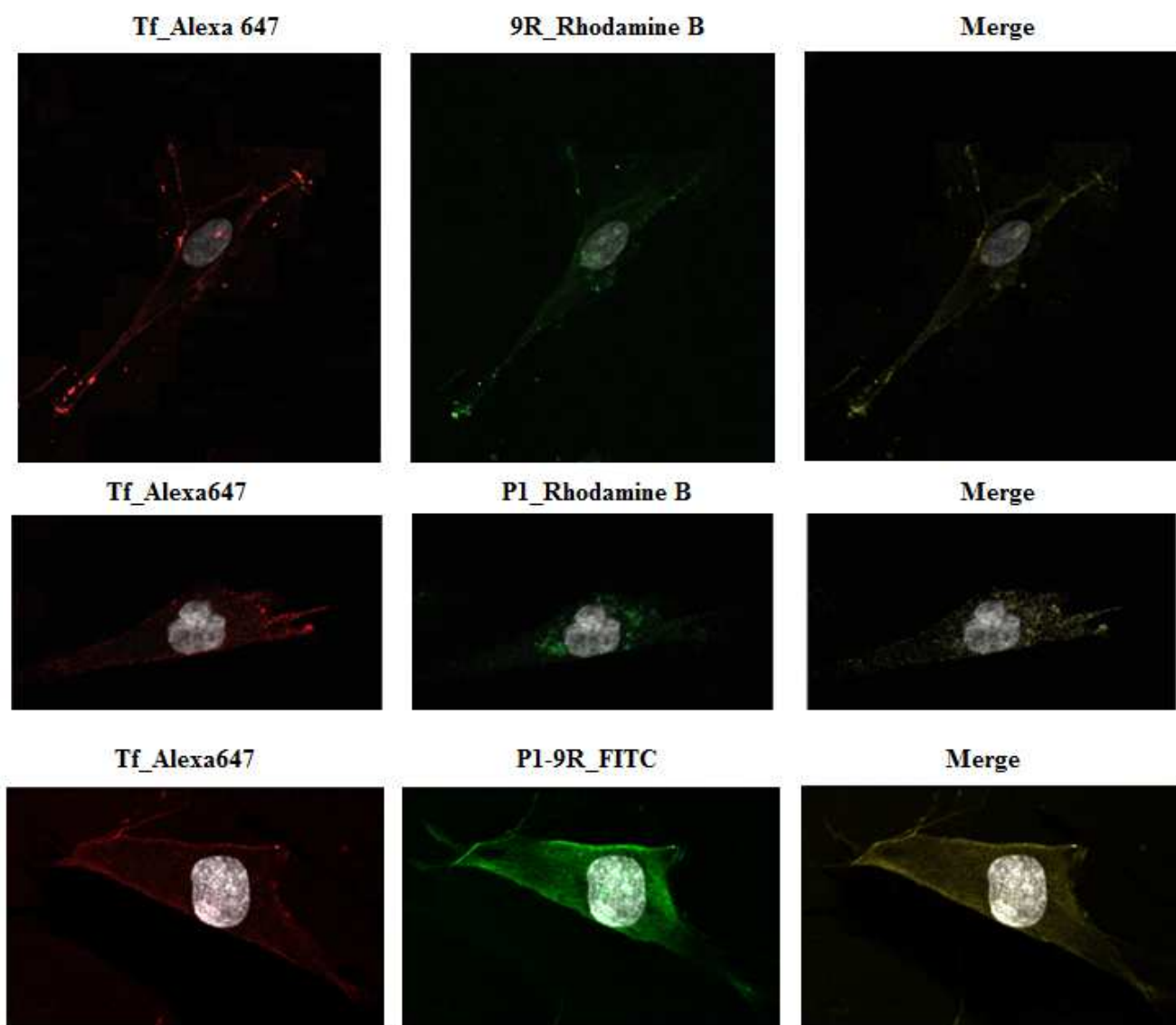


**Figure 68) Mesure du potentiel Zêta dans du PBS.** La mesure du potentiel zêta de nanocomplexes P1-9R/ASO-V1 à des ratios de charge 1:1, 2:1, 3:1 et 4:1 est effectuée dans du PBS. Le graphe démontre la transition de charge négative vers la charge positive des nanocomplexes en ajoutant du peptide.

## 8- Etude de la biodisponibilité intracellulaire des peptides et nanocomplexes par microscopie confocale

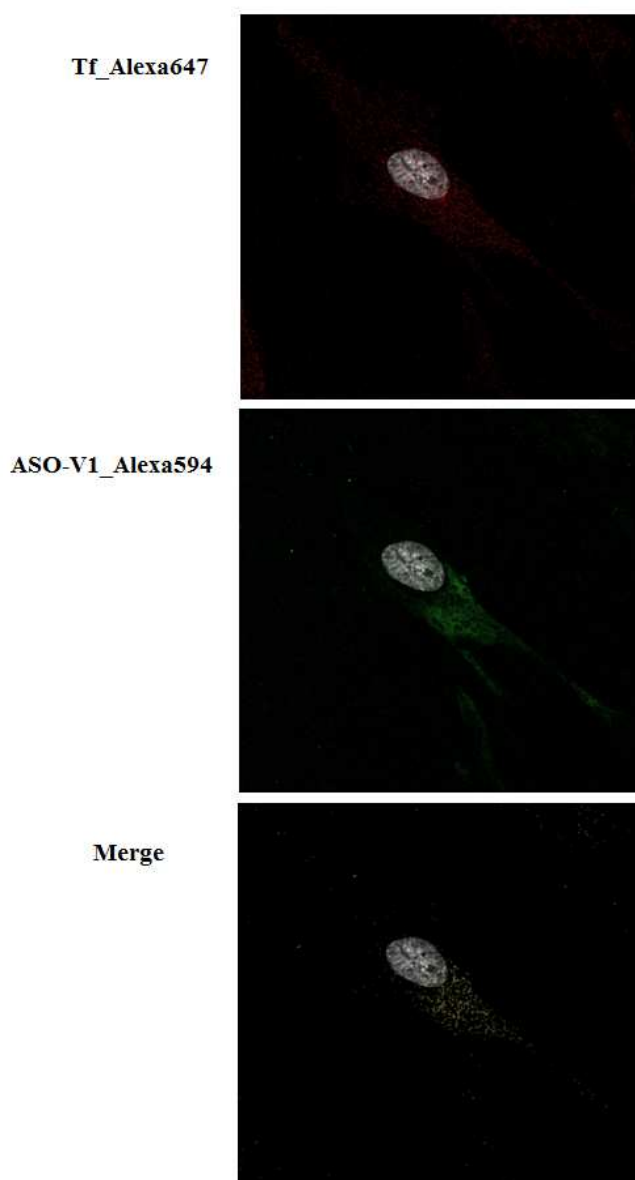
Nous avons étudié la distribution de peptides bifonctionnels P1-9R<sub>Fluorescent</sub>, 9R<sub>Rhodamine B</sub> et P1<sub>Rhodamine B</sub> dans des fibroblastes déprivés en SVF. Pour observer la localisation des peptides par rapport à la Tf, nous avons transfecté des fibroblastes par des peptides à la fois avec ou sans la Transferrine Alexafluor 647 (Tf<sub>Alexafluor 647</sub>). Nous avons observé que les peptides rentrent efficacement dans les cellules au bout de 30 mn. La co-localisation entre CPP 9R et la Tf est plutôt membranaire alors que la co-localisation entre la Tf et le peptide P1 ainsi que la Tf avec le peptide P1-9R sont plutôt cytoplasmiques (Fig.69). Cela suggère que la voie d'internalisation de CPP 9R est différente par rapport aux peptides ayant la partie ciblant RTf1. On peut envisager que CPP 9R utilise une voie d'internalisation autre que le cycle d'internalisation RTf1/Tf. Le peptide P1 est co-localisé avec la Tf mais est rentré moins efficacement par rapport au peptide P1-9R. On peut conclure que la partie CPP 9R conjugué à

P1 favorise l'internalisation par la voie RTf1/Tf en plus d'autres voies possibles telles que la formation d'une micelle inversée caractéristique du CPP 9R <sup>241</sup>.



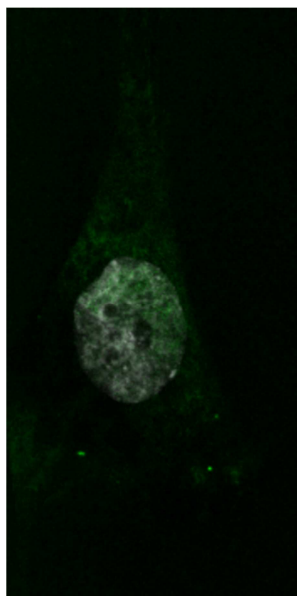
**Figure 69) Co-localisation entre différents peptides et la Tf.** Les fibroblastes sont déprivés en SVF pendant 1 H. Les cellules sont transfectées par P1-9R<sub>FITC</sub>, 9R<sub>Rhodamine B</sub> ou P1<sub>Rhodamine B</sub> à une concentration finale de 4  $\mu$ M avec ou sans la Tf<sub>Aexafluor 647</sub> à une concentration finale de 20  $\mu$ g/ml. Les cellules sont incubées à 4 °C pendant 30 mn en présence des réactifs pour bloquer l'endocytose et sont placées ensuite à 37 °C pendant 30 mn. Les cellules sont observées via le microscope confocal Leica SP8 après une fixation par la PFA à 4 %.

Nous avons incubé ensuite les cellules à 37 °C pendant 30 mn en présence des nanocomplexes P1-9R froid/ASO-V1<sub>Alexafluor 594</sub> et la Tf<sub>Alexafluor 647</sub>. Nous avons observé que l'ASO-V1 et la Tf co-localisent dans le cytoplasme, ce qui montre que l'internalisation des nanocomplexes a lieu par le cycle d'internalisation RTf1/Tf (Fig.70).



**Figure 70) Co-localisation entre Tf<sub>Alexa 647</sub> et ASO-V1<sub>Alexa594</sub>.** Les fibroblastes sont déprivés en SVF pendant 1 H. Les cellules sont transfectées par P1-9R<sub>Froid</sub>/ASO-V1<sub>Alexa594</sub> à un ratio de charge 5 :1 (ASO-V1 à 428 nM et peptide à 4 µM) en présence de la Tf<sub>Alexafluor 647</sub> à une concentration finale de 20 µg/ml. Les cellules sont incubées à 4 °C pendant 30 mn en présence des réactifs pour bloquer l'endocytose et sont placées ensuite à 37 °C pendant 30 mn. Les cellules sont observées via le microscope confocal Leica SP8 après une fixation par la PFA à 4 %.

L'épissage d'ARN pré-messager est un processus qui a lieu dans le noyau. Il est donc indispensable que l'ASO-V1 rejoigne le noyau afin de corriger l'anomalie d'épissage exon3-exon4. Nous avons pu montrer que l'ASO-V1<sub>Alexafluor 594</sub> complexé avec le peptide P1-9R froid à un ratio de charge 5 :1 se trouve dans le noyau 30 mn après son incubation dans des cellules à 37 °C (Fig.71).



**Figure 71) Distribution nucléaire de l'ASO-V1 dans des fibroblastes.** Les fibroblastes sont déprivés en SVF pendant 1 H. Les cellules sont transfectées par P1-9R<sub>Froid</sub>/ASO-V1<sub>Alexa594</sub> à un ratio de charge 5 :1 (ASO-V1 à 428 nM et peptide à 4 µM). Les cellules sont incubées à 4 °C pendant 30 mn en présence des réactifs pour bloquer l'endocytose et sont placées ensuite à 37 °C pendant 30 mn. Elles sont observées via le microscope confocal Leica SP8 après une fixation par la PFA à 4 %.

Le principale symptôme de la PPE est une réaction phototoxique à la lumière du jour et parfois artificielle qui a un impact majeur sur la qualité de vie et les activités professionnelles et personnelles des patients <sup>294</sup>. En outre, environ 2 % des patients souffrent également d'une insuffisance hépatique aiguë nécessitant une transplantation hépatique de sauvetage suivie si possible par un greffe de moelle osseuse <sup>295</sup>. La correction de l'épissage exon3-exon4 du gène *FECH* est une approche thérapeutique intéressante pour la PPE car l'allèle hypomorphe c.315-48C est présent chez plus de 90% des patients. De plus, une modeste augmentation de l'activité FECH est suffisante pour changer le statut de sujet malade à porteur asymptomatique <sup>159, 296</sup>. La correction ou la réorientation de l'épissage d'un pré-ARNm dans un contexte spécifique à une mutation représente une modalité de thérapie génique applicable à de nombreuses pathologies héréditaires <sup>297</sup>. La correction du défaut d'épissage de l'ARNm en tant que stratégie thérapeutique dans les affections mendéliennes a été proposée en particulier pour la DMD (gène dystrophine), l'amyotrophie spinale (gène SMN2), le syndrome Hutchinson-Gilford (gène LMNA), la  $\beta$ -thalassémie (gène HBB) et la fibrose kystique (gène CFTR) <sup>298</sup>. Les approches les plus avancées utilisant l'oligonucléotide antisens modifiant l'épissage sont maintenant au stade d'essais cliniques de Phase III pour le traitement de la DMD et l'amyotrophie spinale <sup>299</sup>.

Nous avons démontré dans une étude précédente que l'oligonucléotide antisens -63-45, ASO-V1, qui couvre à la fois le site cryptique d'épissage et le site de l'allèle hypomorphe c.315-48C dans l'intron 3 du gène *FECH*, permet de diminuer fortement l'utilisation du site cryptique et de réorienter l'épissage vers le site accepteur physiologique exon3-exon4. L'administration de l'ASO-V1 de type PMO à une forte concentration (45 $\mu$ M) dans des cultures primaires de cellules CD34+ de malades PPE pendant toute la durée des cultures a permis de restaurer une production normale d'ARN *FECH* WT et de diminuer chez deux malades PPE de 44% et 58 % la quantité de la PPIX la ramenant à un niveau comparable à ce qui est obtenu chez un porteur asymptomatique <sup>193</sup>. Ces données ont ouvert de nouveaux horizons pour une thérapie génique non intégrative à base d'oligonucléotide antisens pour le traitement de la PPE.

Dans la perspective d'un traitement *in vivo* chez l'homme, il est impossible d'utiliser par voie systémique le PMO-ASO-V1 à une concentration élevée et par une administration répétée en raison des risques de toxicité importants et de la clairance rénale. Il est donc essentiel d'adresser de façon ciblée l'oligonucléotide thérapeutique aux cellules érythroïdes

médullaires pour diminuer la concentration d'ASO-V1 injectée et augmenter l'efficacité du traitement en diminuant les risques de toxicité.

Les méthodes d'adressage très efficaces ont été développées à ce jour par les sociétés pharmaceutiques Alnylam et ISIS (USA) pour cibler le foie en utilisant le récepteur aux asialo-glycoprotéines spécifiques du galactose comme cargo, cependant aucune n'est actuellement disponible pour cibler les progéniteurs érythroïdes. Un tel outil serait déterminant dans le développement de nouveaux traitements non seulement dans les porphyries érythropoïétiques, mais aussi dans de nombreuses maladies érythropoïétiques constitutives ou acquises.

Pour l'adressage érythropoïétiques, une cible très intéressante pourrait être le RTf1 qui permet d'adresser à toutes les cellules de l'organisme via la Tf le fer indispensable au métabolisme de l'hème et des clusters fer-soufre. Les progéniteurs érythroïdes sont des cellules de l'organisme qui expriment le plus RTf1, dont l'expression débute juste avant celle de la FECH, et la liaison de l'holo-Tf à son récepteur induit son internalisation dans des vésicules endosomales.

Le ciblage de RTf1 est possible par son ligand naturel, la Tf. Cependant, les taux élevés de Tf libre circulant dans le sang peuvent interférer avec les effets de conjugués Tf/ASO conduisant à une diminution de l'efficacité thérapeutique ou à une diminution de l'internalisation de l'holo-Tf. Puisque les conjugués Tf/ASO ont le potentiel d'interagir à la fois avec RTf1 et RTf2 (qui est fortement exprimé dans le foie et les progéniteurs érythroïdes), ils peuvent interférer avec le métabolisme du fer hépatique et perturber l'induction de l'érythropoïèse par l'EPO. Le ciblage de RTf1 par des peptides ne ciblant pas le site de liaison de la Tf pourrait être donc une solution pour contourner ces problèmes.

Après le tissu érythroïde, le deuxième type cellulaire exprimant fortement RTf1 sont des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique. Dans le but d'adresser au système nerveux central des molécules thérapeutiques, Pilju Youn et al ont proposé un conjugué d'acide myristique-CPP Transportan couplé à un peptide ciblant RTf1(THRPPMWSPVWP), conduisant à l'encapsulation stable de siRNA et son transfert ciblé dans des cellules cérébrales. Leurs données préliminaires obtenues dans des astrocytes primaires de souris et des lignées cellulaires de gliome humain encouragent fortement l'utilisation de RTf1 comme cargo pour traiter les maladies liées au système nerveux central <sup>300</sup>.

