

Université de Liège



GIGA-Research

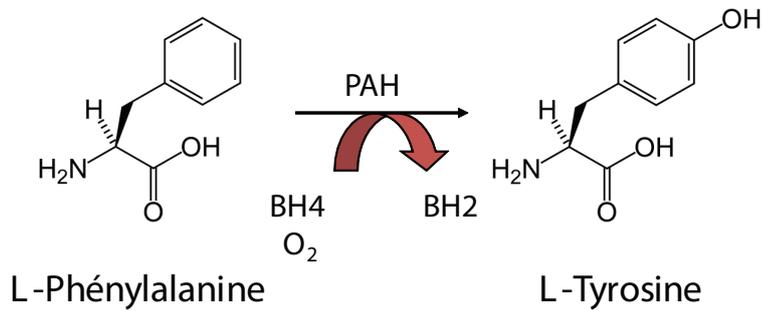
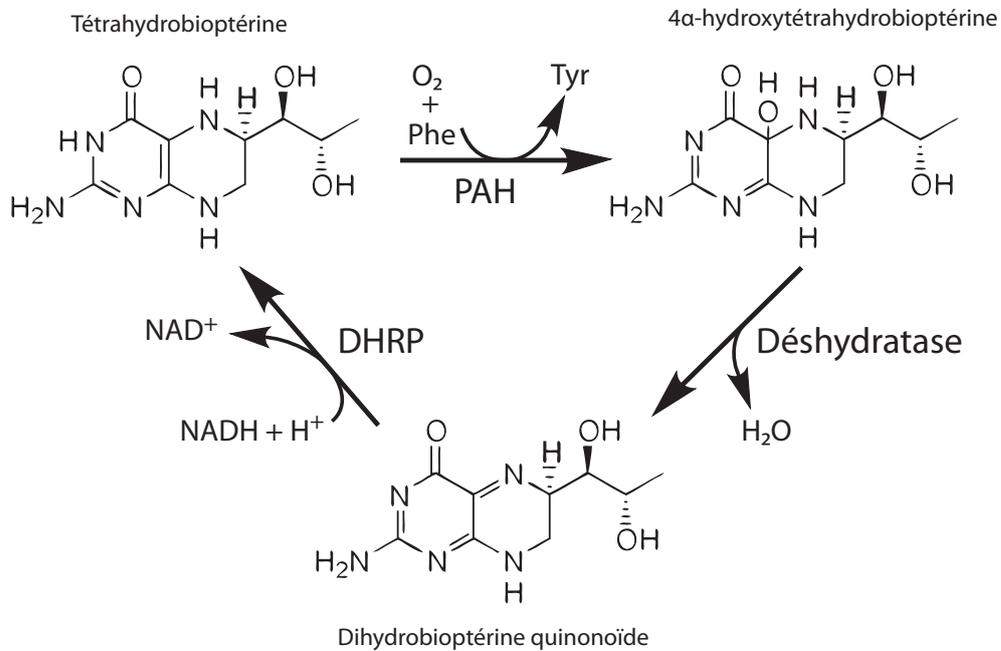
Faculté de Médecine  
Département des  
Sciences Biomédicales

La phénylcétonurie : étude de la myélinisation  
du système nerveux central et contribution à la  
thérapie génique

Génétique Humaine  
Professeur V. Bours

Mémoire de  
Thèse soumis par  
Schoemans Renaud  
En vue de l'obtention du grade de  
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

