

ABSTRACTS DES COMMUNICATIONS DE LA JOURNÉE RECHERCHE DU 25 SEPTEMBRE 2020

1. Présentation clinico-biologique d'une cohorte de 20 patients présentant un déficit en TANGO2 – Mise en évidence de nouveaux facteurs déclenchants de crises métaboliques et de l'absence d'anomalie énergétique primitive

Contact : clairemarineberat@gmail.com

Claire-Marine Bérat^{1,2,3#}, Sebastian Montealegre^{1,3#}, Arnaud Wiedemann⁴, Malou Le Corronc Nuzum¹, Amélie Blondel⁵, Hugo Debruge¹, Aline Cano⁶, Brigitte Chabrol⁶, Célia Hoebeke⁶, Michel Polak^{2,7}, Athanasia Stoupa^{2,7}, François Feillet⁴, Stéphanie Torre⁸, Nathalie Boddaert^{2,9}, Henri Bruel¹⁰, Magalie Barth¹¹, Lena Damaj¹², Marie- Thérèse Abi-Wardé¹³, Alexandra Afenjar¹⁴, Jean-François Benoist⁵, Marine Madrange^{1,3}, Laure Caccavelli^{1,3}, Perrine Renard¹, Arnaud Hubas¹⁵, Patrick Nusbaum¹⁵, Stéphanie Gobin¹⁶, Peter van Ender^{1,2}, Chris Ottolenghi⁵, Alice Maltret¹⁷, Pascale de Lonlay^{1,2,3} #Equal contribution

La pathologie liée au déficit de la protéine TANGO2 est une pathologie congénitale grave de découverte récente. Elle associe des symptômes multiples, principalement des crises métaboliques, une encéphalopathie, des troubles du rythme cardiaque et une hypothyroïdie. Le mécanisme d'action de la protéine TANGO2 est jusqu'ici inconnu, bien que plusieurs hypothèses sur son rôle et sa localisation aient été émises dans la littérature.

Nous décrivons ici une cohorte de 20 patients suivis en centre de référence en France et porteurs de mutations dans le gène *TANGO2*. La présentation clinique principalement retrouvée associe un retard de développement plus ou moins sévère (n=17), des crises métaboliques aiguës (n=17) et une hypothyroïdie (n=12), avec une très importante variabilité clinique interindividuelle et intrafamiliale. Les crises métaboliques associent, de façon plus ou moins complète, des accès de rhabdomyolyse sévères (15/17), des symptômes neurologiques (14/17), et des symptômes cardiaques (12/17; QT long [n=10], séquence de Brugada [n=2], arythmie cardiaque [n= 6]), requérant une prise en charge réanimatoire. Nous avons également mis en évidence des facteurs déclenchants de crises métaboliques n'ayant pas été décrits jusqu'ici chez les patients porteurs de déficit en TANGO2, tels que la L-Carnitine et plusieurs anesthésiants.

Contrairement aux données de la littérature, les acylcarnitines plasmatiques, les dosages de FGF-21 plasmatiques, les données histologiques musculaires et les études mitochondriales se sont révélés normaux. Par ailleurs, dans les myoblastes primaires de patients, l'étude de l'oxydation du palmitate et de la glutamine, ainsi que l'exploration du réseau mitochondrial se sont également avérées normales. Enfin, nous avons retrouvé un fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale variable et un défaut de clairance de l'ADN oxydé dans les myoblastes primaires soumis à des conditions de stress (cycles de jeûne et de renutrition).

Nous avons pu conclure que la pathologie liée au déficit en protéine TANGO2 est une pathologie sévère, menaçant potentiellement le pronostic vital. Ces patients nécessitent une prise en charge cardiologique et anesthésique très spécifique. Du point de vue physiopathologique, le déficit en protéine TANGO2 ne semble pas résulter d'un déficit mitochondrial primitif. Il semble cependant qu'un déficit mitochondrial secondaire puisse apparaître en présence de facteur déclenchant chez certains patients.

2. Métabolisme du tryptophane et phénylcétonurie : une étude de cohorte française

Contact : lboulet1@chu-grenoble.fr>

Lysiane Boulet¹, Christelle Corne¹, Gérard Besson², Laetitia Van Noolen¹, Patrice Faure³, François Maillot⁴, groupe d'étude ECOPHEN.