Le RTf1 est souvent exprimé par les cellules malignes à des niveaux beaucoup plus élevés par rapport aux cellules normales et son expression peut être corrélée avec le stade de la tumeur ou la progression du cancer. La littérature abondante sur l'utilisation de RTf1 comme cible pour la distribution de médicaments anticancéreux, de petites molécules, de protéines,

d'acides nucléiques et même de nanoparticules et de virus dans de nombreux types de cellules malignes continue à croître <sup>301</sup>. Par exemple, l'artémisinine a été conjuguée de manière covalente à un peptide ciblant RTf1 (P1 : HAIYPRH), qui se lie à une cavité à la surface de RTf1. Le fer libéré par la transferrine peut activer l'artémisinine pour générer des radicaux toxiques pour tuer les cellules. Les conjugués artémisinine-peptide ont montré une activité anticancéreuse puissante contre les cellules de leucémie Molt-4 avec un ciblage significativement amélioré des cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales <sup>302</sup>.

A ce jour, différents peptides ciblant le RTf1 avec des affinités élevées ont été identifiés à partir de protéines d'enveloppe de virus par phage display. Afin de faciliter la complexation de ces peptides chargés positivement avec l'oligonucléotide de charge négative ainsi que leur échappement endosomal, ces peptides ont été conjugués de manière covalente à des séquences CPPs. Outre l'exemple mentionné au paragraphe précédent <sup>302</sup>, différents autres exemples concernant l'utilisation de CPP 9R en conjugaison covalente avec des peptides spécifiques à certains tissus pour tester l'efficacité de transfert d'acide nucléique *in vivo* sont déjà rapportés dans le chapitre 1 (Paragraphe F, page 76).

Dans notre travail de thèse, nous avons apporté la preuve de concept d'une stratégie d'adressage de l'ASO-V1 en ciblant RTf1, *ex vivo*, dans des cellules primaires de progéniteurs érythroïdes à partir de cellules CD34+ des patients PPE. Nous avons conjugué de manière covalente 5 peptides ciblant RTf1 humain à haute affinité à deux CPP prometteurs avec une capacité à se lier à l'ADN et à traverser les bicouches lipidiques : 9R et PepFect14. Puisque les LNAs possèdent un squelette chargé négativement et peuvent faciliter la complexation avec des peptides de charge positive, nous avons utilisé LNA-ASO-V1 pour ce travail. En plus, les LNAs n'activent pas RNase H et possèdent une forte affinité pour l'ARN et une faible sensibilité aux nucléases.

Pour étudier les différents aspects de nos véhicules peptidiques complexés avec l'ASO-V1, nous avons utilisé différents types de cellules qui présentent chacune des avantages et inconvénients par rapport à l'autre.

### **1- Lignées lymphoblastoïdes (LBCL)**

Les lignées lymphoblastoïdes sont des lymphocytes B immortalisées par le virus Epstein-Barr issus de patients PPE (génotype : M/c.315-48 C/T) ou d'un sujet asymptomatique (génotype : M/c.315-48T/T). Les LBCLs sont des cellules en suspension de très petites tailles qui ont une tendance importante à s'agréger. Le PPIX ne s'accumule pas dans ces cellules puisqu'elles ne sont pas érythroïdes. Nous avons utilisé cette lignée pour étudier l'efficacité de nos nanocomplexes à différents ratio de charge entre les peptides et l'ASO-V1 pour trouver les

meilleures combinaisons peptidiques permettant de corriger l'anomalie d'épissage. L'augmentation de niveau d'ARN *FECH* WT due à la correction de l'épissage a été également évaluée dans cette lignée.

## **2- Lignée UT7-Epo**

Les cellules UT7-EPO sont des cellules érythroïdes provenant d'un patient souffrant de leucémie mégacaryoblastique chronique et sont hétérozygotes pour l'allèle hypomorphe (c.315-48C/T). Ces cellules expriment fortement RTf1, en particulier en cas de carence en fer. Elles sont polyploïdes (globalement tétraploïdes) et contiennent des noyaux volumineux avec peu de cytoplasme. Nous ne savons pas combien d'allèles c.315-48C et T sont présents ni comment sont exprimés ces différents allèles. De ce fait, il est difficile d'étudier dans cette lignée l'augmentation d'ARN *FECH* WT et la distribution des nanocomplexes au niveau cytoplasmique. Ces cellules nous ont servi uniquement à étudier la cinétique de correction de l'anomalie d'épissage par les nanocomplexes et à confirmer les résultats obtenues dans des LBCLs.

## **3- Fibroblastes**

Nous avons utilisé des cultures primaires de fibroblastes humains isolées à partir d'un control non porphyrique pour les études de distribution subcellulaire et nucléaire des peptides et de l'ASO-V1 ainsi que leur colocalisation avec la Tf. Ces cellules sont adhérentes et possèdent des cytoplasmes bien distincts. Malgré la faible expression de RTf1, même après la déprivation des cellules en SVF, nous avons pu observer l'internalisation des peptides et des nanocomplexes ainsi que la localisation de l'ASO-V1 dans le noyau.

## **4- Cellules primaires de progéniteurs érythroïdes à partir de cellules CD34<sup>+</sup> périphériques**

Puisque la PPE est une maladie érythropoïétique (80% de la PPIX est produite par la moelle osseuse et 20% par le foie)<sup>192</sup>, le modèle cellulaire adapté à l'étude de la correction de la surproduction de la PPIX est la culture de progéniteurs érythroïdes issus de patients. Ces cellules nous ont permis d'étudier la correction de l'anomalie d'épissage, l'augmentation d'ARN *FECH* WT et la diminution de la surproduction de la PPIX par les nanocomplexes peptide/ASO-V1 (sélectionnés d'après les expériences *in vitro*). La toxicité et l'impact des nanocomplexes peptide/ASO-V1 sur la différenciation et la morphologie des cellules ont été également étudiés dans ces cellules. Cependant, ces cellules ont une faible prolifération cellulaire et nécessitent de travailler complètement à l'abri de la lumière pour ne pas activer la PPIX produite.

Dans un premier temps nous avons testé l'effet des nanocomplexes P1-9R/ASO-V1 et B18-PepFect14/ASO-V1 (deux peptides donnant de bons résultats dans les expériences avec les



lignées) sur l'épissage exon3-exon4 du gène *FECH* dans des progéniteurs CD34+ en différenciation érythroïde présentant un allèle hypomorphe mais sans mutation *FECH* délétère (Sujet D, Tableau 10). On a observé un effet prolongé d'ASO-V1 sur la redirection efficace de l'épissage qui débute 48 H post transfection et a dure jusqu'à 120 H après la transfection.

Puisque le CPP PepFect14 a induit une toxicité élevée (une diminution importante de la prolifération et l'induction de la mort cellulaire) dans des cultures primaires de CD34+, nous nous sommes concentrés pour la suite du projet sur les nanocomplexes possédant le CPP 9R.

Les résultats obtenus par six expériences indépendantes sur l'augmentation de l'ARN *FECH* WT dans des lignées lymphoblastoïdes de malades PPE montrent une bonne efficacité des peptides P1 et B2 que nous avons sélectionnés pour les études en progéniteurs érythroïdes à partir de cellules CD34+ des patients. Nous avons testé l'effet des nanocomplexes P1-9R/ASO-V1 sur l'épissage exon3-exon4 du gène *FECH* dans des cellules primaires de progéniteurs érythroïdes à partir de cellules CD34+ périphériques de trois sujets malades indépendantes (Tableau 10). Nous avons effectué les expériences, pour chaque condition, en six répliques intra-série. On a observé que l'effet corrigeant de l'épissage débute 72 H après la transfection et qu'il est accompagné d'une augmentation de l'ARN *FECH* WT et une diminution significative de la surproduction de PPIX. Le nanocomplexe B2-9R/ASO-V1 a été également administré avec des conditions d'expériences identiques à celles de nanocomplexes P1-9R/ASO-V1 chez le patient C et les résultats obtenus ont confirmé ce que nous avons observé avec le nanocomplexe P1-9R/ASO-V1.

Nous avons vérifié la toxicité des nanocomplexes ou des peptides seuls en évaluant les nombres des cellules vivantes au bleu de trypan. Nous avons observé que les peptides conjugué au CPP 9R avec ou sans ASO-V1 n'induisent pas un excès de mort cellulaire.

En outre, nous avons démontré, en étudiant les marqueurs phénotypiques des cellules érythroïdes, que le nanocomplexe P1-9R/ASO-V1 n'altèrent pas la différenciation érythroïdes.

La taille des nanoparticules affecte considérablement leur élimination de la circulation sanguine. Les nanoparticules avec le diamètre hydrodynamique inférieur à 5 nm subissent une clairance rénale et l'excrétion urinaire très rapide<sup>247</sup> alors que les nanoparticules avec un diamètre hydrodynamique de plus de 200 nm présentent typiquement une opsonisation rapide et une absorption ultérieure par le système phagocytaire mononucléaire<sup>248</sup>.

Le potentiel zêta des nanoparticules est classé selon quatre catégories :  $\pm 0-10$  mV,  $\pm 10-20$  mV,  $\pm 20-30$  mV et  $> \pm 30$  mV correspondant respectivement aux nanoparticules très

instables, relativement stables, modérément stables et très stables <sup>303</sup>. Il faut prendre en compte que cette mesure dépend de nombreuses variables telles que le solvant, la température et le pH. Les nanoparticules ayant une faible valeur de potentiel zêta finiront par s'agréger entre elles en raison des interactions de type van der Waals.

Nous avons mesuré la taille des nanocomplexes P1-9R/ASO-V1 à différents ratio de charge dans de l'eau, le PBS et le milieu  $\alpha$ MEM complet. Dans les expériences avec différents ratio de charge de nanocomplexe P1-9R/ASO-V1 dans de l'eau, l'un partant de l'ASO-V1 à une concentration fixe sur lequel on a ajouté du peptide, et l'autre en partant du peptide à une concentration fixe sur lequel on a ajouté l'ASO-V1, nous avons observé que la taille de nanocomplexe est d'environ 90 +/- 10 nm et est stable dans le temps. Nous avons observé que les nanoparticules formés dans le PBS sont plus gros par rapport à ceux formés dans de l'eau (180 +/-20 nm). Enfin, nous avons mesuré la taille de nanocomplexe P1-9R/ASO-V1 dans du milieu  $\alpha$ MEM complet, dans le quel la plupart des expériences de transfection *in vitro* ont eu lieu. La taille de nanoparticule à un ratio de charge 3:1 dans le milieu cellulaire est d'environ 95 +/-60 nm, ce qui est cohérent avec la taille de nanocomplexe dans de l'eau.

En conclusion, notre nanocomplexe P1-9R/ASO-V1 avec une taille hydrodynamique inférieure à 200 nm et supérieure à 5 nm pourrait être un candidat potentiel pour les essais thérapeutiques *in vivo* puisqu'il ne sera pas phagocyté par le système phagocytaire mononucléaire du sang ou éliminé par le rein.

Nous avons mesuré le potentiel zêta pour les ratios de charge 1:1, 2:1, 3:1 et 4:1 entre le peptide et ASO-V1 dans de l'eau et du PBS. Nous avons observé une transition de charge négative vers positive à partir de ratio de charge 2 :1 dans les deux milieux. Le potentiel zêta des nanocomplexes augmente lorsqu'on ajoute plus de peptide sur l'ASO-V1. Cela suggère que pour les expériences *in vivo* les ratios de charges plus élevés augmenteront probablement la stabilité de nanocomplexes dans le sang et seront donc plus efficaces. Nous avons effectué toutes nos expériences fonctionnelles dans des cellules LBCLs, des UT7-EPO et des cellules primaires de progéniteurs érythroïdes à partir de cellules CD34+ périphériques avec un ratio de charge 5 :1 entre le peptide et l'ASO-V1. On a effectivement observé dans nos premiers essais visant à rechercher le meilleur ratio de charge, une forte correction de l'épissage exon3-exon4 du gène *FECH* dans des cellules transfectées par différents nanocomplexes avec des ratios de charge qui s'élèvent à 30 :1. Cependant, la toxicité induite par certains de ces peptides complexés à ASO-V1 à des ratios de charge élevés limite leurs utilisations avec de telles concentrations chez les souris et nécessite des mises au point plus précises en diminuant

la concentration d'ASO-V1, ce qui permet de diminuer la concentration du peptide tout en conservant un ratio de charge élevé.

Nous avons également étudié la distribution des peptides P1-9R<sub>FITC</sub>, 9R<sub>Rhodamine B</sub> et P1<sub>Rhodamine B</sub> dans des fibroblastes. Nous avons transfecté des fibroblastes par ces peptides à la fois avec ou sans la transferrine<sub>Alexafluor 647</sub>. Les peptides P1, 9R et P1-9R se sont trouvés dans le cytoplasme 30 mn après l'incubation des cellules à 37 °C. L'aspect de fluorescence pour 9R et P1-9R est diffus et le signal de fluorescence est plus intense par rapport aux cellules transfectées par P1 seul. Cela confirme la forte capacité de 9R à adhérer et traverser les membranes cellulaires et signifie que le peptide bifonctionnel rentre dans les cellules en plus de la voie d'endocytose de RTf1, par une autre voie d'internalisation caractéristique du CPP 9R telle que la formation d'une micelle inversée<sup>241</sup>. Les peptides 9R et P1-9R se trouvent également dans le noyau, ce qui est compatible avec les études précédentes qui montrent qu'au moins six résidus arginine sont nécessaires pour permettre une accumulation de CPP 9R dans le noyau<sup>282</sup>. La colocalisation entre P1 ou P1-9R avec la transferrine est plutôt cytoplasmique alors qu'entre 9R et la transferrine elle est plutôt membranaire. L'absence de la partie ciblant RTf1 pourrait donc être à l'origine de voies d'internalisation séparée entre 9R et la transferrine. Pour étudier la distribution subcellulaire de l'ASO-V1, nous avons formé des nanocomplexes P1-9R<sub>FITC</sub>/ASO-V1<sub>Alexa 594</sub> à un ratio de charge 5:1, avec ou sans la transferrine<sub>Alexa 647</sub>. Nous avons pu détecter l'ASO-V1 dans le noyau (où l'oligonucléotide devrait cibler l'ARN pré-messager) 30 mn après l'incubation des cellules à 37 °C. Ceci est compatible avec ce que nous avons déjà observé par l'effet d'ASO-V1 adressé aux cellules via le peptide bifonctionnel P1-9R sur la correction de l'épissage exon3-exon4 du gène *FECH* à la fois *in vitro* et *ex vivo*.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que la stratégie de ciblage de RTf1 par les ligands RTf1-CPP pour adresser ASO-V1 aux cellules érythroïdes en différenciation pourrait être un traitement efficace chez plus de 90% des patients PPE. Une caractéristique importante de cette stratégie thérapeutique est que la correction se produise dans le gène endogène qui est transcrit dans son environnement physiologique, empêchant ainsi son expression excessive ou inappropriée ou un problème de mutagénèse insertionnelle. Puisque la correction aura lieu dans les érythroblastes médullaires et persistera dans les érythrocytes en circulation avec une durée de vie d'environ 120 jours, les effets du traitement par l'oligonucléotide antisens seront probablement prolongés. En outre, le traitement pharmacologique est plus facile à administrer que la thérapie génique somatique et il pourrait facilement être arrêté en cas d'effets indésirables.

Nous avons apporté par ce travail la preuve de concept *ex vivo* en culture primaire de progéniteurs érythroïdes de patient PPE, l'efficacité de la méthode d'adressage de l'ASO-V1 via des peptides bifonctionnels ligand RTf1-CPP. Notre prochaine étape sera d'apporter la preuve de concept *in vivo* de cette stratégie d'adressage.

Pour l'étape suivante, nous allons nous concentrer sur le peptide P1 car en plus de son affinité élevée pour RTf1 (avec un Kd d'environ 10 nM comme pour l'holo-Tf vis à vis de son récepteur<sup>121</sup>), son site de liaison à ce récepteur est différent de celui de la Tf. Ainsi, la Tf endogène n'inhiberait pas l'absorption de véhicules peptidiques constitués de P1 et inversement<sup>302</sup>.

Pour le choix d'un CPP favorisant la sortie endosomale, notre candidat principal est un CPP réductible, rPOA (reductible poly-Arginine) composé d'unités peptidiques Cys-(D-R9)-Cys reliées entre elles par des ponts disulfures entre les groupements cysteinyl et thiol du peptide. La polymérisation de Cys-(D-R9)-Cys en rPOA a deux avantages : i) la masse molaire élevée du peptide polymérisé augmente la stabilité des nanocomplexes dans des conditions extracellulaires, ii) le rPOA étant un polypeptide réductible peut se fragmenter en Cys-(D-R9)-Cys dans des environnements cellulaires réduits due à la présence de glutathion qui contrôle le niveau d'oxydoréduction dans les différents compartiments cellulaires. Une fois arrivé dans le cytoplasme, les ponts disulfures du polypeptide sont réduits et ainsi l'acide nucléique est plus facilement libéré dans le cytosol pour rejoindre le noyau<sup>285</sup>.

Nous avons montré que le peptide P1 conjugué à Cys-(D-R9)-Cys complexé avec l'ASO-V1 (formant les nanocomplexes P1-9R/ASO-V1) a augmenté le niveau d'ARN *FECH* WT et a diminué significativement le niveau d'accumulation de PPIX, *ex vivo*, dans des cellules primaires de progéniteurs érythroïdes à partir de cellules CD34+ des patients PPE sans affecter leurs différenciation, ni induire de toxicité.