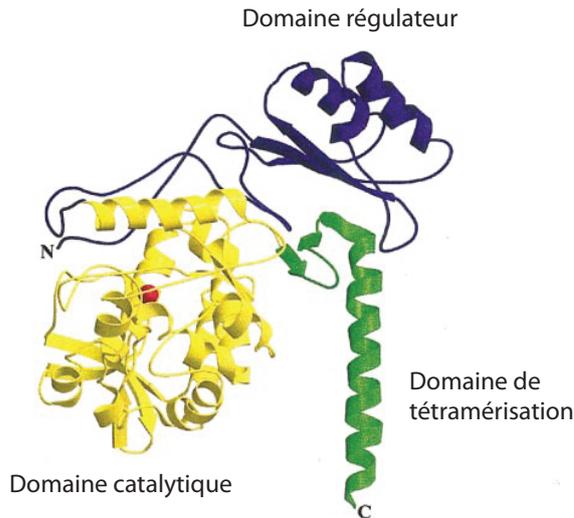
Année académique  
2009 - 2010

**A****B**

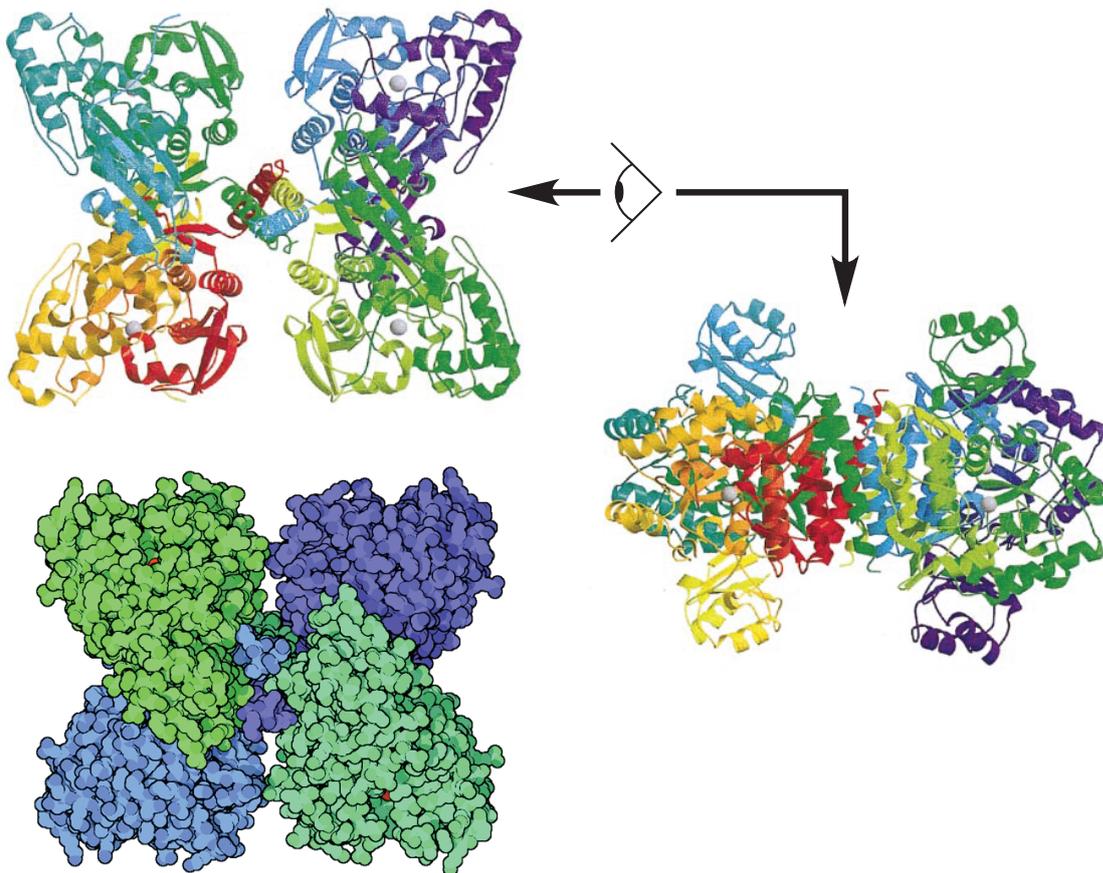
**Figure 1 :** **A.** Réaction catalysée par l'enzyme phénylalanine hydroxylase. **B.** Cycle de recyclage de la tétrahydrobioptérine, dans le cadre de sa dégradation par la PAH. Adpaté de Scriver et Kaufman, 2008.

PAH : phénylalanine hydroxylase, BH4 : tétrahydrobioptérine ; BH2: dihydrobioptérine quinonoïde ; Déshydratase : 4α-carbinolamine déshydratase, DHRP : Dihydroptéridine réductase, NAD(H) : Nicotinamide adénine dinucléotide.

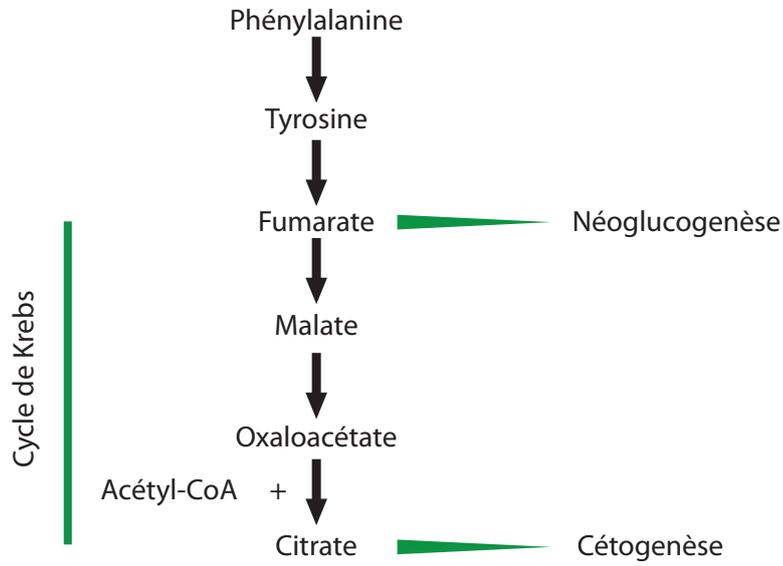
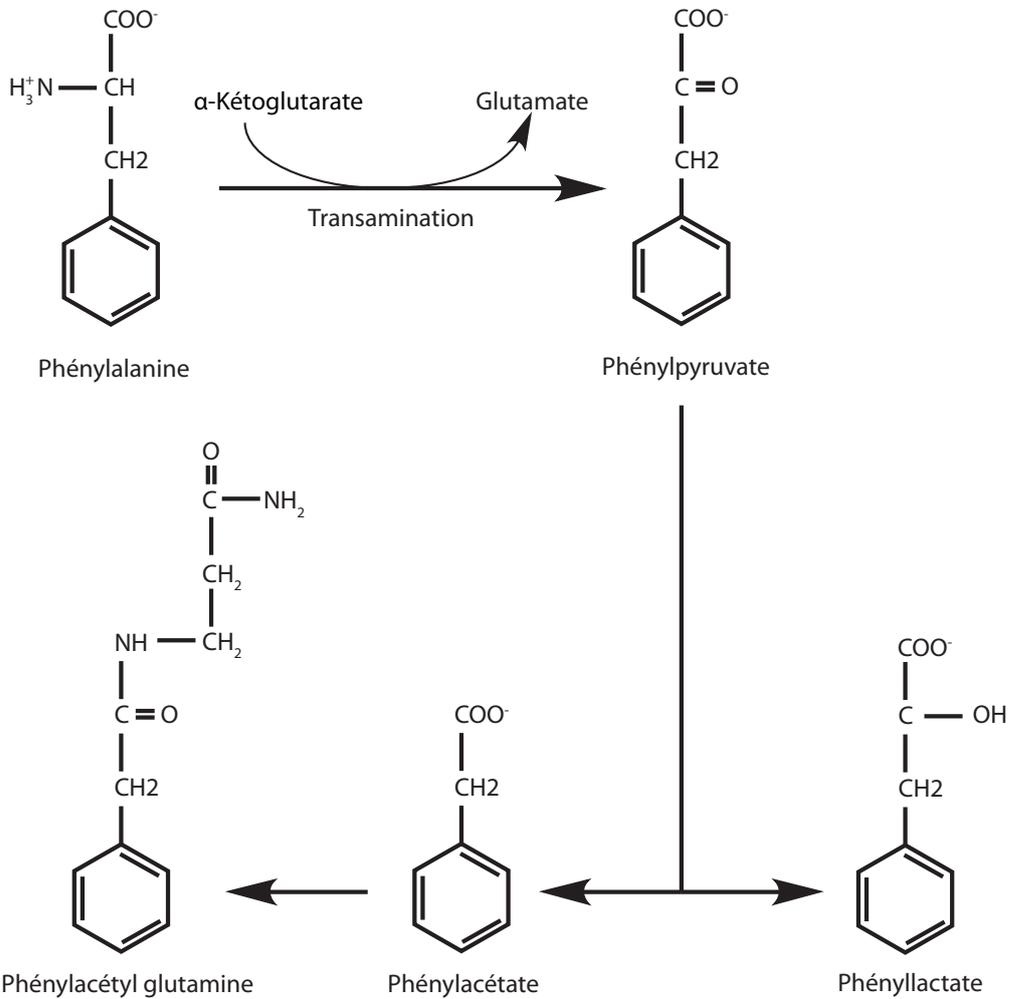
## Monomère PAH