¹ Laboratoire des Maladies Héréditaires du Métabolisme, Service de Biochimie, Biologie Moléculaire, Toxicologie Environnementale. CHU de Grenoble-Alpes site Nord- Institut de Biologie et de Pathologie. Boulevard de la Chantourne, 38700 La Tronche, France

² Service de Neurologie Générale, CHU de Grenoble-Alpes site Nord. Avenue Maquis du Grésivaudan, 38700 La Tronche France

³ Service de Biochimie, Biologie Moléculaire, Toxicologie Environnementale. CHU de Grenoble-Alpes site Nord- Institut de Biologie et de Pathologie. Boulevard de la Chantourne, 38700 La Tronche, France

⁴ CHRU de Tours, Médecine Interne, Université de Tours, INSERM 1253, Tours, France

Introduction

Les voies métaboliques du tryptophane (Trp) et de la phénylalanine (Phe) présentant plusieurs points communs, nous avons émis l'hypothèse que le métabolisme du Trp pouvait être modifié dans la phénylcétonurie (PCU, OMIM 261600). De plus, plusieurs métabolites de cette voie possèdent des activités neuroprotectrices ou neurotoxiques, il semble donc intéressant de les étudier dans les défauts neurologiques de la PCU, en sachant que chez certains patients la symptomatologie observée n'est pas expliquée par leurs taux de Phe sanguins. Ainsi, nous avons analysé les métabolites du Trp dans une importante cohorte française d'adultes phénylcétonuriques (cohorte ECOPHEN), afin d'étudier les modifications de cette voie dans la PCU.

Matériel

et

méthode

Les prélèvements sanguins de 151 patients adultes PCU ont été analysés par une méthode multiplexe de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Les concentrations de Trp, kynurenine (KYN), acide 3-hydroxykynurénique (3HK) et acide kynurénique (AK) ont ensuite été comparées dans la population PCU par rapport à notre population de référence, mais également en fonction du régime diététique suivi par les patients.

Résultats

Les résultats montrent une modification de la voie du Trp dans la population PCU. On observe une diminution des concentrations plasmatiques de KYN et 3HK dans la population PCU par rapport à notre population de référence ($p < 0.0001$), ainsi qu'une augmentation des concentrations plasmatiques d'AK ($p = 0.009$). De plus, les concentrations plasmatiques de 3HK sont diminuées chez les patients PCU suivant un régime pauvre en Phe comparé aux patients ne suivant pas de régime diététique ($p = 0.0016$). Parmi les patients PCU suivant un régime, la prise de substituts d'acides aminés semble engendrer une augmentation des concentrations plasmatiques de 3HK par rapport aux patients ne prenant pas ces substituts ($p = 0.0008$), mais ne permet pas de normaliser l'anomalie biologique observée par rapport à la population générale.

Discussion

Ces résultats montrent que le métabolisme du Trp est modifié chez les adultes PCU. Une exploration complète de ce métabolisme est nécessaire chez les patients phénylcétonuriques. Ceci est d'autant plus important que la thérapie par acides aminés neutres impactera également cette voie métabolique. Il serait potentiellement très utile d'explorer cette voie métabolique dans toutes les maladies innées du métabolisme traitées par régime.

3. Communication orale CRMHM de Marseille

Contact : aline.cano@ap-hm.fr

Introduction

Les maladies héréditaires du métabolisme représentent un groupe hétérogène de maladies rares individuellement mais dont l'incidence globale est estimée à 1/800 à 1/2000 naissances. Les progrès dans les connaissances de ces maladies et dans les modalités de prise en charge ont conduit à une amélioration de la

morbi-mortalité, avec notamment une amélioration de la survie des patients. Cependant les études évaluant la qualité de vie des patients atteints de maladies héréditaires du métabolisme restent rares, ou ciblées sur certaines pathologies, notamment celles pour lesquelles des traitements spécifiques (enzymothérapies notamment) existent. En ce qui concerne les maladies métaboliques nécessitant des régimes restrictifs spécifiques (MHMRS), les études sont peu nombreuses, concernent des petits effectifs et sont souvent ciblées sur une pathologie spécifique. L'objectif de notre travail est de décrire l'état de santé global de la cohorte des patients atteints de MHMRS suivis en France (maladies d'intoxication et du métabolisme énergétique) et de comparer leur qualité de vie à celle de populations de référence.

Matériels et Méthodes :

Dans le cadre d'un PHRC national, une étude transversale a été menée entre 2015 et 2017 chez des patients atteints de MHMRS (excluant la phénylcétonurie), âgés de moins de 18 ans, diagnostiqués à partir du 01/01/2000, et suivis dans des centres de référence ou de compétence. Des données sur l'état de santé des patients étaient récoltées. Des questionnaires spécifiques étaient également remplis par les patients (à partir de 8 ans) et/ou parents (données socio économiques, questionnaires de qualité de vie auto/hétéro-rapportée).

Résultats :

Sur les 633 patients répertoriés, 578 ont été inclus (50,3 % de garçons ; âge moyen : 8,7 ans) ; les paramètres anthropométriques ne différaient pas de ceux de la population générale. Environ la moitié d'entre eux avaient au moins 1 complication (atteinte d'organe) de la maladie. Leur qualité de vie globale auto-rapportée ne différait pas de celle de la population générale. Cependant, les relations avec les amis et les activités de loisirs étaient des domaines affectés de manière négative, tandis que les relations avec le personnel médical, les relations avec les parents, et l'estime de soi étaient positivement affectés. Leur qualité de vie rapportée par leurs parents était par contre inférieure à celle de la population générale.

