

Abréviations

ALAT : alanine amino transférase
ANOVA : analyse de la variance
ASAT : aspartate amino transférase
BTS : bilirubine totale sérique
cM : centi Morgan
ENU : éthylnitrosourée
FC : ferrochélatase
GR : globules rouges
Hb : hémoglobine
Ht : hématocrite
PAL : phosphatases alcalines
QTL : *quantitative trait locus*
Rétic : réticulocytes

Introduction	p 7
Etude bibliographique	p 9
<u>I-Brefs rappels historiques</u>	p 11
<u>II-Voie de biosynthèse de l'hème</u>	p 11
<u>A-Porphyrines et précurseurs</u>	p 11
<u>B-Métabolisme de l'hème</u>	p 13
<u>C-Régulation de la biosynthèse de l'hème</u>	p 15
<i>1-Régulation hépatique</i>	p 16
<i>2-Régulation érythropoïétique</i>	p 17
<u>D-Catabolisme de l'hème</u>	p 19
<u>III-Les porphyries chez l'Homme</u>	p 20
<u>A-Porphyries hépatiques</u>	p 20
<u>B-Porphyries érythropoïétiques</u>	p 21
<u>C-Porphyries acquises</u>	p 21
<u>D-La protoporphyrie érythropoïétique humaine</u>	p 22

<i>1-Historique</i>	p 22
<i>2-Métabolisme de la protoporphyrine IX</i>	p 22
<i>3-Clinique</i>	p 23
<i>4-Diagnostic</i>	p 23
<i>5-Traitement</i>	p 23
<i>6-Génétique</i>	p 24
<u>IV-Les porphyries chez les animaux</u>	p 26
<u>A-Porphyries congénitales spontanées chez les animaux</u>	p 26
<i>1-Porphyrine érythropoïétique congénitale</i>	p 26
<u>a-L'Ecureuil fauve</u>	p 26
<u>b-Le Chat domestique</u>	p 27
<u>c-Le Lapin</u>	p 28
<u>d-Le Porc</u>	p 28
<u>e-Les bovins</u>	p 29
<u>f-Le Chien</u>	p 30
<i>2- Protoporphyrine érythropoïétique</i>	p 30
<u>a-Le Poulet</u>	p 30

<u>b-Les bovins</u>	p 30
<u>B- Les modèles de porphyries chez les animaux de laboratoire</u>	p 32
1- <i>Porphyrie cutanée familiale</i>	p 32
<u>La mutation <i>URO-D deficiency</i> de la Souris</u>	
2- <i>Porphyrie hépato-érythropoïétique</i>	p 33
<u>La mutation <i>yquem</i> du Poisson-zèbre</u>	
3- <i>Porphyrie aiguë intermittente</i>	p 33
<u>La mutation <i>Pbgd deficiency</i> de la Souris</u>	
4- <i>Porphyrie variegata</i>	p 34
<u>La mutation <i>R59W PPOX</i> de la Souris</u>	
5- <i>Porphyrie érythropoïétique congénitale</i>	p 35
<u>La Souris</u>	
6- <i>Protoporphyrine érythropoïétique</i>	p 35
<u>a-La mutation <i>dracula</i> du Poisson-zèbre</u>	p 35
<u>b-La mutation <i>ferrochelatase deficiency</i> de la Souris</u>	p 35
<i>b-1-L'expérience de mutagenèse</i>	p 35
<i>b-2-La découverte de la mutation</i>	p 36
<i>b-3-Phénotype de la mutation <i>ferrochelatase deficiency</i></i>	p 36
<i>Clinique</i>	p 36
<i>Hématologie</i>	p 37
<i>Biochimie</i>	p 38

<i>Histologie</i>	p 38
<i>Physiopathologie</i>	p 38
<i>Analyse moléculaire</i>	p 39
<i>Thérapeutique</i>	p 40
Thérapie cellulaire	p 40
Thérapie génique	p 41
<i>Effet du fonds génétique</i>	p 43
<u>c-Mutation induite par une délétion de l'exon 10 de la ferrochélatase, chez la Souris</u>	p 43
<u>C- Fonds génétique et pathologie animale</u>	p 45
Les lignées congéniques	p 53
Matériel et méthodes	p 61
<u>I- Les souris</u>	p 61
<u>II- Extraction de l'ADN</u>	p 62
<u>III- Génotypage</u>	p 63
<u>IV- Hématologie</u>	p 63
<u>V- Biochimie</u>	p 64
<u>VI- Enzymologie</u>	p 64

VII- Histologie p 64

VIII- Analyse statistique p 65

Résultats p 67

I- Obtention de la lignée congénique sur fonds BALB/c p 67

II- Production et caractérisation des lignées congéniques sur les fonds C57BL/6 et SJL/J p 68