## Tétramère PAH



**Figure 2 :** Structure de la phénylalanine hydroxylase humaine. Monomère PAH : Le domaine régulateur est coloré en mauve, le domaine catalytique en jaune et le domaine de tétramérisation en vert. L'atome de fer est représenté par une sphère rouge. Tétramère PAH : Deux vues perpendiculaires de la structure assemblée de l'enzyme PAH sous forme tétramérique. L'ion ferreux est représenté par une sphère grise ou rouge. D'après Stevens & Erlandsen (1999), Dutta & Goodsell (liens).

**A****B**

**Figure 3 :** **A.** Cascade de conversion aboutissant à l'utilisation de la Phénylalanine dans les processus de néoglucogénèse et cétogénèse. **B.** Etapes de la transamination de la phénylalanine.

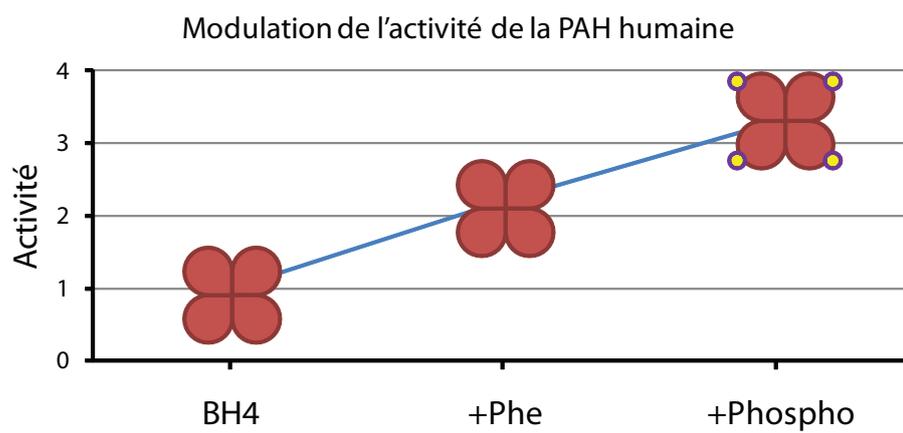
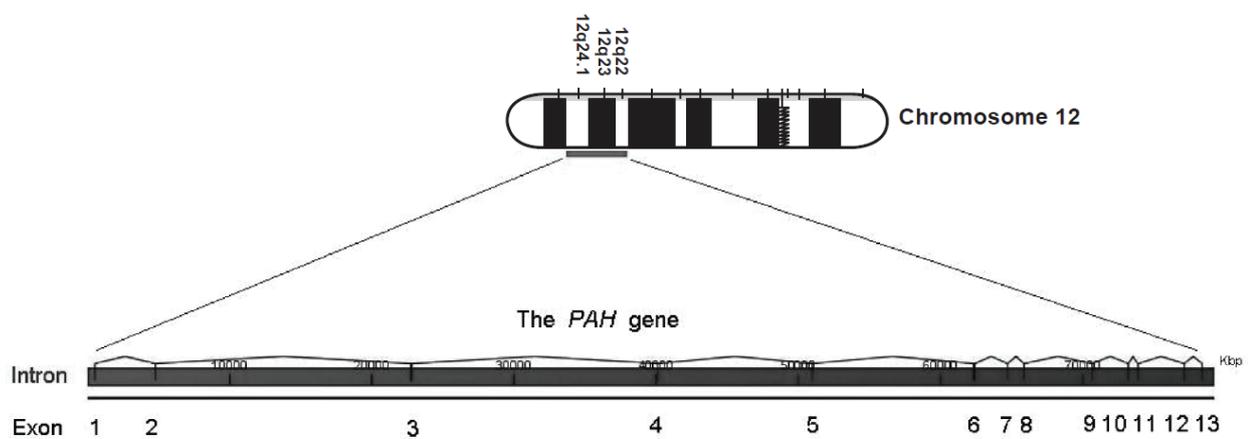


Figure 4 :

Activité de l'enzyme PAH selon trois situations possibles :

- Présence du cofacteur BH4 seul : activité faible, résistance à la phosphorylation.
- Au BH4 vient s'ajouter la Phe : augmentation de son activité d'un facteur 2,2 par levée de l'inhibition liée au BH4.
- Phosphorylation de la PAH : l'activité de l'enzyme augmente 1,5 fois.