L'ensemble de ces données montrent que P1 pourrait être un candidat prometteur pour l'administration ciblée d'ASO-V1 chez les patients PPE.

Les étapes suivantes de notre travail seront :

### **I- Etudier différents aspects du peptide P1 dans différents modèles cellulaires.**

1-La localisation subcellulaire de nanocomplexe P1-9R/ASO-V1 et de la Tf sera étudiée au cours du temps par l'Amnis dans des cellules en suspension telle qu'UT7-EPO. Nous pouvons également vérifier le niveau d'accumulation de PPIX simultanément avec la localisation subcellulaire de peptide et d'ASO-V1 dans des progéniteurs érythroïdes à partir de cellules

CD34+ des patients PPE. L'Amnis combine la vitesse, la puissance statistique et la sensibilité de fluorescence de la cytométrie en flux avec les possibilités fonctionnelles de la microscopie à haute résolution.

2-L'activité enzymatique FECH et la quantité de protéine FECH après l'administration de nanocomplexe P1-9R/ASO-V1 seront étudiés dans des lignées lymphoblastoïdes issues de patients PPE.

3-L'impact de nanocomplexe P1-9R/ASO-V1 sur le métabolisme du fer sera évalué dans des cellules UT7-EPO, des fibroblastes et des cellules hépatocytaires HepG2.

4-Enfin, l'internalisation de peptide P1-9R sera étudiée dans la culture primaire de fibroblastes de souris pour évaluer la spécificité d'espèce de peptide par rapport au RTf1 de souris.

## **II- Preuve de concept *in vivo* du traitement par les nanocomplexes P1-9R/ASO-V1 dans des modèles murins humanisés de PPE.**

Il existe deux modèles murins PPE : l'un qui présente un phénotype récessif et a une mutation homozygote faux-sens *Fech*<sup>m1pas</sup> produit par mutagenèse au N-ethyl-N-nitrosouré (ENU)<sup>189,304</sup> et l'autre qui a une délétion de l'exon 10 donnant un allèle nul, létal à l'état homozygote et qui à l'état hétérozygote reproduit partiellement le phénotype humain, car il présente une accumulation de PPIX modérée sans présenter la photosensibilité cutanée<sup>305</sup>.

### **A- Production des modèles murins PPE présentant de l'allèle hypomorphe**

1-Récemment un modèle murin humanisé par la présence de l'allèle hypomorphe c.315-48C a été créé par le Pr E. Minder<sup>306</sup> (Zürich University, Switzerland). Les animaux reproduisent bien l'anomalie d'épissage entre exon3 et exon4 mais malheureusement présentent aussi une autre anomalie d'épissage de l'exon3 qui est très majoritairement épissée. Au total cette lignée peut être utilisée pour étudier *in vivo* la correction de l'anomalie d'épissage par les nanocomplexes mais pas pour les analyses phénotypiques plus complètes.

2-Nous proposons aussi et surtout un modèle de xénogreffe de moelle humaine dans des souris immunodéficientes NSG c-Kit<sup>307</sup>. Des mutations dans le récepteur Kit améliorent la greffe de HSC transplantés chez les souris sans recourir à une irradiation. Ces souris permettent le développement complet d'une érythropoïèse humaine sur plusieurs semaines. Cette méthode de choix est partiellement intéressante car elle permet d'apporter une preuve de concept *in vivo* dans des cellules humaines et donc sans être gêné par la barrière inter-espèce.

## **B- Les études *in vivo***

Les globules rouges ont une durée de vie longue justifiant une administration IP à long terme (6 semaines) pour analyser des paramètres comme : i) la quantité d'ARNm *FECH* WT, ii) l'activité FECH, iii) le niveau de PPIX dans des globules rouges périphériques et dans la moelle osseuse et iv) la photosensibilité cutanée après une exposition à une lumière visible calibrée. Le métabolisme du fer sera étudié également chez les souris recevant des traitements à long terme en mesurant les paramètres classiques.

Les études de correction phénotypique à long terme dans des modèles murins PPE seront très importantes en tant qu'essai préclinique de la PPE et pourraient être utilisables dans d'autres approches de thérapie génique non intégratives pour d'autres maladies hématopoïétiques.

## **Références**

- 1-Ponka P. Cell biology of heme. *Am J Med Sci.* 1999 Oct; 318(4):241-56. Review. PubMed PMID: 10522552.
- 2-Faller M, Matsunaga M, Yin S, Loo JA, Guo F. Heme is involved in microRNA processing. *Nat Struct Mol Biol.* 2007 Jan;14(1):23-9. PubMed PMID: 17159994.
- 3- Kaasik K, Lee CC. Reciprocal regulation of haem biosynthesis and the circadian clock in mammals. *Nature.* 2004 Jul 22;430(6998):467-71. PubMed PMID: 15269772.
- 4-Tang XD, Xu R, Reynolds MF, Garcia ML, Heinemann SH, Hoshi T. Haem can bind to and inhibit mammalian calcium-dependent Slo1 BK channels. *Nature.* 2003 Oct 2;425(6957):531-5. PubMed PMID: 14523450.
- 5-Puy H, Gouya L, Deybach JC. Porphyrias. *Lancet.* 2010 Mar 13;375(9718):924-37. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61925-5. Review. PubMed PMID: 20226990.
- 6-SHEMIN D, RITTENBERG D. The biological utilization of glycine for the synthesis of the protoporphyrin of hemoglobin. *J Biol Chem.* 1946 Dec;166(2):621-5. PubMed PMID: 20276176.
- 7- SHEMIN D, KIKUCHI G. Enzymatic synthesis of sigma-aminolevulinic acid. *Ann N Y Acad Sci.* 1958 Oct 13;75(1):122-8. PubMed PMID: 13627809.
- 8- LAVER WG, NEUBERGER A, UDENFRIEND S. Initial stages in the biosynthesis of porphyrins. I. The formation of delta-am-inolaevulic acid by particles obtained from chicken erythrocytes. *Biochem J.* 1958 Sep;70(1):4-14. PubMed PMID: 13584293; PubMed Central PMCID: PMC1196616.
- 9-Bishop DF, Henderson AS, Astrin KH. Human delta-aminolevulinate synthase: assignment of the housekeeping gene to 3p21 and the erythroid-specific gene to the X chromosome. *Genomics.* 1990 Jun;7(2):207-14. PubMed PMID: 2347585.
- 10-Kaya, A.H., et al., Human delta-aminolevulinate dehydratase (ALAD) gene: structure and alternative splicing of the erythroid and housekeeping mRNAs. *Genomics*, 1994. 19(2): p. 242-8.
- 11-Layer G, Reichelt J, Jahn D, Heinz DW. Structure and function of enzymes in heme biosynthesis. *Protein Sci.* 2010 Jun;19(6):1137-61. doi: 10.1002/pro.405. Review. PubMed PMID: 20506125; PubMed Central PMCID: PMC2895239.
- 12-Schubert HL, Erskine PT, Cooper JB 2009. 5-Aminolaevulinic acid dehydratase, porphobilinogen deaminase and uroporphyrinogen III synthase. In *Tetrapyrroles: Birth, life and death* (ed. Warren MJ, Smith AG), pp. 43–73 Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, New York
- 13-Grandchamp B, De Verneuil H, Beaumont C, Chretien S, Walter O, Nordmann Y. Tissue-specific expression of porphobilinogen deaminase. Two isoenzymes from a single gene. *Eur J Biochem.* 1987 Jan 2;162(1):105-10. PubMed PMID: 3816774.

14-Dailey HA, Meissner PN. Erythroid heme biosynthesis and its disorders. Cold Spring Harb Perspect Med. 2013 Apr 1;3(4):a011676. doi: 10.1101/cshperspect.a011676. Review. PubMed PMID: 23471474; PubMed Central PMCID: PMC3683999.

15-ASHENBRUCKER H, CARTWRIGHT GE, GOLDBERG A, WINTROBE MM. Studies on the biosynthesis of heme in vitro by avian erythrocytes. Blood. 1956 Sep;11(9):821-33. PubMed PMID: 13355892.

16-Handschin C, Lin J, Rhee J, Peyer AK, Chin S, Wu PH, Meyer UA, Spiegelman BM. Nutritional regulation of hepatic heme biosynthesis and porphyria through PGC-1alpha. Cell. 2005 Aug 26;122(4):505-15. PubMed PMID: 16122419.

17-Yin L, Wu N, Curtin JC, Qatanani M, Szwegold NR, Reid RA, Waitt GM, Parks DJ, Pearce KH, Wisely GB, Lazar MA. Rev-erbalpha, a heme sensor that coordinates metabolic and circadian pathways. Science. 2007 Dec 14;318(5857):1786-9. Epub 2007 Nov 15. PubMed PMID: 18006707

18-Wu N, Yin L, Hanniman EA, Joshi S, Lazar MA. Negative feedback maintenance of heme homeostasis by its receptor, Rev-erbalpha. Genes Dev. 2009 Sep15;23(18):2201-9. doi: 10.1101/gad.1825809. Epub 2009 Aug 26. PubMed PMID: 19710360; PubMed Central PMCID: PMC2751986.

19-Rogers PM, Ying L, Burris TP. Relationship between circadian oscillations of Rev-erb alpha expression and intracellular levels of its ligand, heme. Biochem Biophys Res Commun. 2008 Apr 18;368(4):955-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.02.031. Epub 2008 Feb 15. PubMed PMID: 18280802; PubMed Central PMCID: PMC2746331.

20-Gotoh S, Nakamura T, Kataoka T, Taketani S. Egr-1 regulates the transcriptional repression of mouse  $\delta$ -aminolevulinic acid synthase 1 by heme. Gene. 2011 Feb 1;472(1-2):28-36. doi: 10.1016/j.gene.2010.10.008. Epub 2010 Oct 29. PubMed PMID: 21044876.

21-Handbook of Porphyrin Science (Volumes 26 – 30), With Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine Guest editor: Gloria C Ferreira , Nov.2013.Series edited by: Karl M Kadish , Kevin M Smith, Roger Guillard.

22-Besur S, Hou W, Schmeltzer P, Bonkovsky HL. Clinically important features of porphyrin and heme metabolism and the porphyrias. Metabolites. 2014 Nov 3;4(4):977-1006. doi: 10.3390/metabo4040977. Review. PubMed PMID: 25372274; PubMed Central PMCID: PMC4279155

23-Munakata H, Sun JY, Yoshida K, Nakatani T, Honda E, Hayakawa S, Furuyama K, Hayashi N. Role of the heme regulatory motif in the heme-mediated inhibition of mitochondrial import of 5-aminolevulinate synthase. J Biochem. 2004 Aug;136(2):233-8. PubMed PMID: 15496594.

24-Tian Q, Li T, Hou W, Zheng J, Schrum LW, Bonkovsky HL. Lon peptidase 1 (LONP1)-dependent breakdown of mitochondrial 5-aminolevulinic acid synthase protein by heme in human liver cells. J Biol Chem. 2011 Jul 29;286(30):26424-30.doi: 10.1074/jbc.M110.215772. Epub 2011 Jun 9. PubMed PMID: 21659532; PubMed Central PMCID: PMC3143606.



25-Baker TA, Sauer RT. ClpXP, an ATP-powered unfolding and protein-degradation machine. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jan;1823(1):15-28.doi:10.1016/j.bbamcr.2011.06.007. Review. PubMed PMID: 21736903; PubMed Central PMCID: PMC3209554.

26-Kubota Y, Nomura K, Katoh Y, Yamashita R, Kaneko K, Furuyama K. Novel Mechanisms for Heme-dependent Degradation of ALAS1 Protein as a Component of Negative Feedback Regulation of Heme Biosynthesis. *J Biol Chem*. 2016 Sep 23;291(39):20516-29. doi: 10.1074/jbc.M116.719161. PubMed PMID: 27496948; PubMed Central PMCID: PMC5034046.

27-Shaw GC, Cope JJ, Li L, Corson K, Hersey C, Ackermann GE, Gwynn B, Lambert AJ, Wingert RA, Traver D, Trede NS, Barut BA, Zhou Y, Minet E, Donovan A, Brownlie A, Balzan R, Weiss MJ, Peters LL, Kaplan J, Zon LI, Paw BH. Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. *Nature*. 2006 Mar 2;440(7080):96-100. PubMed PMID: 16511496.

28-Campanella M, Casswell E, Chong S, Farah Z, Wieckowski MR, Abramov AY, Tinker A, Duchon MR. Regulation of mitochondrial structure and function by the F1Fo-ATPase inhibitor protein, IF1. *Cell Metab*. 2008 Jul;8(1):13-25. doi: 10.1016/j.cmet.2008.06.001. PubMed PMID: 18590689.

29-Shah DI, Takahashi-Makise N, Cooney JD, Li L, Schultz IJ, Pierce EL, Narla A, Seguin A, Hattangadi SM, Medlock AE, Langer NB, Dailey TA, Hurst SN, Faccenda D, Wiwczar JM, Heggors SK, Vogin G, Chen W, Chen C, Campagna DR, Brugnara C, Zhou Y, Ebert BL, Danial NN, Fleming MD, Ward DM, Campanella M, Dailey HA, Kaplan J, Paw BH. Mitochondrial Atpif1 regulates haem synthesis in developing erythroblasts. *Nature*. 2012 Nov 22;491(7425):608-12. doi: 10.1038/nature11536. Epub 2012 Nov 7. Erratum in: *Nature*. 2013 Apr 18;496(7445):386. PubMed PMID: 23135403; PubMed Central PMCID: PMC3504625.

30-Faccenda D, Campanella M. Molecular Regulation of the Mitochondrial F(1)F(o)-ATP synthase: Physiological and Pathological Significance of the Inhibitory Factor 1 (IF(1)). *Int J Cell Biol*. 2012;2012:367934. doi:10.1155/2012/367934. PubMed PMID: 22966230; PubMed Central PMCID: PMC3433140.

31-Crooks DR, Ghosh MC, Haller RG, Tong WH, Rouault TA. Posttranslational stability of the heme biosynthetic enzyme ferrochelatase is dependent on iron availability and intact iron-sulfur cluster assembly machinery. *Blood*. 2010 Jan 28;115(4):860-9. doi: 10.1182/blood-2009-09-243105. Epub 2009 Nov 25. PubMed PMID: 19965627; PubMed Central PMCID: PMC2815515.

32-Cooperman SS, Meyron-Holtz EG, Olivierre-Wilson H, Ghosh MC, McConnell JP, Rouault TA. Microcytic anemia, erythropoietic protoporphyria, and neurodegeneration in mice with targeted deletion of iron-regulatory protein 2. *Blood*. 2005 Aug 1;106(3):1084-91. Epub 2005 Apr 14. PubMed PMID: 15831703; PubMed Central PMCID: PMC1895161.

33-Galy B, Ferring D, Minana B, Bell O, Janser HG, Muckenthaler M, Schümann K, Hentze MW. Altered body iron distribution and microcytosis in mice deficient in iron regulatory protein 2 (IRP2). *Blood*. 2005 Oct 1;106(7):2580-9. Epub 2005 Jun 14. PubMed PMID: 15956281.

- 34-Zumbrennen-Bullough KB, Becker L, Garrett L, Höltter SM, Calzada-Wack J, Mossbrugger I, Quintanilla-Fend L, Racz I, Rathkolb B, Klopstock T, Wurst W, Zimmer A, Wolf E, Fuchs H, Gailus-Durner V, de Angelis MH, Romney SJ, Leibold EA. Abnormal brain iron metabolism in *Irp2* deficient mice is associated with mild neurological and behavioral impairments. *PLoS One*. 2014 Jun 4;9(6):e98072. doi:10.1371/journal.pone.0098072. eCollection 2014. PubMed PMID: 24896637; PubMed Central PMCID: PMC4045679.
- 35-Wang J, Pantopoulos K. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem J*. 2011 Mar 15;434(3):365-81. doi: 10.1042/BJ20101825. Review. PubMed PMID: 21348856; PubMed Central PMCID: PMC3048577.
- 36-Shah YM, Xie L. Hypoxia-inducible factors link iron homeostasis and erythropoiesis. *Gastroenterology*. 2014 Mar;146(3):630-42. doi: 10.1053/j.gastro.2013.12.031. Epub 2013 Dec 31. Review. PubMed PMID: 24389303; PubMed Central PMCID: PMC3943938.
- 37-Ishikawa H, Kato M, Hori H, Ishimori K, Kirisako T, Tokunaga F, Iwai K. Involvement of heme regulatory motif in heme-mediated ubiquitination and degradation of *IRP2*. *Mol Cell*. 2005 Jul 22;19(2):171-81. PubMed PMID: 16039587.
- 38-Tahara T, Sun J, Nakanishi K, Yamamoto M, Mori H, Saito T, Fujita H, Igarashi K, Taketani S. Heme positively regulates the expression of beta-globin at the locus control region via the transcriptional factor *Bach1* in erythroid cells. *J Biol Chem*. 2004 Feb 13;279(7):5480-7. Epub 2003 Dec 1. PubMed PMID: 14660636.
- 39-Suzuki H, Tashiro S, Hira S, Sun J, Yamazaki C, Zenke Y, Ikeda-Saito M, Yoshida M, Igarashi K. Heme regulates gene expression by triggering *Crm1*-dependent nuclear export of *Bach1*. *EMBO J*. 2004 Jul 7;23(13):2544-53. Epub 2004 Jun 3. Erratum in: *EMBO J*. 2014 Aug 1;33(15):1727. PubMed PMID: 15175654; PubMed Central PMCID: PMC449764.
- 40-Zenke-Kawasaki Y, Dohi Y, Katoh Y, Ikura T, Ikura M, Asahara T, Tokunaga F, Iwai K, Igarashi K. Heme induces ubiquitination and degradation of the transcription factor *Bach1*. *Mol Cell Biol*. 2007 Oct;27(19):6962-71. Epub 2007 Aug 6. PubMed PMID: 17682061. Central PMCID: PMC2099246
- 41-Furuyama K, Kaneko K, Vargas PD. Heme as a magnificent molecule with multiple missions: heme determines its own fate and governs cellular homeostasis. *Tohoku J Exp Med*. 2007 Sep;213(1):1-16. Review. PubMed PMID: 17785948.
- 42-Eggler AL, Liu G, Pezzuto JM, van Breemen RB, Mesecar AD. Modifying specific cysteines of the electrophile-sensing human *Keap1* protein is insufficient to disrupt binding to the *Nrf2* domain *Neh2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jul 19;102(29):10070-5. PubMed PMID: 16006525; PubMed Central PMCID: PMC1177374.
- 43-Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, O'Connor T, Yamamoto M. *Keap1* regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of *Nrf2* in response to electrophiles. *Genes Cells*. 2003 Apr;8(4):379-91. PubMed PMID: 12653965.
- 44-Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, Yoshikawa T. Heme oxygenase-1: a novel therapeutic target for gastrointestinal diseases. *J Clin Biochem Nutr*. 2011 Mar;48(2):126-33. doi: 10.3164/jcbn.10-61. PubMed PMID: 21373265; PubMed Central PMCID: PMC3045685.