III- Observations cliniques p 70

IV- Analyses hématologiques, biochimiques et enzymatiques p 72

A- Effet du génotype au locus *Fech* p 75

B- Effet du fonds génétique p 77

C- Influence du fonds génétique sur l'effet du génotype p 79

D- Influence de l'âge sur l'effet du génotype p 81

E-Influence du fonds génétique sur l'interaction âge-génotype p 83

<u>F- Taux de protoporphyrines dans les hématies et les fèces</u>	p 85
<u>G- Analyse enzymatique</u>	p 88
<u>H- Histologie</u>	p 89
Discussion	p 93
Conclusion	p 99
Références bibliographiques	p 103

Introduction

Au cours des dix dernières années, plusieurs centaines de gènes responsables de maladies génétiques humaines ou animales à transmission mendélienne ont été clonés. Pour nombre d'entre eux, les mutations les plus fréquemment retrouvées chez les malades ont été décrites. Les résultats de ces études ont montré que, pour une même maladie, on peut observer des mutations de nature variée (mutations ponctuelles, insertions, délétions), pouvant entraîner un mode de transmission différent (dominant ou récessif) selon les familles ou les pedigrees. Une partie de la différence de gravité des symptômes, parfois très grande, observée entre les malades peut être expliquée par cette hétérogénéité génétique. Toutefois, chez l'Homme, une différence de gravité des symptômes peut également être observée entre des patients portant la même anomalie génétique, ce qui peut traduire l'influence de facteurs de l'environnement ou celle d'autres facteurs génétiques, que l'on regroupe sous le terme de "gènes modificateurs".

L'identification de ces gènes modificateurs de phénotype est extrêmement complexe chez l'Homme, les animaux de rente ou les carnivores domestiques. Bien que toujours longue et délicate, elle est toutefois plus simple dans des espèces modèles telles que le Rat ou la Souris et les conclusions que l'on peut tirer de ces études fournissent des pistes de recherche pour le généticien humain ou animal.

L'influence de facteurs génétiques, indépendants du gène muté responsable de la maladie, est soupçonnée dans la protoporphyrie érythropoïétique chez l'Homme. Cette maladie génétique rare, transmissible de façon autosomique dominante est due à des mutations dans le gène de la ferrochélatase, la dernière enzyme de la voie de biosynthèse de l'hème. Elle provoque une photosensibilité détectée le plus souvent dans l'enfance et parfois une atteinte hépatique grave. Elle a également été observée et bien documentée chez les bovins. D'autres porphyries s'observent de façon physiologique ou pathologique chez différentes espèces animales.

Un modèle de protoporphyrie érythropoïétique a été identifié chez la Souris suite à une expérience de mutagenèse chimique utilisant l'éthylnitrosourée. Ce mutagène a provoqué une substitution d'une base dans le gène de la ferrochélatase, provoquant un phénotype de protoporphyrie érythropoïétique de transmission autosomique récessive. Une lignée consanguine dans laquelle cette mutation ségrège a été établie.

A l'occasion de croisements entre cette lignée consanguine et d'autres lignées consanguines de laboratoire, une modification importante de la sévérité du phénotype a été observée chez des souris de fonds génétique hybride. Une étude approfondie de l'effet du fonds génétique a été entreprise. La mutation a été introduite dans deux autres fonds génétiques consanguins en développant des lignées congéniques.

L'objectif de notre travail expérimental a consisté à caractériser sur les plans clinique, hématologique et biochimique la maladie dans les trois fonds génétiques et à réaliser des croisements dans la perspective d'identifier des régions chromosomiques associées à une plus ou moins grande sévérité de la maladie.