**Figure 5 :** Représentation schématique du locus PAH positionné sur le chromosome 12. Le gène codant la PAH contient 13 exons répartis sur une distance approximative de 100 Kb. D'après Williams et al. 2008.

**Aliments interdits :**

Produits laitiers	Lait de vache, de chèvre, de brebis. Yaourt, fromage et préparations comme le flan, la crème glace,...
Viande, œuf, poisson	Aucune exception.
Céréales	Blé ou froment, sarrasin, orge, avoine, riz, maïs, millet, seigle, sorgho. Et leurs dérivés réalisés à base de leur farine (pain, pâtisseries, pâtes).
Certains fruits et légumes	Haricots, lentilles, pois, truffes, figues, arachides, amandes, noix, noisettes, noix de coco, pistaches,...
Divers	Toute denrée contenant de l'aspartame (produits allégés) ou de la gélatine. Cacao, chocolat, marsepain, nougat, beurre d'arachide.

**Aliments autorisés en quantité contrôlée :**

Fruits et légumes	Variétés autres que celles interdites et autorisées à volonté.
-------------------	--

**Aliments autorisés à volonté :**

Céréales	Fécule de maïs, poudre de pudding, fécule de pomme de terre, tapioca. Certains dérivés pauvres en protéines.
Divers	Beurre, huile, levure chimique, sucre, vinaigre, épices, herbes, confiture, compote, sirop de fruit, pommes, limonade ordinaire, bonbons sans gélatine, café, thé, infusion.

Figure 6 : Exemple de ligne de conduite régissant la diète alimentaire pour le traitement de la PCU.

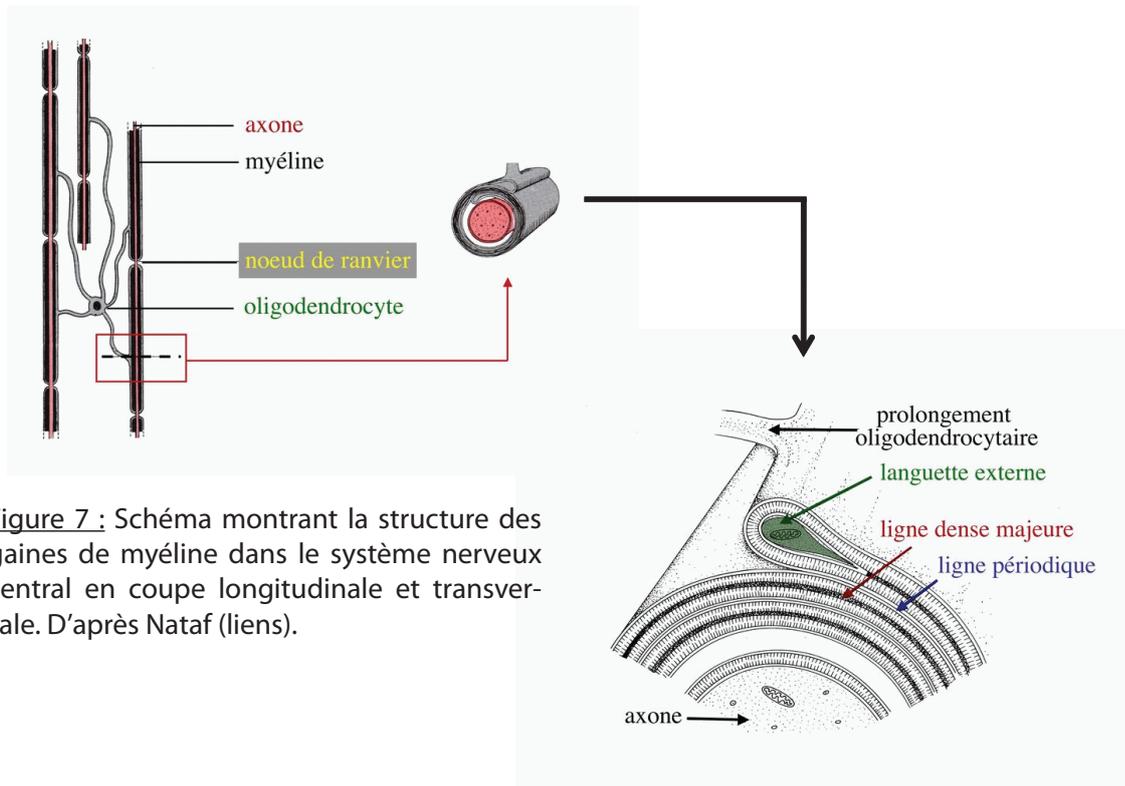


Figure 7 : Schéma montrant la structure des gaines de myéline dans le système nerveux central en coupe longitudinale et transversale. D'après Nataf (liens).