- 45-Marro S, Chiabrando D, Messana E, Stolte J, Turco E, Tolosano E, Muckenthaler MU. Heme controls ferroportin1 (FPN1) transcription involving Bach1, Nrf2 and a MARE/ARE sequence motif at position -7007 of the FPN1 promoter. *Haematologica*. 2010 Aug;95(8):1261-8. doi: 10.3324/haematol.2009.020123. Epub 2010 Feb 23. PubMed PMID: 20179090; PubMed Central PMCID: PMC2913073.
- 46-Chen YC, Lin-Shiau SY, Lin JK. Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite-induced apoptosis. *J Cell Physiol* 1998 ; 177 : 324–333 ;PMID: 9766529.
- 47-Han AP, Yu C, Lu L, Fujiwara Y, Browne C, Chin G, Fleming M, Leboulch P, Orkin SH, Chen JJ. Heme-regulated eIF2alpha kinase (HRI) is required for translational regulation and survival of erythroid precursors in iron deficiency. *EMBO J*. 2001 Dec 3;20(23):6909-18. PubMed PMID: 11726526; PubMed Central PMCID: PMC125753.
- 48-Chiabrando D, Marro S, Mercurio S, Giorgi C, Petrillo S, Vinchi F, Fiorito V, Fagoonee S, Camporeale A, Turco E, Merlo GR, Silengo L, Altruda F, Pinton P, Tolosano E. The mitochondrial heme exporter FLVCR1b mediates erythroid differentiation. *J Clin Invest*. 2012 Dec;122(12):4569-79. doi: 10.1172/JCI62422. Epub 2012 Nov 26. PubMed PMID: 23187127; PubMed Central PMCID: PMC3533534.
- 49-Eckardt KU. Erythropoietin production in liver and kidneys. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1996 Jan;5(1):28-34. PMID: 8834159.
- 50-Haase VH. Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 Jul;299(1):F1-13. doi: 10.1152/ajprenal.00174.2010. Review. PubMed PMID: 20444740; PubMed Central PMCID: PMC2904169.
- 51-Liu YL, Ang SO, Weigent DA, Prchal JT, Bloomer JR. Regulation of ferrochelatase gene expression by hypoxia. *Life Sci*. 2004 Sep 10;75(17):2035-43. PubMed PMID: 15312748.
- 52-Zhang FL, Shen GM, Liu XL, Wang F, Zhao HL, Yu J, Zhang JW. Hypoxic induction of human erythroid-specific  $\delta$ -aminolevulinate synthase mediated by hypoxia-inducible factor 1. *Biochemistry*. 2011 Feb 22;50(7):1194-202. doi: 10.1021/bi101585c. Epub 2011 Jan 20. PubMed PMID: 21207956.
- 53-Shah YM, Xie L. Hypoxia-inducible factors link iron homeostasis and erythropoiesis. *Gastroenterology*. 2014 Mar;146(3):630-42. doi:10.1053/j.gastro.2013.12.031. Review. PubMed PMID: 24389303; PubMed Central PMCID: PMC3943938.
- 54-Palmieri F. The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch*. 2004 Feb;447(5):689-709. Epub 2003 Nov 4. Review. PubMed PMID: 14598172.
- 55-Guernsey DL, Jiang H, Campagna DR, Evans SC, Ferguson M, Kellogg MD, Lachance M, Matsuoka M, Nightingale M, Rideout A, Saint-Amant L, Schmidt PJ, Orr A, Bottomley SS, Fleming MD, Ludman M, Dyack S, Fernandez CV, Samuels ME. Mutations in mitochondrial carrier family gene SLC25A38 cause nonsyndromic autosomal recessive

congenital sideroblastic anemia. *Nat Genet.* 2009 Jun;41(6):651-3. doi: 10.1038/ng.359. Epub 2009 May 3. PubMed PMID: 19412178.

56-Graf SA, Haigh SE, Corson ED, Shirihai OS. Targeting, import, and dimerization of a mammalian mitochondrial ATP binding cassette (ABC) transporter, ABCB10 (ABC-me). *J Biol Chem.* 2004 Oct 8;279(41):42954-63. Epub 2004 Jun 23. PubMed PMID: 15215243.

57-Des R. Richardson, Darius J. R. Lane, Erika M. Becker, Michael L.-H. Huang, Megan Whitnall, Yohan Suryo Rahmanto, Alex D, Sheftel, Prem Ponka. Mitochondrial iron trafficking and the integration of iron metabolism between the mitochondrion and cytosol *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jun 15; 107(24): 10775–10782. Published online 2010 May 21. doi: 10.1073/pnas.0912925107.PMCID: PMC2890738

58-Chen W, Paradkar PN, Li L, Pierce EL, Langer NB, Takahashi-Makise N, Hyde BB, Shirihai OS, Ward DM, Kaplan J, Paw BH. Abcb10 physically interacts with mitoferrin-1 (Slc25a37) to enhance its stability and function in the erythroid mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Sep 22;106(38):16263-8. doi:10.1073/pnas.0904519106. Epub 2009 Sep 4. PMID: 19805291 PMCID: PMC2752562

59-Hyde BB, Liesa M, Elorza AA, Qiu W, Haigh SE, Richey L, Mikkola HK, Schlaeger TM, Shirihai OS. The mitochondrial transporter ABC-me (ABCB10), a downstream target of GATA-1, is essential for erythropoiesis in vivo. *Cell Death Differ.* 2012 Jul;19(7):1117-26. doi: 10.1038/cdd.2011.195. Epub 2012 Jan 13. PMID: 22240895 PMCID: PMC3374075

60-Bayeva M, Khechaduri A, Wu R, Burke MA, Wasserstrom JA, Singh N, Liesa M, Shirihai OS, Langer NB, Paw BH, Ardehali H. ATP-binding cassette B10 regulates early steps of heme synthesis. *Circ Res.* 2013 Jul 19;113(3):279-87. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301552. Epub 2013 May 29. PubMed PMID: 23720443; PubMed Central PMCID: PMC3817742.

61-Krishnamurthy PC, Du G, Fukuda Y, Sun D, Sampath J, Mercer KE, Wang J, Sosa-Pineda B, Murti KG, Schuetz JD. Identification of a mammalian mitochondrial, porphyrin transporter. *Nature.* 2006 Oct 5;443(7111):586-9. Epub 2006 Sep 27. PubMed PMID: 17006453.

62-Tsuchida M, Emi Y, Kida Y, Sakaguchi M. Human ABC transporter isoform B6 (ABCB6) localizes primarily in the Golgi apparatus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 May 2;369(2):369-75. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.02.027. Epub 2008 Feb 13. PubMed PMID: 18279659

63-Kiss K, Brozik A, Kucsma N, Toth A, Gera M, Berry L, Vallentin A, Vial H, Vidal M, Szakacs G. Shifting the paradigm: the putative mitochondrial protein ABCB6 resides in the lysosomes of cells and in the plasma membrane of erythrocytes. *PLoS One.* 2012;7(5):e37378. doi: 10.1371/journal.pone.0037378. Epub 2012 May 24. PubMed PMID: 22655043; PubMed Central PMCID: PMC3360040.

64-Helias V, Saison C, Ballif BA, Peyrard T, Takahashi J, Takahashi H, Tanaka M, Deybach JC, Puy H, Le Gall M, Sureau C, Pham BN, Le Pennec PY, Tani Y, Cartron JP, Arnaud L. ABCB6 is dispensable for erythropoiesis and specifies the new blood group system Langereis.

Nat Genet. 2012 Jan 15;44(2):170-3. doi: 10.1038/ng.1069. PubMed PMID: 22246506; PubMed Central PMCID: PMC3664204.

65-Fukuda Y, Cheong PL, Lynch J, Brighton C, Frase S, Kargas V, Rampersaud E, Wang Y, Sankaran VG, Yu B, Ney PA, Weiss MJ, Vogel P, Bond PJ, Ford RC, Trent RJ, Schuetz JD. The severity of hereditary porphyria is modulated by the porphyrin exporter and Lan antigen ABCB6. *Nat Commun*. 2016 Aug 10;7:12353. doi: 10.1038/ncomms12353. PubMed PMID: 27507172; PubMed Central PMCID: PMC4987512.

66-Ulrich DL, Lynch J, Wang Y, Fukuda Y, Nachagari D, Du G, Sun D, Fan Y, Tsurkan L, Potter PM, Rehg JE, Schuetz JD. ATP-dependent mitochondrial porphyrin importer ABCB6 protects against phenylhydrazine toxicity. *J Biol Chem*. 2012 Apr 13;287(16):12679-90. doi: 10.1074/jbc.M111.336180. Epub 2012 Jan 31. PMID: 22294697 PMCID: PMC3339991.

67-Quigley JG, Yang Z, Worthington MT, Phillips JD, Sabo KM, Sabath DE, Berg CL, Sassa S, Wood BL, Abkowitz JL. Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis. *Cell*. 2004 Sep 17;118(6):757-66. PubMed PMID: 15369674.

68-Keel SB, Doty RT, Yang Z, Quigley JG, Chen J, Knoblauch S, Kingsley PD, De Domenico I, Vaughn MB, Kaplan J, Palis J, Abkowitz JL. A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis. *Science*. 2008 Feb 8;319(5864):825-8. doi: 10.1126/science.1151133. PMID: 18258918.

69-Brenner DA, Didier JM, Frasier F, Christensen SR, Evans GA, Dailey HA. A molecular defect in human protoporphyria. *Am J Hum Genet*. 1992 Jun;50(6):1203-10. PubMed PMID: 1376018; PubMed Central PMCID: PMC1682545.

70-Taketani S, Inazawa J, Nakahashi Y, Abe T, Tokunaga R. Structure of the human ferrochelatase gene. Exon/intron gene organization and location of the gene to chromosome 18. *Eur J Biochem*. 1992 Apr 1;205(1):217-22. PubMed PMID: 1555582.

71-Orkin SH. Cell-specific transcription and cell differentiation in the erythroid lineage. *Curr Opin Cell Biol*. 1990 Dec;2(6):1003-12. Review. PubMed PMID: 1966005.

72-Taketani S, Fujita H. The ferrochelatase gene structure and molecular defects associated with erythropoietic protoporphyria. *J Bioenerg Biomembr*. 1995 Apr;27(2):231-8. Review. PubMed PMID: 7592570.

73-Wu CK, Dailey HA, Rose JP, Burden A, Sellers VM, Wang BC. The 2.0 Å structure of human ferrochelatase, the terminal enzyme of heme biosynthesis. *Nat Struct Biol*. 2001 Feb;8(2):156-60. PMID: 11175906

74-Rutherford T, Thompson GG, Moore MR. Heme biosynthesis in Friend erythroleukemia cells: control by ferrochelatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Feb;76(2):833-6. PubMed PMID: 284406; PubMed Central PMCID: PMC383066.

75-Wu CK, Dailey HA, Rose JP, Burden A, Sellers VM, Wang BC. The 2.0 Å structure of human ferrochelatase, the terminal enzyme of heme biosynthesis. *Nat Struct Biol*. 2001 Feb;8(2):156-60. PubMed PMID: 11175906.

76-Hunter GA, Sampson MP, Ferreira GC. Metal ion substrate inhibition of ferrochelatase. *J Biol Chem*. 2008 Aug 29;283(35):23685-91. doi: 10.1074/jbc.M803372200. Epub 2008 Jul 1. PMID: 18593702PMCID: PMC3259753

77-Taketani S, Kakimoto K, Ueta H, Masaki R, Furukawa T. Involvement of ABC7 in the biosynthesis of heme in erythroid cells: interaction of ABC7 with ferrochelatase. *Blood*. 2003 Apr 15;101(8):3274-80. Epub 2002 Dec 12. PubMed PMID: 12480705.

78-Pondarre, C., et al., Abcb7, the gene responsible for X-linked sideroblastic anemia with ataxia, is essential for hematopoiesis. *Blood*, 2007. 109(8): p. 3567-9.

79-Khan AA, Quigley JG. Control of intracellular heme levels: heme transporters and heme oxygenases. *Biochim Biophys Acta*. 2011 May;1813(5):668-82. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.008. Epub 2011 Jan 14. Review. PubMed PMID: 21238504; PubMed Central PMCID: PMC3079059.

80-Chen W, Dailey HA, Paw BH. Ferrochelatase forms an oligomeric complex with mitoferrin-1 and Abcb10 for erythroid heme biosynthesis. *Blood*. 2010 Jul 29;116(4):628-30. doi: 10.1182/blood-2009-12-259614. Epub 2010 Apr 28. PMID: 20427704 PMCID: PMC3324294.

81-Bencze KZ, Yoon T, Millán-Pacheco C, Bradley PB, Pastor N, Cowan JA, Stemmler TL. Human frataxin: iron and ferrochelatase binding surface. *Chem Commun (Camb)*. 2007 May 14;(18):1798-800. Epub 2007 Mar 28. PubMed PMID: 17476391; PubMed Central PMCID: PMC2862461.

82-Medlock AE, Shiferaw MT, Marcero JR, Vashisht AA, Wohlschlegel JA, Phillips JD, Dailey HA. Identification of the Mitochondrial Heme Metabolism Complex. *PLoS One*. 2015 Aug 19;10(8):e0135896. doi: 10.1371/journal.pone.0135896. eCollection 2015. PubMed PMID: 26287972; PubMed Central PMCID: PMC4545792.

83-Yien YY, Robledo RF, Schultz IJ, Takahashi-Makise N, Gwynn B, Bauer DE, Dass A, Yi G, Li L, Hildick-Smith GJ, Cooney JD, Pierce EL, Mohler K, Dailey TA, Miyata N, Kingsley PD, Garone C, Hattangadi SM, Huang H, Chen W, Keenan EM, Shah DI, Schlaeger TM, DiMauro S, Orkin SH, Cantor AB, Palis J, Koehler CM, Lodish HF, Kaplan J, Ward DM, Dailey HA, Phillips JD, Peters LL, Paw BH. TMEM14C is required for erythroid mitochondrial heme metabolism. *J Clin Invest*. 2014 Oct;124(10):4294-304. doi: 10.1172/JCI76979. Epub 2014 Aug 26. PubMed PMID: 25157825; PubMed Central PMCID: PMC4191016.

84-Azuma M, Kabe Y, Kuramori C, Kondo M, Yamaguchi Y, Handa H. Adenine nucleotide translocator transports haem precursors into mitochondria. *PLoS One*. 2008 Aug 27;3(8):e3070. doi: 10.1371/journal.pone.0003070. PMID: 18728780 PMCID: PMC2516936

85-Kabe Y, Ohmori M, Shinouchi K, Tsuboi Y, Hirao S, Azuma M, Watanabe H, Okura I, Handa H. Porphyrin accumulation in mitochondria is mediated by 2-oxoglutarate carrier. *J Biol Chem*. 2006 Oct 20;281(42):31729-35. Epub 2006 Aug 18. PubMed PMID: 16920706.

86-Woodard SI, Dailey HA. Multiple regulatory steps in erythroid heme biosynthesis. *Arch Biochem Biophys*. 2000 Dec 15;384(2):375-8. PubMed PMID: 11368326.

87-Furuyama K, Sassa S. Interaction between succinyl CoA synthetase and the heme-biosynthetic enzyme ALAS-E is disrupted in sideroblastic anemia. *J Clin Invest*. 2000 Mar;105(6):757-64. PubMed PMID: 10727444; PubMed Central PMCID: PMC377455.