Discussion :

Les patients de moins de 18 ans atteints de MHMRS présentent un taux élevé de complications cliniques, l'atteinte neurologique étant la plus fréquente. Les paramètres anthropométriques sur la globalité de la population ne diffèrent pas de ceux de la population générale, ceci pouvant témoigner des progrès en terme de prise en charge nutritionnelle. Une grande proportion des patients sont diagnostiqués précocement et après un passage dans une unité de réanimation ou de soins intensifs soulignant la sévérité de ces pathologies et le mode de révélation souvent bruyant. Le recours au système de soin est important dans cette population de patients, tout au long de leur vie.

Les scores globaux de qualité de vie auto-déclarés (8-17 ans) ne diffèrent pas de ceux de la population générale. Par contre il existe des différences entre les 2 sous-groupes de patients : les 8-12 ans ont des scores globaux de qualité de vie inférieurs à ceux de la population générale alors que les patients de 13-17 ans ont des scores supérieurs. Selon les domaines spécifiques de qualité de vie explorés, certains sont affectés négativement ou positivement par rapport la population générale. La qualité de vie hétéro-rapportée par les parents est inférieure à celle de la population générale et à celle auto-rapportée par les patients, ce qui est déjà décrit. Il s'agit de la première étude rapportant des données relativement homogènes sur l'état de santé et la qualité de vie de l'ensemble de la cohorte française des patients atteints de MHMRS. L'étude des déterminants de qualité de vie et l'exploitation des données concernant des sous-groupes de patients/pathologies est prévue.

4. Rôle de la glucosylcéramidase dans le développement du mélanome cutané

Contact : patricia.dubot@inserm.fr; dubot.p@chu-toulouse.fr

Dubot P^{1, 2,3}, Pettazzoni M⁴, Sabourdy F^{1, 2,3}, Levade T^{1, 2,3}, Andrieu-Abadie N¹.

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR1037, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), Université de Toulouse-III Paul Sabatier, Toulouse, France

² Laboratoire de Biochimie Métabolique, Institut Fédératif de Biologie, CHU Purpan, Toulouse, France

³ Centre de référence des maladies héréditaires du métabolisme, Toulouse, France

⁴ Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, UF des Maladies Héréditaires du Métabolisme, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon, Bron, France.

Introduction

Le mélanome cutané (MC) est le cancer le plus sévère des cancers de la peau. Son incidence est en constante augmentation, faisant de ce cancer un problème de santé publique majeur [1]. Une meilleure connaissance du développement du MC améliorerait sa prise en charge. L'analyse de l'exome de patients atteints de MC a révélé des variations non-sens dans le gène *GBA*, codant pour la glucosylcéramidase (GCase). Cette hydrolase lysosomale catalyse la dernière étape du catabolisme des glycosphingolipides transformant le glucosylcéramide (GlcCer) en céramide. Dans le MC, des altérations du métabolisme des sphingolipides ont déjà été montrées par notre équipe et d'autres en faveur d'une diminution de la génération du céramide, considéré comme un anti-oncométabolite [2]. Le déficit en GCase est connu pour être responsable de la maladie de Gaucher (MG), caractérisée par une accumulation de GlcCer ainsi que de sa forme déacylée, la glucosylsphingosine (GlcSph) [3]. Les patients atteints par la MG ont un risque élevé de développer des cancers dont le MC. Parallèlement, les mutations de *GBA*, à l'état homozygote mais aussi hétérozygote, constituent un facteur de risque de développer la maladie de Parkinson (MP), une maladie neurodégénérative dans laquelle des agrégats d'alpha-synucléine sont retrouvés dans les neurones [4]. Le déficit en GCase favoriserait l'agrégation d'alpha-synucléine, qui pourrait jouer un rôle dans la mélanomagenèse [5]. Les mécanismes qui sous-tendent le lien entre la MG et le MC restent toutefois inconnus. Notre projet vise à déterminer le rôle de la GCase (sauvage et mutée) dans le développement du MC. Ce projet s'articule autour de l'impact de la GCase sur l'expression de l'alpha-synucléine et du rôle potentiel de la GlcSph.

Matériels et méthodes

Des lignées cellulaires de mélanome humain ont été utilisées, dans lesquelles l'expression et/ou l'activité de la GCase ont été inhibées par ARN interférence (shARN dirigé contre *GBA*) ou par inhibition pharmacologique (Conduritol B Epoxide, CBE) ou dans lesquelles la surexpression de la GCase a été réalisée par transduction lentivirale. Ces lignées ont également été traitées par addition de GlcSph. Des analyses lipidomiques de ces différentes constructions ont été réalisées.