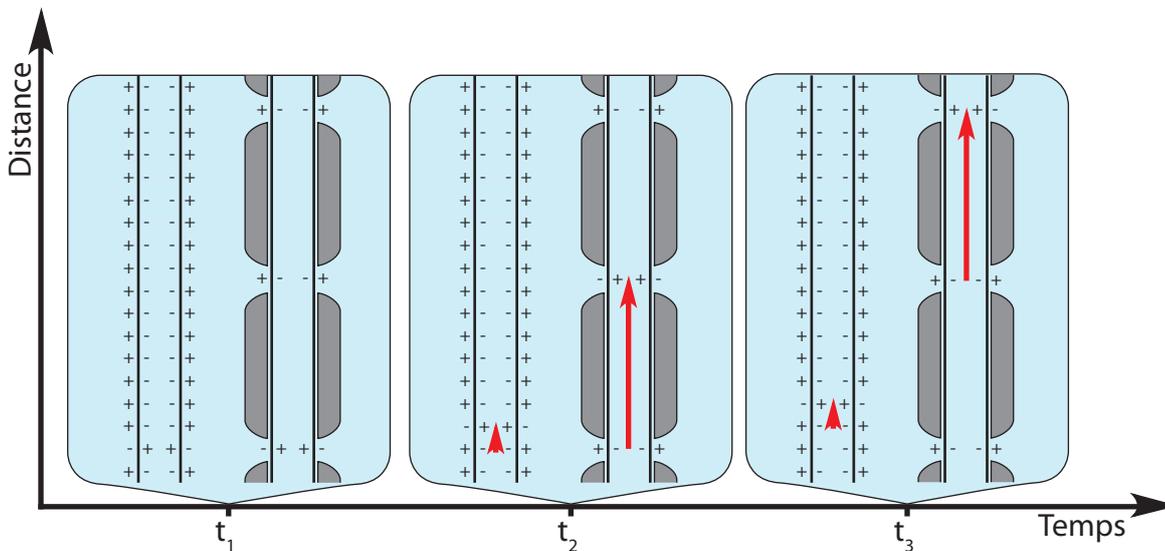


Figure 8 : La conduction saltatoire : pour chaque instant  $t$ , deux axones sont schématisés en coupe longitudinale. Celui de gauche est nu, celui de droite est entouré de gaines de myéline. La polarisation membranaire axonale est représentée par des signes + et -. La distance parcourue par signal nerveux depuis l'instant  $t$  précédent est symbolisée par une flèche rouge. Au cours du temps, l'influx nerveux parcourt beaucoup plus vite l'axone muni d'une gaine de myéline que l'axone à nu. La dépolarisation membranaire saute d'un noeud de Ranvier à l'autre au lieu de parcourir de manière continue l'axone ce qui accélère d'un facteur 20 la transmission du signal.



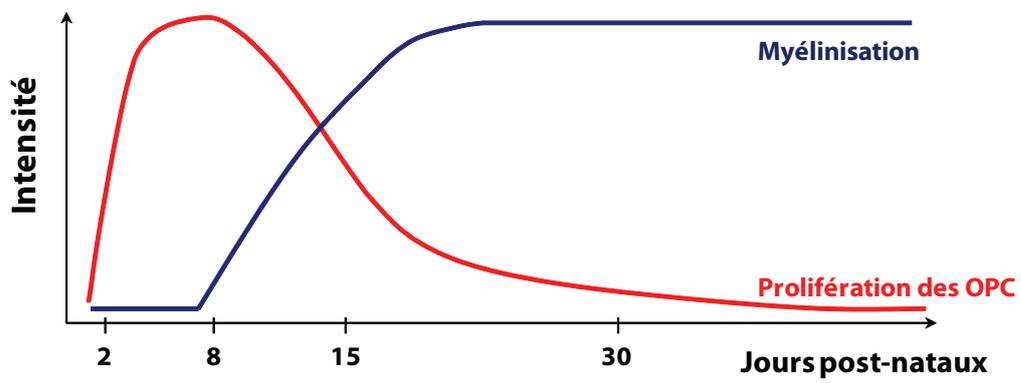


Figure 10 : Graphique schématisant l'intensité des processus de prolifération des progéniteurs oligodendrocytaires (OPC) et de myélinisation chez la souris.