88-Piel RB 3rd, Shiferaw MT, Vashisht AA, Marcero JR, Praissman JL, Phillips JD, Wohlschlegel JA, Medlock AE. A Novel Role for Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1): A Partner and Regulator of Ferrochelatase. *Biochemistry*. 2016 Sep 20;55(37):5204-17. doi: 10.1021/acs.biochem.6b00756. PubMed PMID: 27599036.

89-Beutler E, Gelbart T, Lee P, Trevino R, Fernandez MA, Fairbanks VF. Molecular characterization of a case of a transferrinemia. *Blood*. 2000 Dec 15;96(13):4071-4. PubMed PMID: 11110675.

90-Richardson DR, Ponka P. The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Mar 14;1331(1):1-40. Review. PubMed PMID: 9325434.

91-He QY, Mason AB, Nguyen V, MacGillivray RT, Woodworth RC. The chloride effect is related to anion binding in determining the rate of iron release from the human transferrin N-lobe. *Biochem J*. 2000 Sep 15;350 Pt 3:909-15. PubMed PMID: 10970808; PubMed Central PMCID: PMC1221326.

92-Neckers LM, Trepel JB. Transferrin receptor expression and the control of cell growth. *Cancer Invest*. 1986;4(5):461-70. PubMed PMID: 3026588.

93-Testa U, Pelosi E, Peschle C. The transferrin receptor. *Crit Rev Oncog*. 1993;4(3):241-76. Review. PubMed PMID: 8485201.

94-Ponka P, Lok CN. The transferrin receptor: role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999 Oct;31(10):1111-37. Review. PubMed PMID: 10582342.

95-Li Q, Zhou L, Shen Y. [Recent research progresses of transferrin receptor 1 in central nervous system]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*. 2012 Jun;43(3):188-92. Review. Chinese. PubMed PMID: 23019921.

96-Tortorella S, Karagiannis TC. Transferrin receptor-mediated endocytosis: a useful target for cancer therapy. *J Membr Biol*. 2014 Apr;247(4):291-307. doi: 10.1007/s00232-014-9637-0. Epub 2014 Feb 27. Review. PubMed PMID: 24573305.

97-Schmidt PJ, Toran PT, Giannetti AM, Bjorkman PJ, Andrews NC. The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell Metab*. 2008 Mar;7(3):205-14. doi: 10.1016/j.cmet.2007.11.016. PubMed PMID: 18316026; PubMed Central PMCID: PMC2292811.

98-Chen AC, Donovan A, Ned-Sykes R, Andrews NC. Noncanonical role of transferrin receptor 1 is essential for intestinal homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Sep

15;112(37):11714-9. doi: 10.1073/pnas.1511701112. PubMed PMID: 26324903; PubMed Central PMCID: PMC4577163.

99-Jabara HH, Boyden SE, Chou J, Ramesh N, Massaad MJ, Benson H, Bainter W, Fraulino D, Rahimov F, Sieff C, Liu ZJ, Alshemmari SH, Al-Ramadi BK, Al-Dhekri H, Arnaout R, Abu-Shukair M, Vatsayan A, Silver E, Ahuja S, Davies EG, Sola-Visner M, Ohsumi TK, Andrews NC, Notarangelo LD, Fleming MD, Al-Herz W, Kunkel LM, Geha RS. A missense mutation in TFRC, encoding transferrin receptor 1, causes combined immunodeficiency. *Nat Genet.* 2016 Jan;48(1):74-8. doi: 10.1038/ng.3465. PubMed PMID: 26642240; PubMed Central PMCID: PMC4696875.

100-Daniels TR, Bernabeu E, Rodríguez JA, Patel S, Kozman M, Chiappetta DA, Holler E, Ljubimova JY, Helguera G, Penichet ML. The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Mar;1820(3):291-317. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.07.016. Epub 2011 Aug 5. Review. PubMed PMID: 21851850; PubMed Central PMCID: PMC3500658.

101-Deaglio S, Capobianco A, Calì A, Bellora F, Alberti F, Righi L, Sapino A, Camaschella C, Malavasi F. Structural, functional, and tissue distribution analysis of human transferrin receptor-2 by murine monoclonal antibodies and a polyclonal antiserum. *Blood.* 2002 Nov 15;100(10):3782-9. PubMed PMID: 12393650.

102-Wiśniewski JR, Hein MY, Cox J, Mann M. A "proteomic ruler" for protein copy number and concentration estimation without spike-in standards. *Mol Cell Proteomics.* 2014 Dec;13(12):3497-506. doi: 10.1074/mcp.M113.037309. PubMed PMID: 25225357; PubMed Central PMCID: PMC4256500.

103-Kawabata H, Germain RS, Vuong PT, Nakamaki T, Said JW, Koeffler HP. Transferrin receptor 2- $\alpha$  supports cell growth both in iron-chelated cultured cells and in vivo. *J Biol Chem.* 2000 Jun 2;275(22):16618-25. PubMed PMID:10748106.

104-West AP Jr, Bennett MJ, Sellers VM, Andrews NC, Enns CA, Bjorkman PJ. Comparison of the interactions of transferrin receptor and transferrin receptor 2 with transferrin and the hereditary hemochromatosis protein HFE. *J Biol Chem.* 2000 Dec 8;275(49):38135-8. PubMed PMID: 11027676.

105-Pagani A, Vieillevoys M, Nai A, Rausa M, Ladli M, Lacombe C, Mayeux P, Verdier F, Camaschella C, Silvestri L. Regulation of cell surface transferrin receptor-2 by iron-dependent cleavage and release of a soluble form. *Haematologica.* 2015 Apr;100(4):458-65. doi: 10.3324/haematol.2014.118521. PubMed PMID: 25637053; PubMed Central PMCID: PMC4380718.

106-Omary MB, Trowbridge IS. Biosynthesis of the human transferrin receptor in cultured cells. *J Biol Chem.* 1981 Dec 25;256(24):12888-92. PubMed PMID: 6273413.

107-Omary MB, Trowbridge IS. Covalent binding of fatty acid to the transferrin receptor in cultured human cells. *J Biol Chem.* 1981 May 25;256(10):4715-8. PubMed PMID: 6262300.

108-Vernet M. The transferrin receptor: its role in iron metabolism and its diagnosis utility. *Ann Biol Clin (Paris).* 1999 Jan-Feb;57(1):9-18. Review. French. PubMed PMID: 9920962.



- 109-Mayle KM, Le AM, Kamei DT. The intracellular trafficking pathway of transferrin. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Mar;1820(3):264–81.doi:10.1016/j.bbagen.2011.09.009. Epub 2011 Sep 22. Review. PubMed PMID: 21968002;PubMed Central PMCID: PMC3288267.
- 110-Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*. 2003 Mar 6;422(6927):37-44. Review. PubMed PMID: 12621426.
- 111-Ciechanover A, Schwartz AL, Dautry-Varsat A, Lodish HF. Kinetics of internalization and recycling of transferrin and the transferrin receptor in a human hepatoma cell line. Effect of lysosomotropic agents. *J Biol Chem*. 1983 Aug 25;258(16):9681-9. PubMed PMID: 6309781.
- 112-Dautry-Varsat A, Ciechanover A, Lodish HF. pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 Apr;80(8):2258-62. PubMed PMID: 6300903; PubMed Central PMCID: PMC393798.
- 113-Schmid SL, Fuchs R, Male P, Mellman I. Two distinct subpopulations of endosomes involved in membrane recycling and transport to lysosomes. *Cell*. 1988 Jan 15;52(1):73-83. PubMed PMID: 3345561.
- 114-Moore RH, Millman EE, Alpizar-Foster E, Dai W, Knoll BJ. Rab11 regulates the recycling and lysosome targeting of beta2-adrenergic receptors. *J Cell Sci*. 2004 Jul 1;117(Pt 15):3107-17. PubMed PMID: 15190120.
- 115-Stein BS, Sussman HH. Demonstration of two distinct transferrin receptor recycling pathways and transferrin-independent receptor internalization in K562 cells. *J Biol Chem*. 1986 Aug 5;261(22):10319-31. PubMed PMID: 3015925.
- 116-Jin M, Snider MD. Role of microtubules in transferrin receptor transport from the cell surface to endosomes and the Golgi complex. *J Biol Chem*. 1993 Aug 25;268(24):18390-7. PubMed PMID: 8349714.
- 117-Bleil JD, Bretscher MS. Transferrin receptor and its recycling in HeLa cells. *EMBO J*. 1982;1(3):351-5. PMID: 6325161.
- 118-Pippard, M. J. Iron deficiency anemia, anemia of chronic disorders and iron overload. *Blood and bone marrow pathology*. ed. / Anna Porwit; Jeffrey McCullough; Wendy N. Erber. 2nd. ed. Edinburgh : Churchill Livingstone, 2011. p. 173-195
- 119-Li J, Hale J, Bhagia P, et al. Isolation and transcriptome analyses of human erythroid progenitors: BFU-E and CFU-E. *Blood* 2014; 124:3636–3645.
- 120-An X. The red cell membrane, part 2: disorders of the red cell membrane. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2014 Sep;12(9):606-8. PubMed PMID: 25654482.
- 121-Moura IC, Hermine O, Lacombe C, Mayeux P. Erythropoiesis and transferrin receptors. *Curr Opin Hematol*. 2015 May;22(3):193-8. doi: 10.1097/MOH.0000000000000133. Review. PubMed PMID: 25767952.

122-Mattia E, Rao K, Shapiro DS, Sussman HH, Klausner RD. Biosynthetic regulation of the human transferrin receptor by desferrioxamine in K562 cells. *J Biol Chem*. 1984 Mar 10;259(5):2689-92. PubMed PMID: 6142046.

123-Schranzhofer M, Schiffrer M, Cabrera JA, et al. Remodeling the regulation of iron metabolism during erythroid differentiation to ensure efficient heme biosynthesis. *Blood* 2006; 107:4159–4167

124-Kerenyi MA, Grebien F, Gehart H, Schiffrer M, Artaker M, Kovacic B, Beug H, Moriggl R, Müllner EW. Stat5 regulates cellular iron uptake of erythroid cells via IRP-2 and TfR-1. *Blood*. 2008 Nov 1;112(9):3878-88. doi: 10.1182/blood-2008-02-138339. Epub 2008 Aug 11. PMID: 18694996.

125-Zhu BM, McLaughlin SK, Na R, Liu J, Cui Y, Martin C, Kimura A, Robinson GW, Andrews NC, Hennighausen L. Hematopoietic-specific Stat5-null mice display microcytic hypochromic anemia associated with reduced transferrin receptor gene expression. *Blood*. 2008 Sep 1;112(5):2071-80. doi: 10.1182/blood-2007-12-127480. PubMed PMID: 18552213; PubMed Central PMCID: PMC2518907.

126-Onkovsky HL, Healey JF, Pohl J. Purification and characterization of heme oxygenase from chick liver: comparison of the avian and mammalian enzymes. *Eur J Biochem*. 1990; 189:155–166. PubMed PMID: 2158889.

127-Anderson, KE.; Sassa, S.; Bishop, DF.; Desnick, RJ. The Online Metabolic & Molecular Basis of Inherited Disease. Bishop, DF., editor. McGraw-Hill; New York, NY: 2011. p. 1-153.

128-Ramanujam VM, Anderson KE. Porphyria Diagnostics-Part 1: A Brief Overview of the Porphyrias. *Curr Protoc Hum Genet*. 2015 Jul 1;86:17.20.1-26. doi: 10.1002/0471142905.hg1720s86. PubMed PMID: 26132003; PubMed Central PMCID: PMC4640448.

129-Pischik E, Kauppinen R. An update of clinical management of acute intermittent porphyria. *Appl Clin Genet*. 2015 Sep 1;8:201-14. doi: 10.2147/TACG.S48605. Review. PubMed PMID: 26366103; PubMed Central PMCID: PMC4562648.

130-Podvinec M, Handschin C, Looser R, Meyer UA. Identification of the xenosensors regulating human 5-aminolevulinate synthase. *ProcNatlAcadSci U S A*. 2004;101:9127-9132.

131Egger NG, Goeger DE, Payne DA, Miskovsky EP, Weinman SA, and Anderson KE (2002) Porphyria cutanea tarda: multiplicity of risk factors including HFE mutations, hepatitis C, and inherited uroporphyrinogen decarboxylase deficiency. *Dig Dis Sci* 47(2):419–426.

132-Balwani M, Desnick RJ. The porphyrias: advances in diagnosis and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:19-27. doi: 10.1182/asheducation-2012.1.19. Review. Erratum in: *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:692. PubMed PMID: 23233556.

- 133-Peoc'h K, Martin-Schmitt C, Talbi N, Deybach JC, Gouya L, Puy H. [Porphyrias and haem related disorders]. *Rev Med Interne*. 2016 Mar;37(3):173-85. doi: 10.1016/j.revmed.2015.12.005. Epub 2016 Jan 7. French. PubMed PMID: 26774916.
- 134-Whatley SD, Ducamp S, Gouya L, Grandchamp B, Beaumont C, Badminton MN, Elder GH, Holme SA, Anstey AV, Parker M, Corrigall AV, Meissner PN, Hift RJ, Marsden JT, Ma Y, Mieli-Vergani G, Deybach JC, Puy H. C-terminal deletions in the ALAS2 gene lead to gain of function and cause X-linked dominant protoporphyria without anemia or iron overload. *Am J Hum Genet*. 2008 Sep;83(3):408-14. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.08.003. Epub 2008 Sep 4. PubMed PMID: 18760763; PubMed Central PMCID: PMC2556430.
- 135-Lim HW. Pathogenesis of photosensitivity in the cutaneous porphyrias. *J Invest Dermatol*. 2005 Jan;124(1):xvi-xvii. Review. PubMed PMID: 15654946.
- 136-Koningsberger JC, Rademakers LH, van Hattum J, de la Faille HB, Wiegman LJ, Italiaander E, van Berge Henegouwen GP, Marx JJ. Exogenous protoporphyrin inhibits Hep G2 cell proliferation, increases the intracellular hydrogen peroxide concentration and causes ultrastructural alterations. *J Hepatol*. 1995 Jan;22(1):57-65. PubMed PMID: 7751588.
- 137-Lyoumi S, Abitbol M, Rainteau D, Karim Z, Bernex F, Oustric V, Millot S, Lettéron P, Heming N, Guillmot L, Montagutelli X, Berdeaux G, Gouya L, Poupon R, Deybach JC, Beaumont C, Puy H. Protoporphyrin retention in hepatocytes and Kupffer cells prevents sclerosing cholangitis in erythropoietic protoporphyria mouse model. *Gastroenterology*. 2011 Oct;141(4):1509-19, 1519.e1-3. doi: 10.1053/j.gastro.2011.06.078. Epub 2011 Jul 14. PubMed PMID: 21762662.
- 138-Thunell S. Porphyrins, porphyrin metabolism and porphyrias. I. Update. *Scand J Clin Lab Invest*. 2000 Nov;60(7):509-40. Review. PubMed PMID: 11202048.
- 139-Gross U, Frank M, Doss MO. Hepatic complications of erythropoietic protoporphyria. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 1998 Apr;14(2):52-7. PubMed PMID: 9638724.
- 140- Casanova-González MJ, Trapero-Marugán M, Jones EA, Moreno-Otero R. Liver disease and erythropoietic protoporphyria: a concise review. *World J Gastroenterol*. 2010 Sep 28;16(36):4526-31. Review. PubMed PMID: 20857522; PubMed Central PMCID: PMC2945483.
- 141-Delaby C, Lyoumi S, Ducamp S, Martin-Schmitt C, Gouya L, Deybach JC, Beaumont C, Puy H. Excessive erythrocyte PPIX influences the hematologic status and iron metabolism in patients with dominant erythropoietic protoporphyria. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2009 Feb 16;55(1):45-52. PubMed PMID: 19268001.
- 142-Holme SA, Worwood M, Anstey AV, Elder GH, Badminton MN. Erythropoiesis and iron metabolism in dominant erythropoietic protoporphyria. *Blood*. 2007 Dec 1;110(12):4108-10. Epub 2007 Sep 5. PubMed PMID: 17804693.
- 143-Lyoumi S, Abitbol M, Andrieu V, Henin D, Robert E, Schmitt C, Gouya L, de Verneuil H, Deybach JC, Montagutelli X, Beaumont C, Puy H. Increased plasma transferrin, altered body iron distribution, and microcytic hypochromic anemia in ferrochelatase-deficient mice. *Blood*. 2007 Jan 15;109(2):811-8. Epub 2006 Sep 26. PubMed PMID: 17003376.