Résultats

La modification de l'expression ou de l'activité de la GCase n'a pas modifié les propriétés tumorales testées comme la viabilité cellulaire et la sensibilité aux thérapies ciblées (inhibiteurs de kinases). Les premiers résultats en Western Blot n'ont pas révélé de différences significatives quant à l'expression de l'alpha-synucléine dans les cellules de MC dont l'activité GCase était modulée. L'analyse lipidomique a montré l'accumulation de GlcSph dans les cellules traitées par CBE. D'autre part, le traitement des cellules de mélanome par la GlcSph a généré des modifications cellulaires (anomalies de la division cellulaire).

Discussion

Le rôle potentiel de la GlcSph dans le développement tumoral a déjà été mis en évidence dans les hémopathies [6]. De plus, des anomalies de la division cellulaire sous l'effet de lyso-sphingolipides ont déjà été décrites [7], mais leur impact sur le développement tumoral reste encore à déterminer.

Références

- Epidémiologie des cancers cutanés - Détection précoce des cancers de la peau Available online: <https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Depistage-et-detection-precoce/Detection-precoce-des-cancers-de-la-peau/Epidemiologie>.
- Ogretmen, B. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. *Nat. Rev. Cancer* 2018, 18, 33–50.
- Aerts, J.M.F.G.; Kuo, C.-L.; Lelieveld, L.T.; Boer, D.E.C.; van der Lienden, M.J.C.; Overkleeft, H.S.; Artola, M. Glycosphingolipids and lysosomal storage disorders as illustrated by gaucher disease. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2019, 53, 204–215.
- Do, J.; McKinney, C.; Sharma, P.; Sidransky, E. Glucocerebrosidase and its relevance to Parkinson disease. *Mol. Neurodegener.* 2019, 14, 36.

- Israeli, E.; Yakunin, E.; Zerbiv, Y.; Hacoheh-Solovitch, A.; Kisos, H.; Loeb, V.; Lichtenstein, M.; Ben-Gedalya, T.; Sabag, O.; Pikarsky, E.; et al. α -Synuclein Expression Selectively Affects Tumorigenesis in Mice Modeling Parkinson's Disease. *PLoS ONE* 2011, 6, e19622.
- Nair, S.; Branagan, A.R.; Liu, J.; Boddupalli, C.S.; Mistry, P.K.; Dhodapkar, M.V. Clonal Immunoglobulin against Lysolipids in the Origin of Myeloma. *N. Engl. J. Med.* 2016, 374, 555–561.
- Kanazawa, T.; Nakamura, S.; Momoi, M.; Yamaji, T.; Takematsu, H.; Yano, H.; Sabe, H.; Yamamoto, A.; Kawasaki, T.; Kozutsumi, Y. Inhibition of cytokinesis by a lipid metabolite, psychosine. *J. Cell Biol.* **2000**, 149, 943–950.

5. La bikunine : un biomarqueur des linkeropathies et des troubles de l'homéostasie de l'appareil de Golgi

Contact : haouari.walid5@gmail.com

Walid Haouari¹, Johanne Dubail², Samra Ouaras¹, Rizk Bennani³, Charles Roseau¹, François Foulquier⁴, Pierre Prada³, Nathalie Seta³, Christian Poüs¹, Valérie Cormier-Daire² and Arnaud Bruneel^{1,3}.
¹INSERM UMR1193, Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'adaptation au stress et cancérogenèse, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry, France ²INSERM UMR1163, Département de Génétique, Université Paris Descartes- Sorbonne Paris Cité, Institut Imagine, AP-HP, Hôpital Necker Enfants Malades, Paris, France ³AP-HP, Biochimie Métabolique et Cellulaire, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, France ⁴Univ. Lille, CNRS, UMR 8576 – UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Lille, France

Introduction

Les isoformes de la bikunine sont des protéoglycane synthétisés par le foie et sécrétés dans la circulation sanguine à de fortes concentrations. Comme pour tous les protéoglycane, ils sont constitués d'une chaîne glycosaminoglycane fixée sur une protéine par l'intermédiaire d'un tétrasaccharide (GlcA-Gal-Gal-Xyl). Ce dernier est formé grâce à l'action successive de quatre glycosyltransférases : XYLT2, B4GALT7, B3GALT6 et B3GAT3. Il existe des pathologies rares appelées linkeropathies résultant de mutations sur les gènes codant ces enzymes. Dans cette étude, nous montrons que l'analyse de la bikunine sanguine permet de dépister rapidement et facilement les patients atteints de linkeropathies. Elle s'avère également être un biomarqueur potentiel pour le dépistage des désordres congénitaux de la glycosylation (CDG) avec troubles de l'homéostasie de l'appareil de Golgi.