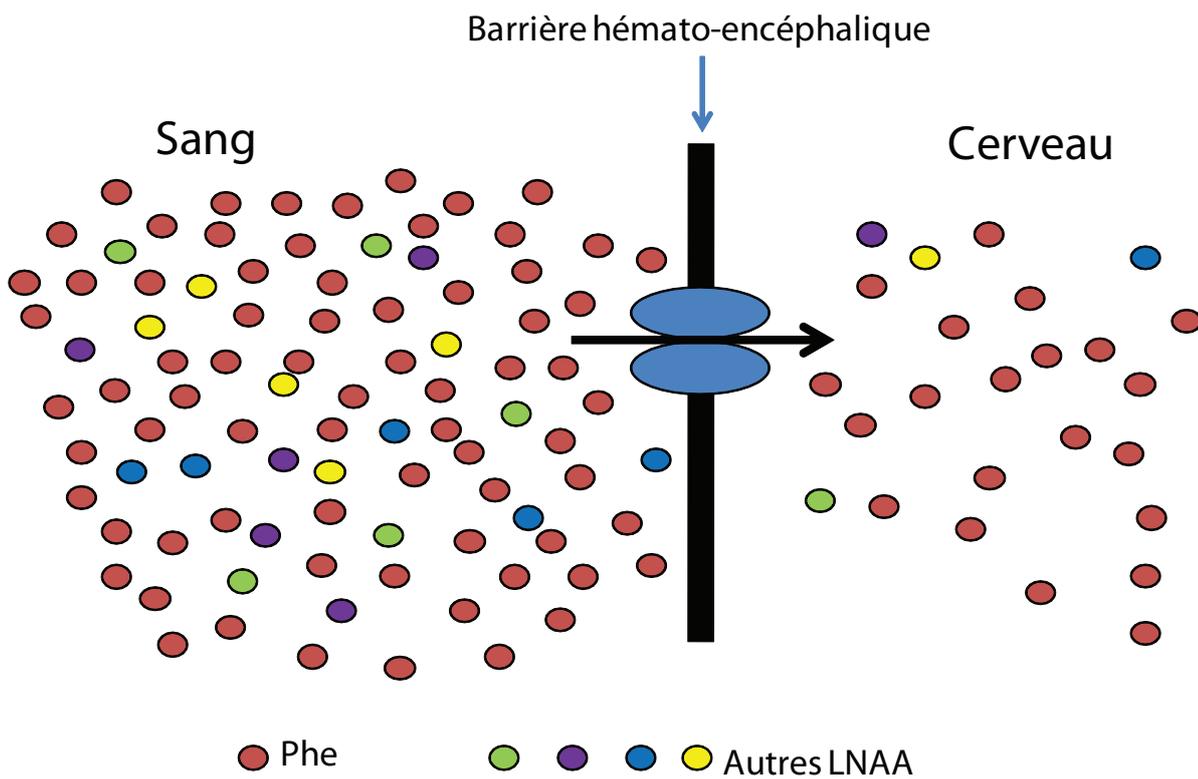


Figure 11 : Compétition des grands acides aminés neutres (LNAA) au transporteur LAT1 situé à l'interface sang/cerveau. En cas de phénylcétonurie non équilibrée, l'acide aminé Phe est largement surnuméraire par rapport aux autres LNAA. Le transporteur LAT1 a une affinité particulièrement élevée pour la Phe. Ces deux paramètres entraînent un passage préférentiel de la Phe vers le parenchyme cérébral, et une diminution de l'import des autres LNAA.

## Blood Brain Barrier (BBB)

LNAA  
(competes for high Phe in the blood from passing the BBB via LAT1 transporter)

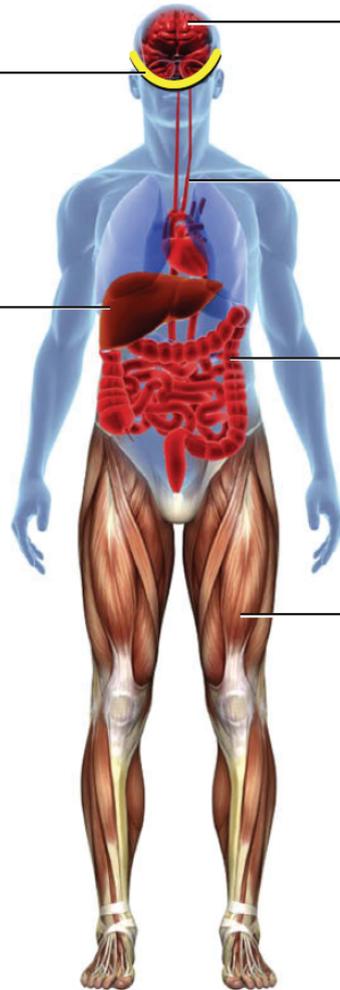
## Liver

Gene Therapy  
(wild type PAH gene)

Cell Transplantation  
(introduces wild type PAH)

Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>)  
(increases PAH activity in some patients)

Chaperone Therapy  
(helps misfolded mutant PAH fold into active PAH)



## Brain

(all therapies result in reduced Phe entering the Brain)

## Blood: Circulation

Enzyme Replacement Therapy  
(injectable formulation of PAL)

## Digestive Tract

Enzyme Replacement Therapy  
(orally active formulation of PAL)