- 144- Gouya L, Deybach JC, Lamoril J, Da Silva V, Beaumont C, Grandchamp B, Nordmann Y. Modulation of the phenotype in dominant erythropoietic protoporphyria by a low expression of the normal ferrochelatase allele. *Am J Hum Genet.* 1996 Feb;58(2):292-9. PubMed PMID: 8571955; PubMed Central PMCID: PMC1914527.
- 145-Gouya L, Puy H, Robreau AM, Bourgeois M, Lamoril J, Da Silva V, Grandchamp B, Deybach JC. The penetrance of dominant erythropoietic protoporphyria is modulated by expression of wildtype FECH. *Nat Genet.* 2002 Jan;30(1):27-8. Epub 2001 Dec 20. PubMed PMID: 11753383.
- 146-Went LN, Klasen EC. Genetic aspects of erythropoietic protoporphyria. *Ann Hum Genet.* 1984 May;48(Pt 2):105-17. PubMed PMID: 6742776.
- 147-Nakano H, Nakano A, Toyomaki Y, Ohashi S, Harada K, Moritsugu R, Takeda H, Kawada A, Mitsuhashi Y, Hanada K. Novel ferrochelatase mutations in Japanese patients with erythropoietic protoporphyria: high frequency of the splice site modulator IVS3-48C polymorphism in the Japanese population. *J Invest Dermatol.* 2006 Dec;126(12):2717-9. Epub 2006 Jun 22. PMID:16794582.
- 148- Lau KC, Lam CW, Fong B, Siu TS, Tam S. DNA-based diagnosis of erythropoietic protoporphyria in two families and the frequency of a low-expression FECH allele in a Chinese population. *Clin Chim Acta.* 2009 Feb;400(1-2):132-4. doi: 10.1016/j.cca.2008.09.031. PubMed PMID: 18976643.
- 149-Risheg H, Chen FP, Bloomer JR. Genotypic determinants of phenotype in North American patients with erythropoietic protoporphyria. *Mol Genet Metab.* 2003 Sep-Oct;80(1-2):196-206. PMID: 14567969.
- 150-Wiman A, Floderus Y, Harper P. Novel mutations and phenotypic effect of the splice site modulator IVS3-48C in nine Swedish families with erythropoietic protoporphyria. *J Hum Genet.* 2003;48(2):70-6. PMID: 12601550
- 151-Schneider-Yin X, Mamet R, Minder EI, Schoenfeld N. Biochemical and molecular diagnosis of erythropoietic protoporphyria in an Ashkenazi Jewish family. *J Inherit Metab Dis.* 2008 Dec;31 Suppl 2:S363-7. doi: 10.1007/s10545-008-0924-8. Epub 2008 Aug 31. PMID: 18758989
- 152-Parker M, Corrigall AV, Hift RJ, Meissner PN. Molecular characterization of erythropoietic protoporphyria in South Africa. *Br J Dermatol.* 2008 Jul;159(1):182-91. doi: 10.1111/j.1365-2133.2008.08580.x. Epub 2008 Jul 1. PMID: 18460026.
- 153-Whatley SD, Mason NG, Khan M, Zamiri M, Badminton MN, Missaoui WN, Dailey TA, Dailey HA, Douglas WS, Wainwright NJ, Elder GH. Autosomal recessive erythropoietic protoporphyria in the United Kingdom: prevalence and relationship to liver disease. *J Med Genet.* 2004 Aug;41(8):e105. PMID: 15286165
- 154-Thapar M, Bonkovsky HL. The diagnosis and management of erythropoietic protoporphyria. *Gastroenterol Hepatol (N Y).* 2008 Aug;4(8):561-6. PMID: 21960936.

155-Goodwin RG, Kell WJ, Laidler P, Long CC, Whatley SD, McKinley M, Badminton MN, Burnett AK, Williams GT, Elder GH. Photosensitivity and acute liver injury in myeloproliferative disorder secondary to late-onset protoporphyria caused by deletion of a ferrochelatase gene in hematopoietic cells. *Blood*. 2006 Jan 1;107(1):60-2. Epub 2005 Sep 8. PMID: 16150949.

156-Sarkany RP, Ross G, Willis F. Acquired erythropoietic protoporphyria as a result of myelodysplasia causing loss of chromosome 18. *Br J Dermatol*. 2006 Aug;155(2):464-6. PMID: 16882191.

157-Michaels BD, Del Rosso JQ, Mobini N, Michaels JR. Erythropoietic protoporphyria: a case report and literature review. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2010 Jul;3(7):44-8. PubMed PMID: 20725556; PubMed Central PMCID: PMC2921755.

158-Arceci, Robert.; Hann, Ian M.; Smith, Owen P. (2006). *Pediatric hematolog*. Malden, Mass.: Blackwell Pub. ISBN 978-1-4051-3400-2

159-Gouya L, Martin-Schmitt C, Robreau AM, Austerlitz F, Da Silva V, Brun P, Simonin S, Lyoumi S, Grandchamp B, Beaumont C, Puy H, Deybach JC. Contribution of a common single-nucleotide polymorphism to the genetic predisposition for erythropoietic protoporphyria. *Am J Hum Genet*. 2006 Jan;78(1):2-14. Epub 2005 Nov 15. PubMed PMID: 16385445; PubMed Central PMCID: PMC1380220.

160-Wiman A, Floderus Y, Harper P. Novel mutations and phenotypic effect of the splice site modulator IVS3-48C in nine Swedish families with erythropoietic protoporphyria. *J Hum Genet*. 2003;48(2):70-6. PMID: 12601550.

161-Elder GH, Gouya L, Whatley SD, Puy H, Badminton MN, Deybach JC. The molecular genetics of erythropoietic protoporphyria. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2009 Jul 1;55(2):118-26. Review. PubMed PMID: 19656460.

162-Schneider-Yin X, Mamet R, Minder EI, Schoenfeld N. Biochemical and molecular diagnosis of erythropoietic protoporphyria in an Ashkenazi Jewish family. *J Inherit Metab Dis*. 2008 Dec;31 Suppl 2:S363-7. doi: 10.1007/s10545-008-0924-8. Epub 2008 Aug 31. PMID: 18758989

163-Whatley SD, Mason NG, Khan M, Zamiri M, Badminton MN, Missaoui WN, Dailey TA, Dailey HA, Douglas WS, Wainwright NJ, Elder GH. Autosomal recessive erythropoietic protoporphyria in the United Kingdom: prevalence and relationship to liver disease. *J Med Genet*. 2004 Aug;41(8):e105. PMID: 15286165

164-Holme SA, Anstey AV, Finlay AY, Elder GH, Badminton MN. Erythropoietic protoporphyria in the U.K.: clinical features and effect on quality of life. *Br J Dermatol*. 2006 Sep;155(3):574-81. PubMed PMID: 16911284.

165-Harper P, Wahlin S. Treatment options in acute porphyria, porphyria cutanea tarda, and erythropoietic protoporphyria. *Curr Treat Options Gastroenterol*. 2007 Dec;10(6):444-55. PubMed PMID: 18221605.

166-Minder EI, Schneider-Yin X, Steurer J, Bachmann LM. A systematic review of treatment options for dermal photosensitivity in erythropoietic protoporphyria. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2009 Feb 16;55(1):84-97. Review. PubMed PMID:19268006.

167-Collins P, Ferguson J. Narrow-band UVB (TL-01) phototherapy: an effective preventative treatment for the photodermatoses. *Br J Dermatol*. 1995 Jun;132(6):956-63. PubMed PMID: 7662575.

168- Langendonk JG, Balwani M, Anderson KE, Bonkovsky HL, Anstey AV, Bissell DM, Bloomer J, Edwards C, Neumann NJ, Parker C, Phillips JD, Lim HW, Hamzavi I, Deybach JC, Kauppinen R, Rhodes LE, Frank J, Murphy GM, Karstens FP, Sijbrands EJ, de Rooij FW, Lebwohl M, Naik H, Goding CR, Wilson JH, Desnick RJ. Afamelanotide for Erythropoietic Protoporphyria. *N Engl J Med*. 2015 Jul 2;373(1):48-59. doi: 10.1056/NEJMoa1411481. PubMed PMID: 26132941; PubMed Central PMCID: PMC4780255

169-Esther S. Kim and Karly P.Garnock-Jones. Afamelanotide : A Review in Erythropoietic Porphyria. *American journal of clinical dermatology*. April 2016, Volume 17, Issue 2, pp179-185.DOI: 10.1007/s40257-016-0184-6

170 -Wahlin S, Srikanthan N, Hamre B, Harper P, Brun A. Protection from phototoxic injury during surgery and endoscopy in erythropoietic protoporphyria. *Liver Transpl*. 2008 Sep;14(9):1340-6. doi: 10.1002/lt.21527. PubMed PMID: 18756472.

171-Boffa MJ, Ead RD, Reed P, Weinkove C. A double-blind, placebo-controlled, crossover trial of oral vitamin C in erythropoietic protoporphyria. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 1996 Feb;12(1):27-30. PubMed PMID: 8884896.

172-Mathews-Roth MM, Rosner B. Long-term treatment of erythropoietic protoporphyria with cysteine. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2002 Dec;18(6):307-9.PMID: 12535027.

173-Farr PM, Diffey BL, Matthews JN. Inhibition of photosensitivity in erythropoietic protoporphyria with terfenadine. *Br J Dermatol*. 1990 Jun;122(6):809-15. PubMed PMID: 1973359.

174-Eichbaum QG, Dzik WH, Chung RT, Szczepiorkowski ZM. Red blood cell exchange transfusion in two patients with advanced erythropoietic protoporphyria. *Transfusion*. 2005 Feb;45(2):208-13. PubMed PMID: 15660829.

175-Wahlin S, Srikanthan N, Hamre B, Harper P, Brun A. Protection from phototoxic injury during surgery and endoscopy in erythropoietic protoporphyria. *Liver Transpl*. 2008 Sep;14(9):1340-6. doi: 10.1002/lt.21527. PubMed PMID: 18756472.

176-Dellon ES, Szczepiorkowski ZM, Dzik WH, Graeme-Cook F, Ades A, Bloomer JR, Cosimi AB, Chung RT. Treatment of recurrent allograft dysfunction with intravenous hematin after liver transplantation for erythropoietic protoporphyria. *Transplantation*. 2002 Mar 27;73(6):911-5. PubMed PMID: 11923691.

177-Dobozy A, Csató M, Siklósi C, Simon N. Transfusion therapy for erythropoietic protoporphyria. *Br J Dermatol*. 1983 Nov;109(5):571-6. PubMed PMID: 6639879.

178-McCullough AJ, Barron D, Mullen KD, Petrelli M, Park MC, Mukhtar H, Bickers DR. Fecal protoporphyrin excretion in erythropoietic protoporphyria: effect of cholestyramine and bile acid feeding. *Gastroenterology*. 1988 Jan;94(1):177-81. PubMed PMID: 3335288.

179-Gorchein A, Foster GR. Liver failure in protoporphyria: long-term treatment with oral charcoal. *Hepatology*. 1999 Mar;29(3):995-6. PMID: 10189233

180-Anstey AV, Hift RJ. Liver disease in erythropoietic protoporphyria: insights and implications for management. *Postgrad Med J*. 2007 Dec;83(986):739-48. Review. PubMed PMID: 18057171; PubMed Central PMCID: PMC2750922.

181-Dowman JK, Gunson BK, Mirza DF, Badminton MN, Newsome PN; UK Liver Selection and Allocation Working Party. UK experience of liver transplantation for erythropoietic protoporphyria. *J Inher Metab Dis*. 2011 Apr;34(2):539-45. doi: 10.1007/s10545-010-9272-6. Epub 2011 Feb 8. PubMed PMID: 21301964; PubMed Central PMCID: PMC3101349.

182-Gross U, Frank M, Doss MO. Hepatic complications of erythropoietic protoporphyria. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 1998 Apr;14(2):52-7. PubMed PMID: 9638724.

183-McGuire BM, Bonkovsky HL, Carithers RL Jr, Chung RT, Goldstein LI, Lake JR, Lok AS, Potter CJ, Rand E, Voigt MD, Davis PR, Bloomer JR. Liver transplantation for erythropoietic protoporphyria liver disease. *Liver Transpl*. 2005 Dec;11(12):1590-6. PubMed PMID: 16315313.

184-Meerman L, Haagsma EB, Gouw AS, Slooff MJ, Jansen PL. Long-term follow-up after liver transplantation for erythropoietic protoporphyria. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1999 Apr;11(4):431-8. PubMed PMID: 10321761.

185-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 Dec;118(6):e1896-9. Epub 2006 Oct 30. PubMed PMID: 17074841.

186-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 Jul;5(7):768-73. PubMed PMID: 10395321.

187-Tutois S, Montagutelli X, Da Silva V, Jouault H, Rouyer-Fessard P, Leroy-Viard K, Guénet JL, Nordmann Y, Beuzard Y, Deybach JC. Erythropoietic protoporphyria in the house mouse. A recessive inherited ferrochelatase deficiency with anemia, photosensitivity, and liver disease. *J Clin Invest*. 1991 Nov;88(5):1730-6. PubMed PMID: 1939658; PubMed Central PMCID: PMC295715.

188-Boulechfar S, Lamoril J, Montagutelli X, Guenet JL, Deybach JC, Nordmann Y, Dailey H, Grandchamp B, de Verneuil H. Ferrochelatase structural mutant (Fechm1Pas) in the house mouse. *Genomics*. 1993 Jun;16(3):645-8. PubMed PMID: 8325637.

189-Fontanellas A, Mendez M, Mazurier F, Cario-André M, Navarro S, Ged C, Taine L, Geronimi F, Richard E, Moreau-Gaudry F, Enriquez De Salamanca R, de Verneuil H.

Successful therapeutic effect in a mouse model of erythropoietic protoporphyria by partial genetic correction and fluorescence-based selection of hematopoietic cells. *Gene Ther.* 2001 Apr;8(8):618-26. PubMed PMID: 11320408.

190-Richard E, Mendez M, Mazurier F, Morel C, Costet P, Xia P, Fontanellas A, Geronimi F, Cario-André M, Taine L, Ged C, Malik P, de Verneuil H, Moreau-Gaudry F. Gene therapy of a mouse model of protoporphyria with a self-inactivating erythroid-specific lentiviral vector without preselection. *Mol Ther.* 2001 Oct;4(4):331-8. PubMed PMID: 11592836.

191-Duchartre Y, Petit N, Moya C, Lalanne M, Dubus P, Verneuil Hd, Moreau-Gaudry F, Richard E. Neonatal bone marrow transplantation prevents liver disease in a murine model of erythropoietic protoporphyria. *J Hepatol.* 2011 Jul;55(1):162-70. doi: 10.1016/j.jhep.2010.09.029. PubMed PMID: 21145811.

192-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 Jan;124(1):256-62. PubMed PMID: 15654982.

193-Oustric V, Manceau H, Ducamp S, Soaid R, Karim Z, Schmitt C, Mirmiran A, Peoc'h K, Grandchamp B, Beaumont C, Lyoumi S, Moreau-Gaudry F, Guyonnet-Dupérat V, de Verneuil H, Marie J, Puy H, Deybach JC, Gouya L. Antisense oligonucleotide-based therapy in human erythropoietic protoporphyria. *Am J Hum Genet.* 2014 Apr 3;94(4):611-7. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.02.010. PubMed PMID: 24680888; PubMed Central PMCID: PMC3980518.

194-Bennett CF, Swayze EE. RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2010;50:259-93. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.010909.105654. Review. PubMed PMID: 20055705.

195-Southwell AL, Skotte NH, Bennett CF, Hayden MR. Antisense oligonucleotide therapeutics for inherited neurodegenerative diseases. *Trends Mol Med.* 2012 Nov;18(11):634-43. doi: 10.1016/j.molmed.2012.09.001. Review. PubMed PMID: 23026741.

196-Lehto T, Ezzat K, Wood MJ, El Andaloussi S. Peptides for nucleic acid delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016 Nov 15;106(Pt A):172-182. doi: 10.1016/j.addr.2016.06.008. Review. PubMed PMID: 27349594.

197- El-Andaloussi S, Johansson HJ, Lundberg P, Langel U. Induction of splice correction by cell-penetrating peptide nucleic acids. *J Gene Med.* 2006 Oct;8(10):1262-73. PubMed PMID: 16900561.

198-Abes S, Moulton H, Turner J, Clair P, Richard JP, Iversen P, Gait MJ, Lebleu B. Peptide-based delivery of nucleic acids: design, mechanism of uptake and applications to splice-correcting oligonucleotides. *Biochem Soc Trans.* 2007 Feb;35(Pt 1):53-5. Review. PubMed PMID: 17233600.