Matériel et méthodes

Les sérums issus de 4 patients atteints de linkeropathies et 17 patients CDG avec troubles de l'homéostasie golgienne ont été analysés par Western blot afin d'observer le profil des isoformes de la bikunine en comparaison avec des patients contrôles. L'électrophorèse bidimensionnelle (2D) a également été utilisée pour mieux caractériser les formes anormales rencontrées dans les linkeropathies.

Résultats

Chez les patients atteints de linkeropathies, le Western blot et la 2D ont permis la mise en évidence d'altérations spécifiques de la bikunine en fonction du gène muté. Chez certains patients CDG, le Western blot montre également des formes anormales pour les isoformes de la bikunine avec des profils caractéristiques pour chaque mutation.

Discussion

L'analyse du profil électrophorétique de la bikunine apparaît être un outil intéressant dans le diagnostic des linkeropathies et des CDG avec troubles de l'homéostasie golgienne. Les résultats obtenus chez les patients permettent la mise en évidence d'anomalies structurales spécifiques en fonction de la mutation. L'analyse des isoformes de la bikunine apporte également de nouvelles données pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques des maladies étudiées.

6. Étude du lien entre métabolisme et tumorigenèse dans un modèle murin de glycogénose de type III

L. Jauze¹⁻², V. Montalvo-Romera², V. Verzieux¹, J. Calderaro³, L. Monteillet¹, G. Mithieux¹, G. Ronzitti² et F. Rajas¹

¹INSERM, U1213, Université Lyon 1, Lyon, France

²INTEGRARE, INSERM, Genethon, Université Paris-Saclay, Evry, France

³INSERM U955, Team 18, Institut Mondor de Recherche Biomédicale, Créteil, France

Introduction

La glycogénose de type III (GSD III) est une maladie génétique rare due à un déficit en enzyme débranchante du glycogène (GDE), causé par des mutations du gène *Agl*. La GDE est impliquée dans la dégradation du glycogène cytosolique dans le foie et les muscles, et son déficit conduit à l'accumulation de glycogène anormal dans ces deux tissus et à une modification du métabolisme hépatique. La pathologie peut se diviser en deux phases cliniques. Durant l'enfance, elle se caractérise surtout par des hypoglycémies lors de jeûnes et une hépatomégalie. Avec l'âge, l'hépatomégalie régresse parallèlement à l'installation d'une fibrose hépatique, tandis qu'une faiblesse musculaire se développe. Le risque de développer des adénomes hépatocellulaires (AHC) ou des carcinomes hépatocellulaires (CHC) est augmenté chez les patients GSD III. Dans cette étude, nous avons analysé les modifications du métabolisme en lien avec la tumorigenèse hépatique dans un modèle murin de GSD III qui reproduit le phénotype clinique (souris *Agl*^{-/-}).

Matériel et méthodes

Le foie et les tumeurs de souris *Agl*^{-/-} et *Agl*^{+/+} (littermates) ont été prélevés à l'âge de 14-20 mois. Une partie du tissu est fixée pour des analyses histologiques et de microscopie électronique à transmission (MET). L'expression de divers gènes a été mesurée par RT-qPCR et des western blots. Enfin, plusieurs paramètres hépatiques et plasmatiques ont été évalués par des dosages biochimiques.

Résultats

Près de 30% des souris *Agl*^{-/-} ont développé des tumeurs caractérisées histologiquement comme des AHC, ou des CHC avec une fibrose associée de stade F2 à F3 et des taux de transaminases élevés. De façon intéressante, l'expression de plusieurs marqueurs tumoraux (glypican 3, alpha-fétoprotéine) est activée chez les souris *Agl*^{-/-}, tandis que l'expression de gènes suppresseurs de tumeur (PTEN) est diminuée. La fibrose hépatique a été mise en évidence par MET et par l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la voie TGFβ, qui est une voie majeure du développement de la fibrose hépatique, en comparaison avec des souris *Agl*^{+/+}.

La MET a également révélé une forte dilatation du réticulum endoplasmique (RE) chez les souris *Agl*^{-/-} par rapport aux souris WT ce qui suggère un important stress du RE. Enfin, la MET a montré une autophagie accrue dans les tumeurs par rapport au reste du foie.

Le déficit en GDE conduit chez les souris *Agl*^{-/-} à une forte accumulation du glycogène hépatique et à une diminution du glucose et du glucose-6-phosphate hépatique. Aucune augmentation des niveaux de triglycérides hépatiques et plasmatique n'a été observée chez les souris GSDIII. L'expression génique des différentes enzymes clés de la glycolyse est inhibée, conduisant à l'absence d'induction de la voie de la lipogenèse *de novo* en raison des faibles niveaux de glucose-6-phosphate hépatique.