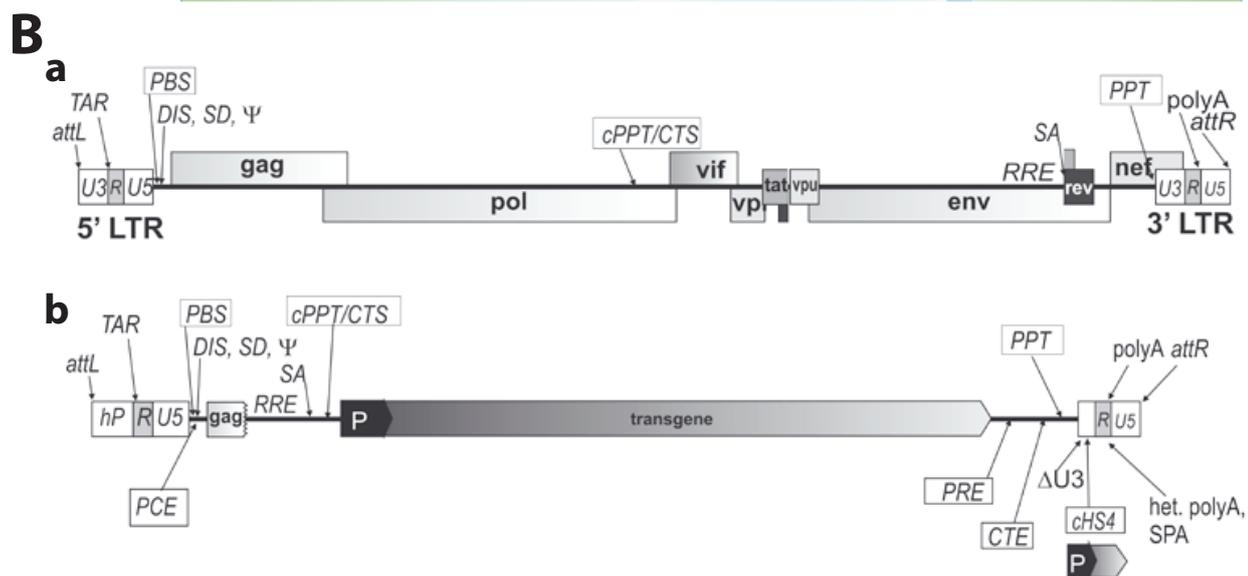
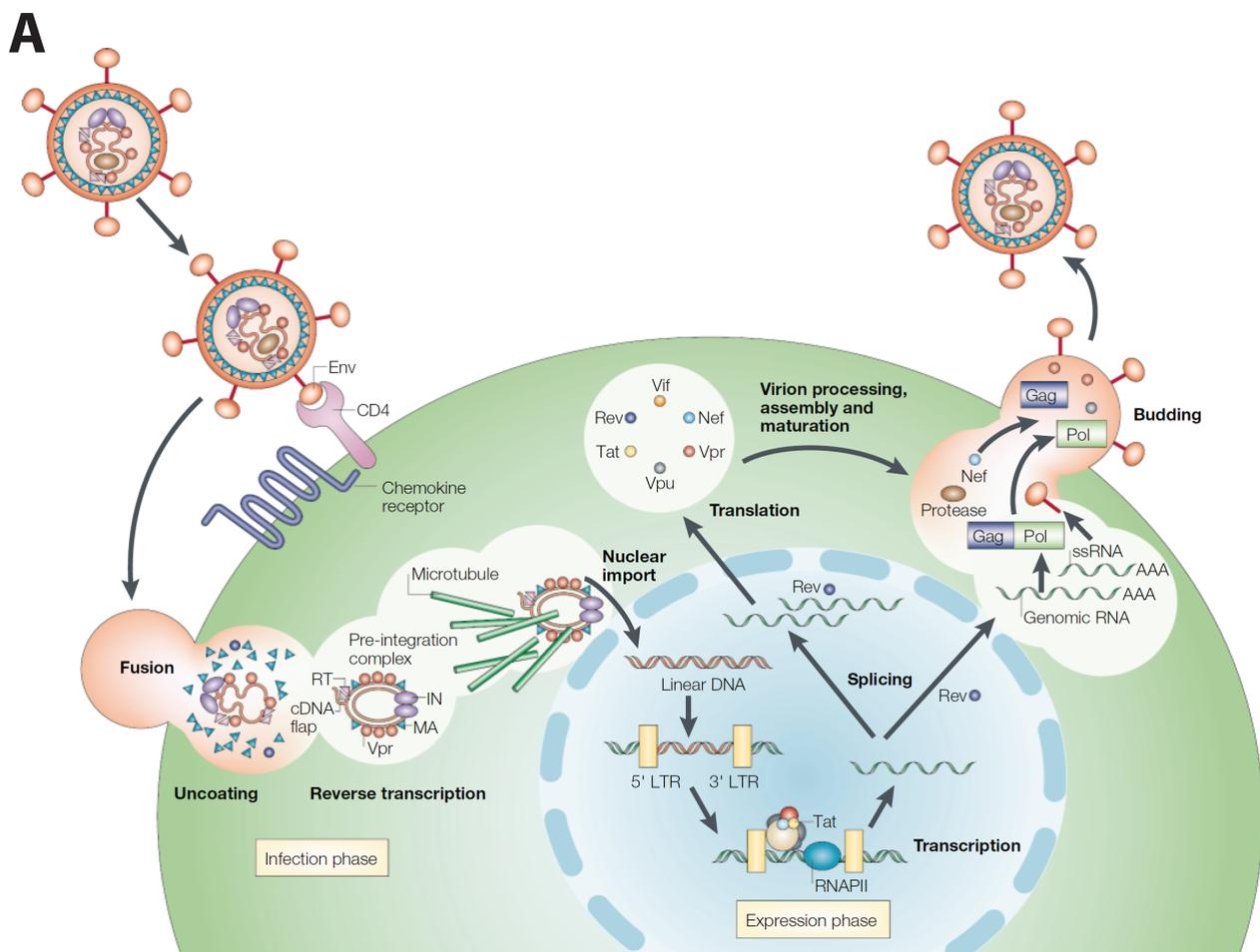
GPM  
(low Phe food)

LNAA  
(inhibition of Phe entering the circulation)