- 199-Dominski Z, Kole R. Restoration of correct splicing in thalassemic pre-mRNA by antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Sep 15;90(18):8673-7. PubMed PMID: 8378346; PubMed Central PMCID: PMC47420.
- 200-Cohn RD, Campbell KP. Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve*. 2000 Oct;23(10):1456-71. Review. PubMed PMID: 11003781.
- 201-Porensky PN, Burghes AH. Antisense oligonucleotides for the treatment of spinal muscular atrophy. *Hum Gene Ther*. 2013 May;24(5):489-98. doi: 10.1089/hum.2012.225. Review. PubMed PMID: 23544870; PubMed Central PMCID: PMC3655628.
- 202-Lagier-Tourenne C, Baughn M, Rigo F, Sun S, Liu P, Li HR, Jiang J, Watt AT, Chun S, Katz M, Qiu J, Sun Y, Ling SC, Zhu Q, Polymenidou M, Drenner K, Artates JW, McAlonis-Downes M, Markmiller S, Hutt KR, Pizzo DP, Cady J, Harms MB, Baloh RH, Vandenberg SR, Yeo GW, Fu XD, Bennett CF, Cleveland DW, Ravits J. Targeted degradation of sense and antisense C9orf72 RNA foci as therapy for ALS and frontotemporal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Nov 19;110(47):E4530-9. doi: 10.1073/pnas.1318835110. PubMed PMID: 24170860; PubMed Central PMCID: PMC3839752.
- 203-Skotte NH, Southwell AL, Østergaard ME, Carroll JB, Warby SC, Doty CN, Petoukhov E, Vaid K, Kordasiewicz H, Watt AT, Freier SM, Hung G, Seth PP, Bennett CF, Swayze EE, Hayden MR. Allele-specific suppression of mutant huntingtin using antisense oligonucleotides: providing a therapeutic option for all Huntington disease patients. *PLoS One*. 2014 Sep 10;9(9):e107434. doi: 10.1371/journal.pone.0107434. PubMed PMID: 25207939; PubMed Central PMCID: PMC4160241.
- 204-Kalbfuss B, Mabon SA, Misteli T. Correction of alternative splicing of tau in frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17. *J Biol Chem*. 2001 Nov 16;276(46):42986-93. PubMed PMID: 11560926.
- 205-Khoo B, Krainer AR. Splicing therapeutics in SMN2 and APOB. *Curr Opin Mol Ther*. 2009 Apr;11(2):108-15. Review. PubMed PMID: 19330716; PubMed Central PMCID: PMC3140428.
- 206-Bestas B, Turunen JJ, Blomberg KE, Wang Q, Månsson R, El Andaloussi S, Berglöf A, Smith CI. Splice-correction strategies for treatment of X-linked agammaglobulinemia. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2015 Mar;15(3):510. doi: 10.1007/s11882-014-0510-0. Review. PubMed PMID: 25638286; PubMed Central PMCID: PMC4312560.
- 207-Kole R, Krainer AR, Altman S. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat Rev Drug Discov*. 2012 Jan 20;11(2):125-40. doi: 10.1038/nrd3625. Review. PubMed PMID: 22262036; PubMed Central PMCID: PMC4743652.
- 208-Komin A, Russell LM, Hristova KA, Searson PC. Peptide-based strategies for enhanced cell uptake, transcellular transport, and circulation: Mechanisms and challenges. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016 Jun 13. pii: S0169-409X(16)30186-7. doi: 10.1016/j.addr.2016.06.002. [Epub ahead of print] Review. PubMed PMID: 27313077.

- 209-Geary RS, Norris D, Yu R, Bennett CF. Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015 Jun 29;87:46-51. doi: 10.1016/j.addr.2015.01.008. Review. PubMed PMID: 25666165.
- 210-Juliano RL, Ming X, Carver K, Laing B. Cellular uptake and intracellular trafficking of oligonucleotides: implications for oligonucleotide pharmacology. *Nucleic Acid Ther.* 2014 Apr;24(2):101-13. doi: 10.1089/nat.2013.0463. Review. PubMed PMID: 24383421; PubMed Central PMCID: PMC3962645.
- 211- Zhang Y, Satterlee A, Huang L. In vivo gene delivery by nonviral vectors: overcoming hurdles? *Mol Ther.* 2012 Jul;20(7):1298-304. doi: 10.1038/mt.2012.79. Review. PubMed PMID: 22525514; PubMed Central PMCID: PMC3392980.
- 212-Misra S. Human gene therapy: a brief overview of the genetic revolution. *J Assoc Physicians India.* 2013 Feb;61(2):127-33. Review. PubMed PMID: 24471251.
- 213-Pérez-Luz S, Díaz-Nido J. Prospects for the use of artificial chromosomes and minichromosome-like episomes in gene therapy. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010. pii: 642804. doi: 10.1155/2010/642804. PubMed PMID: 20862363; PubMed Central PMCID: PMC2938438.
- 214-Manjila SB, Baby JN, Bijin EN, Constantine I, Pramod K, Valsalakumari J. Novel gene delivery systems. *Int J Pharm Investig.* 2013 Jan;3(1):1-7. doi: 10.4103/2230-973X.108958. PubMed PMID: 23799200; PubMed Central PMCID: PMC3687232.
- 215-Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, Vegas AJ, Dorkin JR, Anderson DG. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat Rev Genet.* 2014 Aug;15(8):541-55. doi: 10.1038/nrg3763. Review. PubMed PMID: 25022906.
- 216-Pack DW, Hoffman AS, Pun S, Stayton PS. Design and development of polymers for gene delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2005 Jul;4(7):581-93. Review. PubMed PMID: 16052241.
- 217- Lächelt U, Wagner E. Nucleic Acid Therapeutics Using Polyplexes: A Journey of 50 Years (and Beyond). *Chem Rev.* 2015 Oct 14;115(19):11043-78. doi: 10.1021/cr5006793. Review. PubMed PMID: 25872804.
- 218-Nayerossadat N, Maedeh T, Ali PA. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv Biomed Res.* 2012;1:27. doi: 10.4103/2277-9175.98152. Epub 2012 Jul 6. PubMed PMID: 23210086; PubMed Central PMCID: PMC3507026.
- 219-Kurrikoff K, Gustin M, Langel Ü. Recent in vivo advances in cell-penetrating peptide-assisted drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2016;13(3):373-87. doi: 10.1517/17425247.2016.1125879. Review. PubMed PMID: 26634750.
- 220-Lindgren M, Hällbrink M, Prochiantz A, Langel U. Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol Sci.* 2000 Mar;21(3):99-103. Review. PubMed PMID: 10689363.
- 221-Green MR. Pre-mRNA splicing. *Annu Rev Genet.* 1986;20:671-708. Review. PubMed PMID: 2880558.

- 222-Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*. 1988 Dec 23;55(6):1189-93. PubMed PMID: 2849510.
- 223-Joliot A, Pernelle C, Deagostini-Bazin H, Prochiantz A. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Mar 1;88(5):1864-8. PubMed PMID: 1672046; PubMed Central PMCID: PMC51126.
- 224-Elliott G, O'Hare P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell*. 1997 Jan 24;88(2):223-33. PubMed PMID: 9008163.
- 225-Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, Prochiantz A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem*. 1994 Apr 8;269(14):10444-50. PubMed PMID: 8144628.
- 226-Vivès E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem*. 1997 Jun 20;272(25):16010-7. PubMed PMID: 9188504.
- 227-Kauffman WB, Fuselier T, He J, Wimley WC. Mechanism Matters: A Taxonomy of Cell Penetrating Peptides. *Trends Biochem Sci*. 2015 Dec;40(12):749-64. doi: 10.1016/j.tibs.2015.10.004. Review. PubMed PMID: 26545486; PubMed Central PMCID: PMC4727446.
- 228-Yamada T, Das Gupta TK, Beattie CW. p28, an anionic cell-penetrating peptide, increases the activity of wild type and mutated p53 without altering its conformation. *Mol Pharm*. 2013 Sep 3;10(9):3375-83. doi: 10.1021/mp400221r. PubMed PMID: 23952735.
- 229 -Milletti F. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov Today*. 2012 Aug;17(15-16):850-60. doi: 10.1016/j.drudis.2012.03.002. Review. PubMed PMID: 22465171.
- 230-Cerrato CP, Künnapuu K, Langel Ü. Cell-penetrating peptides with intracellular organelle targeting. *Expert Opin Drug Deliv*. 2016 Aug 2;1-11. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27426871.
- 231-Magzoub M, Kilk K, Eriksson LE, Langel U, Gräslund A. Interaction and structure induction of cell-penetrating peptides in the presence of phospholipid vesicles. *Biochim Biophys Acta*. 2001 May 2;1512(1):77-89. PubMed PMID: 11334626.
- 232-Ziegler A. Thermodynamic studies and binding mechanisms of cell-penetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008 Mar 1;60(4-5):580-97. Review. PubMed PMID: 18045730.
- 233-Tünnemann G, Ter-Avetisyan G, Martin RM, Stöckl M, Herrmann A, Cardoso MC. Live-cell analysis of cell penetration ability and toxicity of oligo-arginines. *J Pept Sci*. 2008 Apr;14(4):469-76. PubMed PMID: 18069724.

- 234-Zahid M, Robbins PD. Cell-type specific penetrating peptides: therapeutic promises and challenges. *Molecules*. 2015 Jul 20;20(7):13055-70. doi: 10.3390/molecules200713055. Review. PubMed PMID: 26205050.
- 235-Le Sceller L, Letellier C, Gouesbet G. Structure selection for global vector field reconstruction by using the identification of fixed points. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics*. 1999 Aug;60(2 Pt A):1600-6. PubMed PMID: 11969922.
- 236-Durzyńska J, Goździcka-Józefiak A. Viruses and cells intertwined since the dawn of evolution. *Virology*. 2015 Oct 16;12:169. doi: 10.1186/s12985-015-0400-7. Review. PubMed PMID: 26475454; PubMed Central PMCID: PMC4609113.
- 237-Ziegler A. Thermodynamic studies and binding mechanisms of cell-penetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008 Mar 1;60(4-5):580-97. Review. PubMed PMID: 18045730.
- 238-Madani F, Lindberg S, Langel U, Futaki S, Gräslund A. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J Biophys*. 2011;2011:414729. doi: 10.1155/2011/414729. PubMed PMID: 21687343; PubMed Central PMCID: PMC3103903.
- 239-Soomets U, Lindgren M, Gallet X, Hällbrink M, Elmquist A, Balaspiri L, Zorko M, Pooga M, Brasseur R, Langel U. Deletion analogues of transportan. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Jul 31;1467(1):165-76. PubMed PMID: 10930519.
- 240-Marks JR, Placone J, Hristova K, Wimley WC. Spontaneous membrane-translocating peptides by orthogonal high-throughput screening. *J Am Chem Soc*. 2011 Jun 15;133(23):8995-9004. doi: 10.1021/ja2017416. PubMed PMID: 21545169; PubMed Central PMCID: PMC3118567.
- 241-Guo Z, Peng H, Kang J, Sun D. Cell-penetrating peptides: Possible transduction mechanisms and therapeutic applications. *Biomed Rep*. 2016 May;4(5):528-534. PubMed PMID: 27123243; PubMed Central PMCID: PMC4840506.
- 242-Lu K, Duan QP, Ma L, Zhao DX. Chemical strategies for the synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates. *Bioconjug Chem*. 2010 Feb 17;21(2):187-202. doi: 10.1021/bc900158s. Review. PubMed PMID: 19856957.
- 243-Järver P, Coursindel T, Andaloussi SE, Godfrey C, Wood MJ, Gait MJ. Peptide-mediated Cell and In Vivo Delivery of Antisense Oligonucleotides and siRNA. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2012 Jun 12;1:e27. doi: 10.1038/mtna.2012.18. PubMed PMID: 23344079; PubMed Central PMCID: PMC3390225.
- 244-Bauhuber S, Hozsa C, Breunig M, Göpferich A. Delivery of nucleic acids via disulfide-based carrier systems. *Adv Mater*. 2009 Sep 4;21(32-33):3286-306. doi: 10.1002/adma.200802453. Review. PubMed PMID: 20882498.
- 245-Lelle M, Frick SU, Steinbrink K, Peneva K. Novel cleavable cell-penetrating peptide-drug conjugates: synthesis and characterization. *J Pept Sci*. 2014 May;20(5):323-33. doi: 10.1002/psc.2617. PubMed PMID: 24677287.

- 246-Margus H, Padari K, Pooga M. Cell-penetrating peptides as versatile vehicles for oligonucleotide delivery. *Mol Ther.* 2012 Mar;20(3):525-33. doi: 10.1038/mt.2011.284. Review. PubMed PMID: 22233581; PubMed Central PMCID: PMC3293609.
- 247-Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Itty Ipe B, Bawendi MG, Frangioni JV. Renal clearance of quantum dots. *Nat Biotechnol.* 2007 Oct;25(10):1165-70. PubMed PMID: 17891134; PubMed Central PMCID: PMC2702539.
- 248-Hoshino Y, Koide H, Furuya K, Haberaecker WW 3rd, Lee SH, Kodama T, Kanazawa H, Oku N, Shea KJ. The rational design of a synthetic polymer nanoparticle that neutralizes a toxic peptide in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jan 3;109(1):33-8. doi: 10.1073/pnas.1112828109. PubMed PMID: 22198772; PubMed Central PMCID: PMC3252894.
- 249-Malhotra M, Tomaro-Duchesneau C, Saha S, Kahouli I, Prakash S. Development and characterization of chitosan-PEG-TAT nanoparticles for the intracellular delivery of siRNA. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:2041-52. doi: 10.2147/IJN.S43683. PubMed PMID: 23723699; PubMed Central PMCID: PMC3666663.
- 250-Derossi D, Calvet S, Trembleau A, Brunissen A, Chassaing G, Prochiantz A. Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem.* 1996 Jul 26;271(30):18188-93. PubMed PMID: 8663410.
- 251-Verdurmen WP, Bovee-Geurts PH, Wadhwani P, Ulrich AS, Hällbrink M, van Kuppevelt TH, Brock R. Preferential uptake of L- versus D-amino acid cell-penetrating peptides in a cell type-dependent manner. *Chem Biol.* 2011 Aug 26;18(8):1000-10. doi: 10.1016/j.chembiol.2011.06.006. PubMed PMID: 21867915.
- 252-Richard JP, Melikov K, Vives E, Ramos C, Verbeure B, Gait MJ, Chernomordik LV, Lebleu B. Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem.* 2003 Jan 3;278(1):585-90. PubMed PMID: 12411431.
- 253-Jiao CY, Delaroche D, Burlina F, Alves ID, Chassaing G, Sagan S. Translocation and endocytosis for cell-penetrating peptide internalization. *J Biol Chem.* 2009 Dec 4;284(49):33957-65. doi: 10.1074/jbc.M109.056309. PubMed PMID: 19833724; PubMed Central PMCID: PMC2797166.
- 254-Jones AT. Gateways and tools for drug delivery: endocytic pathways and the cellular dynamics of cell penetrating peptides. *Int J Pharm.* 2008 Apr 16;354(1-2):34-8. Review. PubMed PMID: 18068916.
- 255-Mayor S, Pagano RE. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Aug;8(8):603-12. Review. PubMed PMID: 17609668.
- 256-Gonçalves E, Kitas E, Seelig J. Binding of oligoarginine to membrane lipids and heparan sulfate: structural and thermodynamic characterization of a cell-penetrating peptide. *Biochemistry.* 2005 Feb 22;44(7):2692-702. PubMed PMID: 15709783.
- 257- Hong S, Rattan R, Majoros IJ, Mullen DG, Peters JL, Shi X, Bielinska AU, Blanco L, Orr BG, Baker JR Jr, Holl MM. The role of ganglioside GM1 in cellular internalization

mechanisms of poly(amidoamine) dendrimers. *Bioconjug Chem.* 2009 Aug 19;20(8):1503-13. doi: 10.1021/bc900029k. PubMed PMID: 19583240; PubMed Central PMCID: PMC4641442.

258-Ezzat K, Helmfors H, Tudoran O, Juks C, Lindberg S, Padari K, El-Andaloussi S, Pooga M, Langel U. Scavenger receptor-mediated uptake of cell-penetrating peptide nanocomplexes with oligonucleotides. *FASEB J.* 2012 Mar;26(3):1172-80. doi:10.1096/fj.11-191536. PubMed PMID: 22138034.

259-Sorkin A, Von Zastrow M. Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Aug;3(8):600-14. Review. PubMed PMID: 12154371.

260-Huotari J, Helenius A. Endosome maturation. *EMBO J.* 2011 Aug 31;30(17):3481-500. doi: 10.1038/emboj.2011.286. Review. PubMed PMID: 21878991; PubMed Central PMCID: PMC3181477.

261-Sandvig K, Olsnes S. Diphtheria toxin-induced channels in Vero cells selective for monovalent cations. *J Biol Chem.* 1988 Sep 5;263(25):12352-9. PubMed PMID: 2457582.

262-Bron R, Ortiz A, Wilschut J. Cellular cytoplasmic delivery of a polypeptide toxin by reconstituted influenza virus envelopes (viroosomes). *Biochemistry.* 1994 Aug 9;33(31):9110-7. PubMed PMID: 8049214.

263-White JM. Membrane fusion. *Science.* 1992 Nov 6;258(5084):917-24. Review. PubMed PMID: 1439803.

264-Subramanian A, Ma H, Dahl KN, Zhu J, Diamond SL. Adenovirus or HA-2 fusogenic peptide-assisted lipofection increases cytoplasmic levels of plasmid in nondividing endothelium with little enhancement of transgene expression. *J Gene Med.* 2002 Jan-Feb;4(1):75-83. PubMed PMID: 11828390.

265-Nishiyama N, Kataoka K. Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery. *Pharmacol Ther.* 2006 Dec;112(3):630-48. Review. PubMed PMID: 16815554.

266-Lou PJ, Lai PS, Shieh MJ, MacRobert AJ, Berg K, Bown SG. Reversal of doxorubicin resistance in breast cancer cells by photochemical internalization. *Int J Cancer.* 2006 Dec 1;119(11):2692-8. PubMed PMID: 16991130.

267-Moreira C, Oliveira H, Pires LR, Simões S, Barbosa MA, Pêgo AP. Improving chitosan-mediated gene transfer by the introduction of intracellular buffering moieties into the chitosan backbone. *Acta Biomater.* 2009 Oct;5(8):2995-3006. doi:10.1016/j.actbio.2009.04.021. PubMed PMID: 19427930.

268- Chiu HY, Deng W, Engelke H, Helma J, Leonhardt H, Bein T. Intracellular chromobody delivery by mesoporous silica nanoparticles for antigen targeting and visualization in real time. *Sci Rep.* 2016 May 13;6:25019. doi: 10.1038/srep25019. PubMed PMID: 27173765; PubMed Central PMCID: PMC4865863.