Discussions

En conclusion, l'accumulation de glycogène anormal dans le foie due au déficit en GDE modifie le métabolisme hépatique et entraîne des perturbations du fonctionnement cellulaire favorisant *in fine* une fibrose hépatique et le développement tumoral.

7 . Thérapie génique préclinique pour la leucinose

Contact : clement.pontoizeau@aphp.fr

Clément Pontoizeau^{1,2}, Marcelo Simon-Sola², Vincent Nguyen², Clovis Gaborit², Irina Rotaru², Pasqualina Collela³, Murielle Girard⁴, Maria-Grazia Biferi⁵, Jean-Baptiste Arnoux¹, Agnès Rötig², Chris Ottolenghi^{1,2}, Pascale de Lonlay¹, Federico Mingozzi³, Marina Cavazzana^{2,6}, Manuel Schiff^{1,2}

¹Centre de référence des maladies héréditaires du métabolisme, Hôpital Necker Enfants malades, Université Paris Descartes, Paris ; ²Institut Imagine, Inserm U1163, Université Paris Descartes, Paris ; ³Généthon INTEGRARE UMR-S951, Université d'Evry, Evry ; ⁴Service d'hépatologie pédiatrique, Hôpital Necker Enfants malades, Université Paris Descartes, Paris; ⁵Institut de myologie, Sorbonne Université, Paris; ⁶Département de biothérapie, Hôpital Necker Enfants malades, Université Paris Descartes, Paris

Les maladies métaboliques sont souvent des maladies sévères mais traitables. Cependant, leur prise en charge est encore de nos jours associée à une qualité de vie parfois très insatisfaisante pour le patient et à une prévention incomplète des décompensations aiguës sévères et des complications à long terme. La thérapie génique trouve ainsi son intérêt. La leucinose, causée par l'accumulation de leucine et de ces dérivés en est un exemple typique. Notre objectif est de développer une approche de thérapie génique préclinique pour cette maladie dans la souris.

Nous avons caractérisé deux nouveaux modèles murins pour la leucinose. Nous avons démontré l'efficacité d'une approche de thérapie génique au niveau phénotypique, avec une extension de la durée de vie des souris traitées à plus d'un an, contre 12 jours pour les souris non traitées. Au niveau biochimique, le traitement corrige de manière drastique l'accumulation de leucine observée chez les individus non traités.

Cette étude est la première preuve de concept de l'efficacité d'une thérapie génique pour traiter la leucinose *in vivo*.

8. In vivo and in vitro treatment in Lipin-1 deficiency

Contact : perrine.renard@inserm.fr

Unité INSERM U1151, Equipe 9, groupe Pr. Pascale de Lonlay

Le déficit en Lipin-1 est une maladie héréditaire rare du métabolisme à l'origine d'accès de rhabdomyolyses, déclenchés par une fièvre ou un jeûne, mettant en jeu le pronostic vital des patients. Actuellement, la prise en charge de ces derniers est non spécifique par un traitement symptomatique d'urgence en service de réanimation. L'étude de la physiopathologie des myoblastes primaires de patients nous a permis précédemment d'établir un lien entre le déficit en Lipin-1 et la survenue de rhabdomyolyses. Les conséquences se caractérisent par un blocage du flux autophagique et mitophagique, conduisant à l'accumulation d'ADN mitochondrial (ADNmt) oxydé, ligand naturel de Toll Like receptor 9 (TLR9). En cultivant ces cellules dans un milieu pauvre en nutriments et en présence de l'agoniste de TLR9, nous avons montré une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène, d'ADNmt et de cytokines pro-inflammatoires, ainsi qu'une libération de calcium entraînant la mort cellulaire, deux caractéristiques principales d'une rhabdomyolyse inflammatoire. Au contraire, le blocage de TLR9 avec un antagoniste inhibe la libération de calcium et la mort cellulaire, suggérant de nouvelles perspectives thérapeutiques pour le déficit en Lipin-1.

Devant l'urgence thérapeutique, l'efficacité *in vitro* sur les myoblastes primaires de la chloroquine, un anti-TLR9, et en l'absence de modèle animal mimant la RM, l'hydroxychloroquine sulfate (HS) a été instaurée chez ces derniers hors AMM. Les objectifs consistent à évaluer la tolérance et l'efficacité clinico-biologique après

l'initiation du traitement. En parallèle, il s'agit d'étudier les effets de l'HS et les mécanismes d'action sous-jacents au niveau des myoblastes des patients afin d'optimiser la dose thérapeutique.