## Muscle

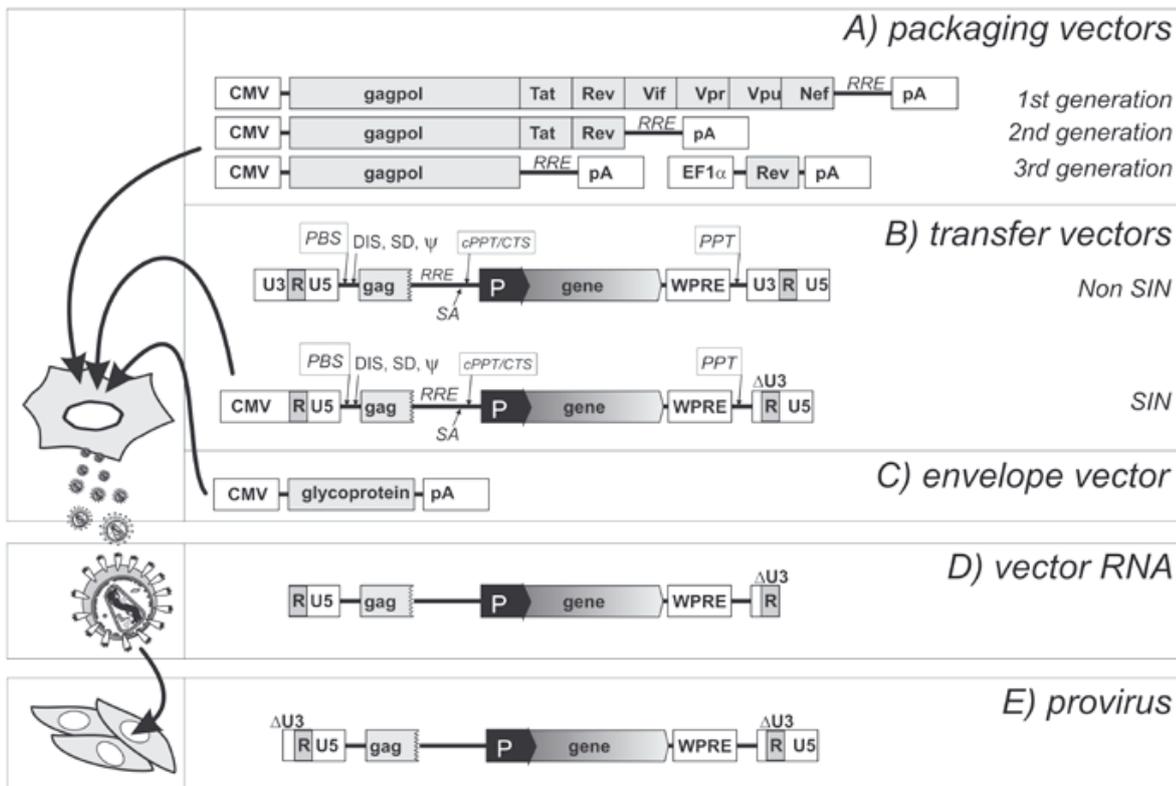
Alternate Gene Therapy Target  
(combination necessary of wild type PAH gene and the complete set of 5 genes necessary for normal BH<sub>4</sub> metabolism)

Figure 12 : Présentation de différentes méthodes envisagées pour le traitement de la PCU, rassemblées par sites d'action. LNAA : acides aminés neutres, PAL : phénylalanine-ammonium lyase. D'après van Spronsen et Enns, 2010.



**Figure 13 : A.** Cycle de vie du virus VIH, de l'interaction avec la cellule hôte jusqu'à la production par celle-ci de nouvelles particules virales. D'après Peterlin et Trono 2003. **B.** Comparaison du provirus sauvage de VIH (a) avec un vecteur lentiviral (b) de dernière génération. Seuls les éléments nécessaires à l'encapsidation et l'intégration de la séquence provirale ont été conservés dans le vecteur. De nombreuses séquences accessoires visant à améliorer le rendement de production du vecteur ou l'expression du transgène ont été déplacées ou ajoutées (d'après Pluta et Kacprzak 2009).

**Abréviations :** hP : promoteur hybride ; attL et attR : site d'attachement gauche et droit ; TAR élément de réponse de transactivation ; gag, portion 5' du gène gag contenant des signaux de dimérisation/encapsidation ; PBS : site de liaison de primer ; DIS : signal de dimérisation ; SD : site d'épissage donneur ; SA : site d'épissage accepteur ; Psi : signal d'encapsidation ; cPPT : région centrale polypurine ; CTS : séquence centrale de terminaison ; RRE : élément de réponse REV ; PPT : région polypurine ; polyA : signal de polyadénylation ; ΔU3 : délétion auto-inactivante de la région U3 du LTR 3' ; P : promoteur interne ; PCE : élément de contrôle post-transcriptionnel ; PRE : élément régulateur post-transcriptionnel ; CTE : élément de transport constitutif ; cHS4 : séquence isolante de la β-globine de poulet ; het. polyA : signal polyA hétérologue ; SPA : signal polyA synthétique.



**Figure 14 :** Présentation du mode de production et d'utilisation des vecteurs lentiviraux. La première étape est la production des particules virales *in vitro* en cellules 293T. Les plasmides de structure, de transfert et d'enveloppe sont co-transfectés dans les cellules productrices. Celles-ci produiront les vecteurs lentiviraux. En A sont rassemblés les plasmides contenant les informations relatives à la structure du virion. Jusqu'à présent trois générations de vecteurs lentiviraux ont été construites, pour chaque génération, le matériel approprié est schématisé en regard. Les plasmides de transfert (B) peuvent être de type SIN, c'est cette construction qui contient les informations qui seront véhiculées par le vecteur viral. Le plasmide d'enveloppe contient l'information relative à la protéine de surface du vecteur. (D) La particule virale produite contient de l'information stockée sous forme d'ARN. Après transduction, cette information est intégrée stablement au génome de la cellule hôte (provirus).

**Abréviations :** CMV : promoteur du cytomégalovirus, EF1 $\alpha$  : promoteur humain du facteur d'élongation 1 alpha, gag, portion 5' du gène gag contenant les signaux de dimérisation/encapsidation, PBS : site de liaison de primer, DIS : signal de dimérisation, SD : site d'épissage donneur, SA : site d'épissage accepteur,  $\Psi$  : signal d'encapsidation, cPPT : région centrale polypurine, CTS : séquence centrale de terminaison, RRE : élément de réponse REV, PPT : région polypurine, pA : signal de polyadénylation,  $\Delta$ U3 : délétion auto-inactivante de la région U3 du LTR 3', P : promoteur interne, WPRE : élément régulateur post transcriptionnel du WHV (*woodchuck hepatitis virus*).