269-Lam JK, Liang W, Lan Y, Chaudhuri P, Chow MY, Witt K, Kudsiova L, Mason AJ.

Effective endogenous gene silencing mediated by pH responsive peptides proceeds via multiple pathways. *J Control Release*. 2012 Mar 10;158(2):293-303. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.11.024. PubMed PMID: 22138072; PubMed Central PMCID: PMC3309421.

270-Cerrato CP, Künnapu K, Langel Ü. Cell-penetrating peptides with intracellular organelle targeting. *Expert Opin Drug Deliv*. 2016 Aug 2;1-11. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27426871.

271-Vives E. Present and future of cell-penetrating peptide mediated delivery systems: "is the Trojan horse too wild to go only to Troy?". *J Control Release*. 2005 Dec 5;109(1-3):77-85. Review. PubMed PMID: 16271792.

272-Kumar P, Wu H, McBride JL, Jung KE, Kim MH, Davidson BL, Lee SK, Shankar P, Manjunath N. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature*. 2007 Jul 5;448(7149):39-43. PubMed PMID: 17572664.

273-Kumar P, Ban HS, Kim SS, Wu H, Pearson T, Greiner DL, Laouar A, Yao J, Haridas V, Habiro K, Yang YG, Jeong JH, Lee KY, Kim YH, Kim SW, Peipp M, Fey GH, Manjunath N, Shultz LD, Lee SK, Shankar P. T cell-specific siRNA delivery suppresses HIV-1 infection in humanized mice. *Cell*. 2008 Aug 22;134(4):577-86. doi: 10.1016/j.cell.2008.06.034. PubMed PMID: 18691745; PubMed Central PMCID: PMC2943428.

274-Gong C, Li X, Xu L, Zhang YH. Target delivery of a gene into the brain using the RVG29-oligoarginine peptide. *Biomaterials*. 2012 Apr;33(12):3456-63. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.12.017. PubMed PMID: 22322199.

275-Won YW, Adhikary PP, Lim KS, Kim HJ, Kim JK, Kim YH. Oligopeptide complex for targeted non-viral gene delivery to adipocytes. *Nat Mater*. 2014 Dec;13(12):1157-64. doi: 10.1038/nmat4092. PubMed PMID: 25282508.

276-Won YW, McGinn AN, Lee M, Bull DA, Kim SW. Targeted gene delivery to ischemic myocardium by homing peptide-guided polymeric carrier. *Mol Pharm*. 2013 Jan 7;10(1):378-85. doi: 10.1021/mp300500y. PubMed PMID: 23214982; PubMed Central PMCID: PMC3542830.

277-Lee YK, Kim KS, Kim JS, Baek JE, Park SI, Jeong HY, Yoon SS, Jung KC, Song HG, Park YS. Leukemia-specific siRNA delivery by immunonanoplexes consisting of anti-JL1 minibody conjugated to oligo-9 Arg-peptides. *Mol Cells*. 2010 May;29(5):457-62. doi: 10.1007/s10059-010-0056-5. PubMed PMID: 20396968.

278-Torchilin VP. Recent approaches to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting. *Annu Rev Biomed Eng*. 2006;8:343-75. Review. PubMed PMID: 16834560.

279-Wang HY, Li C, Yi WJ, Sun YX, Cheng SX, Zhuo RX, Zhang XZ. Targeted delivery in breast cancer cells via iodine: nuclear localization sequence conjugate. *Bioconj Chem*. 2011 Aug 17;22(8):1567-75. doi: 10.1021/bc2001177. PubMed PMID: 21688833.

280-Milletti F. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov Today*. 2012 Aug;17(15-16):850-60. doi: 10.1016/j.drudis.2012.03.002. Review. PubMed PMID: 22465171.

281-Bolhassani A. Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Dec;1816(2):232-46. doi: 10.1016/j.bbcan.2011.07.006. Review. PubMed PMID: 21840374.

282-Herce HD, Garcia AE, Cardoso MC. Fundamental molecular mechanism for the cellular uptake of guanidinium-rich molecules. *J Am Chem Soc*. 2014 Dec 17;136(50):17459-67. doi: 10.1021/ja507790z. PubMed PMID: 25405895; PubMed Central PMCID: PMC4277769.

283-Veiman KL, Mäger I, Ezzat K, Margus H, Lehto T, Langel K, Kurrikoff K, Arukuusk P, Suhorutšenko J, Padari K, Pooga M, Lehto T, Langel Ü. PepFect14 peptide vector for efficient gene delivery in cell cultures. *Mol Pharm*. 2013 Jan 7;10(1):199-210. doi: 10.1021/mp3003557. PubMed PMID: 23186360.

284-Rothbard JB, Jessop TC, Lewis RS, Murray BA, Wender PA. Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells. *J Am Chem Soc*. 2004 Aug 11;126(31):9506-7. PubMed PMID: 15291531.

285-Won YW, Kim HA, Lee M, Kim YH. Reducible poly(oligo-D-arginine) for enhanced gene expression in mouse lung by intratracheal injection. *Mol Ther*. 2010 Apr;18(4):734-42. doi: 10.1038/mt.2009.297. PubMed PMID: 20029398; PubMed Central PMCID: PMC2862522.

286-Ezzat K, Andaloussi SE, Zaghoul EM, Lehto T, Lindberg S, Moreno PM, Viola JR, Magdy T, Abdo R, Guterstam P, Sillard R, Hammond SM, Wood MJ, Arzumanov AA, Gait MJ, Smith CI, Hällbrink M, Langel Ü. PepFect 14, a novel cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery in solution and as solid formulation. *Nucleic Acids Res*. 2011 Jul;39(12):5284-98. doi: 10.1093/nar/gkr072. PubMed PMID: 21345932; PubMed Central PMCID: PMC3130259.

287-Lindberg S, Muñoz-Alarcón A, Helmfors H, Mosqueira D, Gyllborg D, Tudoran O, Langel U. PepFect15, a novel endosomolytic cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery via scavenger receptors. *Int J Pharm*. 2013 Jan 30;441(1-2):242-7. doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.11.037. PubMed PMID: 23200958.

288-Xu Z, Gu W, Huang J, Sui H, Zhou Z, Yang Y, Yan Z, Li Y. In vitro and in vivo evaluation of actively targetable nanoparticles for paclitaxel delivery. *Int J Pharm* 2005; 288: 361-368.

289-Li X, Ding L, Xu Y, Wang Y, Ping Q. Targeted delivery of doxorubicin using stealth liposomes modified with transferrin. *Int J Pharm* 2009; 373: 116-123.

290-Lee JH, Engler JA, Collawn JF, Moore BA. Receptor mediated uptake of peptides that bind the human transferrin receptor. *Eur J Biochem*. 2001 Apr;268(7):2004-12. PubMed PMID: 11277922.



- 291- Sidhu SS. Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Curr Opin Biotech* 2000; 11: 610-616.
- 292- Xia H, Anderson B, Mao Q, Davidson BL. Recombinant human adenovirus: targeting to the human transferrin receptor improves gene transfer to brain microcapillary endothelium. *J Virol*. 2000 Dec;74(23):11359-66. PubMed PMID: 11070036; PubMed Central PMCID: PMC113241.
- 293- Xin Q, Cun Z, Xiaochang X, Meng L, Weina L, Qiang H, Yingqi Z, Zhen Y, Wei Z. Identification of a novel peptide ligand of human transferrin receptor 1 for targeted tumor delivery drug. *Protein Pept Lett*. 2013 Jan;20(1):96-101. PubMed PMID: 22670765.
- 294-Kappas A, Sassa S, Galbraith RA, Nordmann Y: The porphyrias. In: Schriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7th edn. New York: McGraw-Hill, 1995; p 2103–2159
- 295- Staffan Wahlin and Pauline Harper. Liver Transplantation in Acute Hepatic Porphyria and Erythropoietic Protoporphyria, In book: *Handbook of Porphyrin Science*, Chapter: Vol 29, Chapter 151, Publisher: World Scientific Publishing, Editors: Karl M. Kadish, Kevin M. Smith, Rogier Guillard, Gloria C. Ferreira, pp.329-367; DOI: 10.1142/9789814407755\_0033
- 296-Bloomer J, Wang Y, Chen D. Level of expression of the nonmutant Ferrochelatase allele is a determinant of biochemical phenotype in a mouse model of erythropoietic protoporphyria. *Gene Regul Syst Bio*. 2008 May 29;2:233-41. PubMed PMID: 19787086; PubMed Central PMCID: PMC2733089.
- 297-Hammond SM, Wood MJ. Genetic therapies for RNA mis-splicing diseases. *Trends Genet*. 2011 May;27(5):196-205. doi: 10.1016/j.tig.2011.02.004. Review. PubMed PMID: 21497936.
- 298-Velho RV, Sperb-Ludwig F, Schwartz IV. New approaches to the treatment of orphan genetic disorders: Mitigating molecular pathologies using chemicals. *An Acad Bras Cienc*. 2015 Aug;87(2 Suppl):1375-88. doi:10.1590/0001-3765201520140711. Review. PubMed PMID: 26247150.
- 299-Havens MA, Hastings ML. Splice-switching antisense oligonucleotides as therapeutic drugs. *Nucleic Acids Res*. 2016 Aug 19;44(14):6549-63. doi: 10.1093/nar/gkw533. PubMed PMID: 27288447; PubMed Central PMCID: PMC5001604.
- 300-Youn P, Chen Y, Furgeson DY. A myristoylated cell-penetrating peptide bearing a transferrin receptor-targeting sequence for neuro-targeted siRNA delivery. *Mol Pharm*. 2014 Feb 3;11(2):486-95. doi: 10.1021/mp400446v. PubMed PMID: 24387132; PubMed Central PMCID: PMC3993914.
- 301- Daniels TR, Bernabeu E, Rodríguez JA, Patel S, Kozman M, Chiappetta DA, Holler E, Ljubimova JY, Helguera G, Penichet ML. The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Mar;1820(3):291-317. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.07.016. Review. PubMed PMID: 21851850; PubMed Central PMCID: PMC3500658.

302-Oh S, Kim BJ, Singh NP, Lai H, Sasaki T. Synthesis and anti-cancer activity of covalent conjugates of artemisinin and a transferrin-receptor targeting peptide. *Cancer Lett.* 2009 Feb 8;274(1):33-9. doi: 10.1016/j.canlet.2008.08.031. PubMed PMID: 18838215.

303- Bhattacharjee S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J Control Release.* 2016 Aug 10;235:337-51. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017. review. PubMed PMID: 27297779.

304-Tutois S, Montagutelli X, Da Silva V, Jouault H, Rouyer-Fessard P, Leroy-Viard K, Guénet JL, Nordmann Y, Beuzard Y, Deybach JC. Erythropoietic protoporphyria in the house mouse. A recessive inherited ferrochelatase deficiency with anemia, photosensitivity, and liver disease. *J Clin Invest.* 1991 Nov;88(5):1730-6. PubMed PMID: 1939658; PubMed Central PMCID: PMC295715.

305-Magness ST, Brenner DA. Targeted disruption of the mouse ferrochelatase gene producing an exon 10 deletion. *Biochim Biophys Acta.* 1999 Jan 6;1453(1):161-74. PubMed PMID: 9989256.

306-Barman-Aksözen J, Ćwiek P, Bansode VB, Koentgen F, Trüb J, Pelczar P, Cinelli P, Schneider-Yin X, Schümperli D, Minder EI. Modelling the ferrochelatase c.315-48C modifier mutation for erythropoietic protoporphyria (EPP) in mice. *Dis Model Mech.* 2017 Jan 12. pii: dmm.027755. doi: 10.1242/dmm.027755. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28093505.

307-Cosgun KN, Rahmig S, Mende N, Reinke S, Hauber I, Schäfer C, Petzold A, Weisbach H, Heidkamp G, Purbojo A, Cesnjevar R, Platz A, Bornhäuser M, Schmitz M, Dudziak D, Hauber J, Kirberg J, Waskow C. Kit regulates HSC engraftment across the human-mouse species barrier. *Cell Stem Cell.* 2014 Aug 7;15(2):227-38. doi: 10.1016/j.stem.2014.06.001. PubMed PMID: 25017720.

## **Protoporphyririe Erythropoïétique : Thérapie génique non intégrative par oligonucléotide antisens adressé par peptides bifonctionnels RTf1-CPP**

La protoporphyririe érythropoïétique (PPE) est une maladie héréditaire rare caractérisée par un déficit en activité FECH responsable d'une accumulation de PPIX. Elle se manifeste par une photosensibilité très invalidante. Il n'existe pas de traitement efficace pour la PPE. 95% des malades présentent un allèle *FECH* hypomorphe (c.315-48C) en trans d'une mutation *FECH* délétère, ce qui entraîne une diminution de l'activité FECH résiduelle dans les érythroblastes en dessous d'un seuil critique d'environ 35% de l'activité normale. L'allèle hypomorphe (c.315-48C) favorise l'utilisation d'un site cryptique d'épissage situé en -63 de l'intron 3 générant un ARNm *FECH* incluant une partie de l'intron 3 et possédant un codon stop prématuré. L'ARN est alors dégradé par NMD pendant sa maturation. Nous avons déjà identifié un oligonucléotide antisens (ASO-V1) qui redirige l'épissage vers le site accepteur physiologique de l'intron 3 et augmente la production d'ARN *FECH* WT. Nous avons développé par ce travail une nouvelle stratégie d'adressage d'ASO-V1 en utilisant des peptides ciblant le récepteur de la transferrine (RTf1) qui est exprimé à un niveau très élevé dans les progéniteurs érythroïdes en différenciation concomitamment à la FECH. Nous avons développé des peptides bifonctionnels à partir des séquences peptidiques ciblant le RTf1 tout en les couplant à des séquences Cell Penetrating Peptide (CPP) qui facilitent la sortie de l'ASO-V1 de la vésicule endosomale. Après la transfection des lignées lymphoblastoïdes de malades PPE par différents nanocomplexes RTf1-CPP/ASO-V1, nous avons pu montrer que plusieurs des peptides bifonctionnels utilisés permettaient une redirection efficace et prolongée de l'épissage cryptique vers l'épissage physiologique exon3-exon4 et que cela permettait une correction des taux d'ARN *FECH* WT. Nous avons ensuite testé l'effet des nanocomplexes RTf1-CPP/ASO-V1, *ex vivo*, dans les progéniteurs érythroïdes en différenciation de différents sujets atteints de PPE et nous sommes arrivés à augmenter l'ARN *FECH* WT et diminuer significativement l'accumulation de la PPIX dans ces cellules par rapport à celles transfectées par des nanocomplexes RTf1-CPP/ASO-Mock. La prochaine étape de notre étude serait d'apporter la preuve de concept, *in vivo*, dans un modèle murin humanisé de PPE après l'administration de nanocomplexes RTf1-CPP/ASOV1.

Mots-Clés : Thérapie génique, Protoporphyririe Erythropoïétique, Oligonucléotide antisens, Peptide cargo, RTf1, CPP

---

## **Erythropoietic protoporphyria : Non-integrative gene therapy by antisense oligonucleotide addressed by TfR1-CPP bifunctional peptides**

Erythropoietic protoporphyria (EPP) is a rare hereditary disease characterized by a deficiency in FECH activity responsible for the accumulation of PPIX. EPP is manifested by a very disabling photosensitivity. There is no effective treatment for EPP. 95% of the patients present a hypomorphic FECH allele (c.315-48C) in trans of a deleterious FECH mutation, resulting in a decrease in residual FECH activity in erythroblasts below a critical threshold of about 35% of normal activity. The hypomorphic allele (c.315-48C) promotes the use of a cryptic splicing site located at -63 of the intron 3 generating a FECH mRNA including a part of the intron 3 and possessing a premature stop codon. The RNA is then degraded by NMD during its maturation. We have previously identified an antisense oligonucleotide (ASO-V1) that redirects splicing to the physiological acceptor site of intron 3 and increases the production of WT *FECH* mRNA. Here, we developed a new ASO-V1 addressing strategy using transferrin receptor (TRf1) targeted peptides. TfR1 is expressed at a very high level in differentiating erythroid progenitors concomitantly with FECH. We developed bifunctional peptides from peptide sequences targeting TfR1 while coupling them to Cell Penetrating Peptide (CPP) sequences that facilitate the release of ASO-V1 from the endosomal vesicle. We transfected the lymphoblastoid cell lines from EPP patients by different TfR1-CPP/ASO-V1 nanocomplexes and we demonstrated that several of the bifunctional peptides allowed an efficient and prolonged redirection of the cryptic splicing towards the exon3-exon4 physiological splicing and the correction of the WT *FECH* mRNA levels. Then, we tested the effect of TfR1-CPP/ASO-V1 nanocomplexes, *ex vivo*, in differentiating erythroid progenitors of different EPP subjects and we were able to increase WT *FECH* mRNA and decrease significantly the accumulation of the PPIX in these cells compared to those transfected by TfR1-CPP/ASO-Scr nanocomplexes. The next step of our study would be to provide a proof of concept, *in vivo*, in a humanized murine model of EPP after the administration of TfR1-CPP/ASOV-1 nanocomplexes.

Keywords : Gene therapy, Erythropoietic protoporphyria, antisense oligonucleotide, peptide cargo, TfR1, CPP