La tolérance a été évaluée par un suivi cardiaque (électrocardiogramme), de la douleur musculaire (échelle visuelle analogique) et de la qualité de vie (questionnaire PedsQL). L'efficacité a été étudiée par le nombre de rhabdomyolyses avant et sous traitement (taux plasmatiques de CPK) et par la capacité physique globale (épreuve d'effort, tests de marche). Des dosages plasmatiques ont également été effectués pour l'ADNmt (RT-qPCR) et des cytokines inflammatoires (cytométrie en flux). Parallèlement, des dosages plasmatiques d'HS ont été réalisés par les départements de toxicologie des hôpitaux de Cochin et de la Pitié Salpêtrière. In vitro, les effets biologiques de l'HS ont été mesurés sur des myoblastes primaires : quantité d'ADN oxydé (immunofluorescence sur lame) et flux autophagique (Western Blot).

Les patients traités par l'HS ont amélioré leurs capacités physiques et normalisé les cytokines inflammatoires et l'ADNmt plasmatiques. Cependant, certains d'entre eux ont eu des accès de rhabdomyolyse sous traitement. Nous avons montré que ces patients avaient une concentration plasmatique élevée d'HS. Cet effet dose-dépendant est cohérent avec les résultats observés dans les myoblastes. En effet, une faible concentration d'HS permet de réduire les taux d'ADN oxydé, et donc l'activation de TLR9, sans majorer le blocage de l'autophagie. Ce dernier effet délétère est observé à de fortes concentrations d'HS évoquant le surdosage plasmatique chez les patients.

Ces premiers résultats soulignent la prudence d'utilisation du médicament et la nécessité de définir les mécanismes d'action de l'HS dans les myoblastes car ils restent encore peu élucidés dans le muscle.

9. Apport des analyses structure/fonction dans l'identification des bases moléculaires de l'hémochromatose de type 4 et la compréhension du mécanisme d'export du fer chez l'homme.

Contact : uguenkevin@gmail.com

Kévin Uguen (1,2), Ahmad Elbahnsi (3), Marlène Le Tertre (1,2), Isabelle Gourlaouen (1,2), Claude Férec (1), Cécile Ged (4), Chandran Ka (1,2), Isabelle Callebaut (3), Gérard Le Gac (1,2)
1. UMR1078, Inserm, Univ Brest, EFS ; Service de génétique médicale et biologie de la reproduction, CHRU de Brest
2. Laboratoire d'Excellence GR-Ex, Paris
3. IMPMC, UMR7590 CNRS, Sorbonne Université, Paris
4. Inserm U1035, Biothérapie des Maladies Génétiques, Inflammatoires et Cancers, Université de Bordeaux ; Service de Biochimie-Analyses génétiques, CHU de Bordeaux

Introduction

L'hémochromatose de type 4 (HC4) est une maladie innée du métabolisme du fer, transmise sur le mode autosomique dominant. Elle est causée par des mutations du gène *SLC40A1* codant la ferroportine 1 (FPN1), seul exportateur de fer connu chez les mammifères. FPN1 appartient à la famille des transporteurs actifs secondaires MFS (« Major Facilitator Superfamily »), partageant une structure tridimensionnelle en 12 hélices transmembranaires organisées en deux lobes (N-ter et C-ter). L'alternance entre une conformation « Inward » (orientée vers le cytoplasme) et « Outward » (orientée vers l'extérieur) permet le passage de différents substrats à travers la membrane plasmique. FPN1 se différencie des autres transporteurs MFS par l'existence d'un mécanisme de régulation post-traductionnel par l'hepcidine, hormone hyposidérémiant, dont le site de fixation se situerait au niveau du lobe C-ter du transporteur. La biologie complexe de la protéine, associée à l'existence de deux types de mutations (perte et gain-de-fonction) responsables de deux phénotypes distincts rendent difficile l'interprétation des variants rares du gène *SLC40A1*.

Au cours des 7 dernières années nos équipes ont développé différentes approches structure/fonction dans le but démontrer la causalité de variants faux-sens rares et d'apporter des connaissances nouvelles sur les bases moléculaires du mécanisme d'export du fer. Nous rapportons ici un nouveau mécanisme physiopathologique.

Matériel et méthodes

Des analyses d'expression en membrane, d'export du fer et de régulation par l'hepcidine ont été réalisées à partir de cellules HEK293T exprimant de façon stable ou transitoire FPN1 de type sauvage ou mutée. La structure tridimensionnelle de la protéine humaine FPN1 a été modélisée à partir des structures expérimentales obtenues chez un homologue bactérien (BbFpn). Des expériences de dynamique moléculaire ont été conduites en conformation Outward.

Résultats

Nous avons observé la variation p.Ser47Phe chez 10 patients appartenant à 4 familles. Les phénotypes étaient évocateurs d'une surcharge en fer tissulaire, avec un coefficient de saturation de la transferrine (fer plasmatique) généralement normal. Les explorations fonctionnelles ont mis en évidence un défaut d'export du fer, malgré une expression membranaire normale. Elles ont également révélé une résistance partielle à l'hepcidine. L'hypothèse d'un rôle ambivalent du résidu Ser47 a été confortée par les analyses structurales, mettant en évidence le rôle de différentes hélices transmembranaires du lobe N-ter dans l'export du fer et dans la régulation négative par l'hepcidine.

Discussion

Les données cliniques et fonctionnelles associées au variant p.Ser47Phe permettent d'évoquer l'existence d'un nouveau mécanisme physiopathologique associant perte et gain de fonction. L'observation d'une surcharge tissulaire en fer sans surcharge plasmatique s'expliquerait par un effet plus important et permanent du variant sur la fonction d'export du fer. Ces résultats s'ajoutent à des études récentes où nous avons mis en évidence l'importance d'un réseau cytoplasmique de liaisons non-covalentes permettant de stabiliser FPN1 dans la conformation « Outward » (Haematologica 2018, Faseb Journal, 2019). Des comparaisons peuvent être faites avec d'autres protéines MFS, notamment le transporteur GLUT1 qui a une fonction essentielle dans l'apport de glucose au niveau cérébral et qui est également associé à une maladie héréditaire du métabolisme (J Membr Biol, 2020).

10. DEPISTAGE D'UNE NOUVELLE PATHOLOGIE DU METABOLISME DU GLUTATHION PAR MUTATION DU GENE NIT1 CHEZ UNE POPULATION DE PATIENTS ATTEINTS DE TROUBLE PSYCHOTIQUE.

Contact : GWilllaume@chu-grenoble.fr

Introduction

Les maladies génétiques de l'adulte provoquant des lésions cérébrales s'expriment le plus souvent sous la forme d'une leuco-encéphalopathie démyélinisante. Récemment au CHU de Grenoble, un patient atteint de troubles psychotiques a bénéficié d'une IRM cérébrale mettant en évidence des lésions cavitaires atypiques des noyaux gris centraux, et d'un test urinaire aux sulfites positif. L'enquête familiale a révélé un tableau clinique similaire chez d'autres membres de la fratrie, et l'exploration génétique familiale a confirmé une nouvelle pathologie héréditaire associée au métabolisme du glutathion.

Face à un patient atteint de troubles psychotiques il est indispensable de ne pas méconnaître une pathologie organique sous-jacente possiblement curable, afin de proposer un suivi et éventuellement un traitement adapté. La découverte de cette nouvelle pathologie fait se poser la question de sa prévalence au sein des patients psychotiques sans étiologie organique connue aux troubles, afin de discuter dans un deuxième temps l'intérêt de développer un traitement ciblé sur cette voie métabolique. L'étude PsyNIT vise donc à partir du test urinaire aux sulfites à dépister cette nouvelle pathologie chez une population de patients psychotiques sans étiologie organique connue aux troubles.

Matériel et méthode

L'étude de prévalence PsyNIT se déroulera de façon prospective dans 6 centres en France. Les patients seront éligibles s'ils sont âgés de plus de 18 ans et présentent des troubles psychotiques sans étiologie organique connue. Les patients inclus devront fournir un consentement éclairé écrit.

Ils bénéficieront d'un test urinaire aux sulfites (Sulfitest®) réalisé sur urines fraîchement émises analysées sur place. En cas de positivité du test, un prélèvement sanguin sera réalisé et envoyé au CHU de Grenoble pour analyse génétique. Une deuxième consultation sera réalisée 9 mois plus tard pour remettre les résultats du test et organiser le cas échéant un dépistage familial.

L'objectif principal de l'étude est de déterminer la prévalence de cette nouvelle pathologie du métabolisme du glutathion au sein des patients testés. L'objectif secondaire est de rechercher des points d'appels chez les patients atteints de troubles psychotiques en comparant les caractéristiques cliniques et paracliniques des patients atteints et des patients sains.

Discussion

L'intérêt de cette étude est de rechercher au sein des patients psychotiques la prévalence de cette nouvelle pathologie afin d'en préciser l'impact en terme de santé publique. Le recours au test urinaire aux sulfites se justifie par le fait qu'il était positif chez tous les patients connus atteints de cette nouvelle maladie. De plus il s'agit d'un examen peu onéreux, non invasif, rapide et qui comporte peu de faux positifs (en dehors des rares cas de déficit en sulfite oxydase et cofacteur à molybdène).

L'imagerie cérébrale a montré chez tous les patients atteints une encéphalopathie cavitaire très inhabituelle des noyaux gris centraux. La confirmation d'autres patients atteints de cette maladie pourrait être intéressante afin d'en préciser la sémiologie et les points d'appels radiologiques. Enfin en cas de confirmation d'autres patients atteints de cette maladie, nous pourrions discuter l'intérêt d'étudier un traitement actif sur la voie du glutathion, de type N-acétyl-cystéine.