Etude bibliographique

I-Brefs rappels historiques

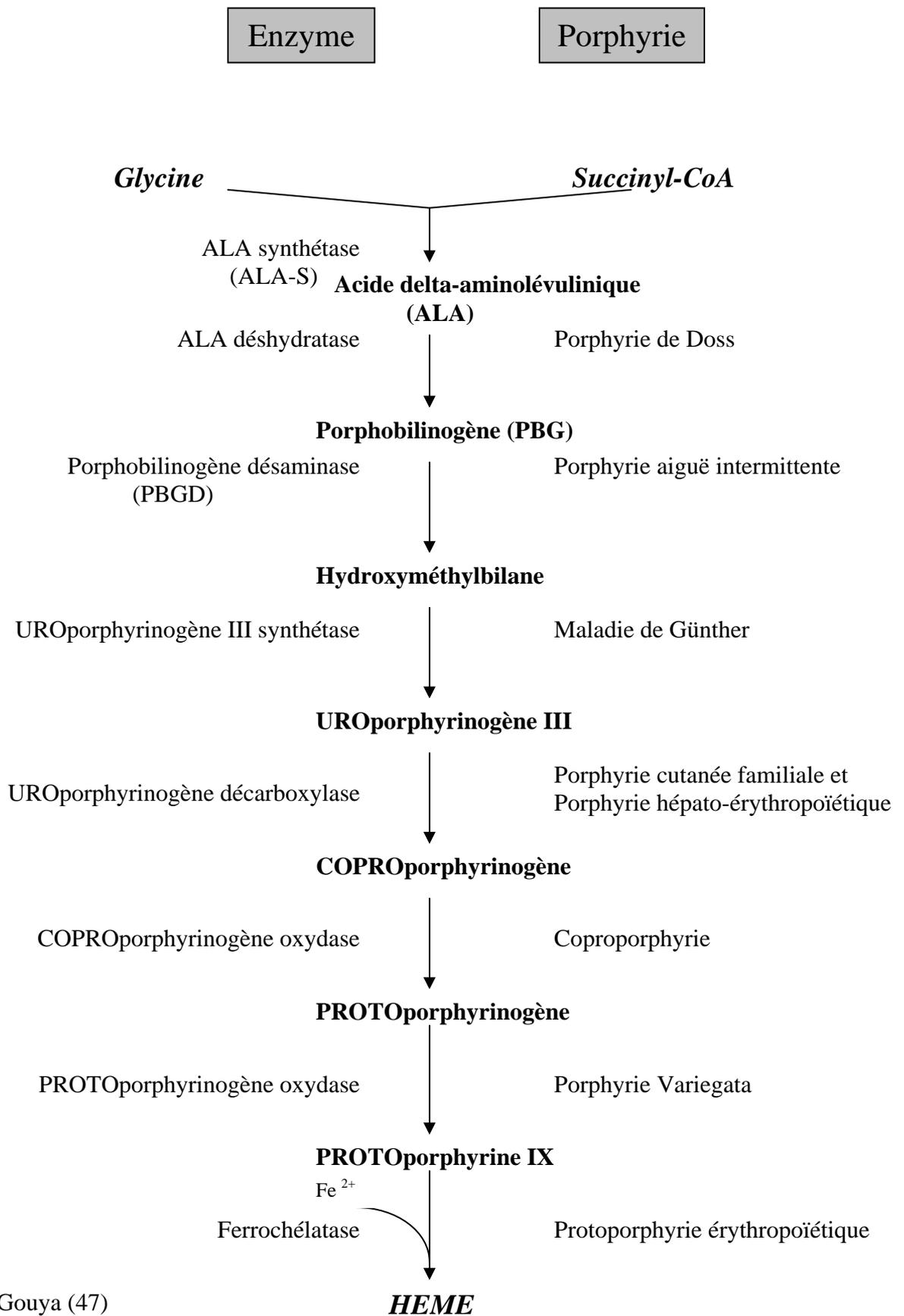
Le groupe des porphyries rassemble diverses maladies héréditaires ou acquises qui présentent comme caractère commun un déficit fonctionnel partiel en l'une des enzymes de la voie de biosynthèse de l'hème.

C'est en 1911 que Günther décrit pour la première fois un cas clinique de porphyrie chez l'homme.

Les étapes de la voie de biosynthèse de l'hème sont décrites entre 1945 et 1955 par Shemin, Rittenberg (105), Neuberger et Rimington (85).

Dans les années 1970-1980 les différentes porphyries sont associées à un déficit enzymatique (figure 1), puis, dans les années qui suivent, les enzymes de la chaîne de biosynthèse de l'hème sont purifiées dans diverses espèces (85). Récemment, les ADNc de toutes les enzymes de la voie de biosynthèse de l'hème ont été clonées à partir de diverses sources (bactéries, levures, mammifères dont la Souris et l'Homme). Enfin les séquences génomiques correspondantes ont été clonées, leur localisation identifiée et leur structure caractérisée (91).

Figure 1 : Enzymes et porphyries héréditaires correspondante.



D'après Gouya (47)

II-Voie de biosynthèse de l'hème

A-Porphyrines et précurseurs

Deux molécules d'acide δ aminolévulinique (ALA) donnent naissance à une molécule de porphobilinogène (PBG). La condensation et la désamination de quatre molécules de PBG forment un noyau tétrapyrrolique. L'ALA et le PBG sont éliminés majoritairement par le rein et la quasi totalité de l'ALA synthétisé est utilisée pour la synthèse de l'hème (32).

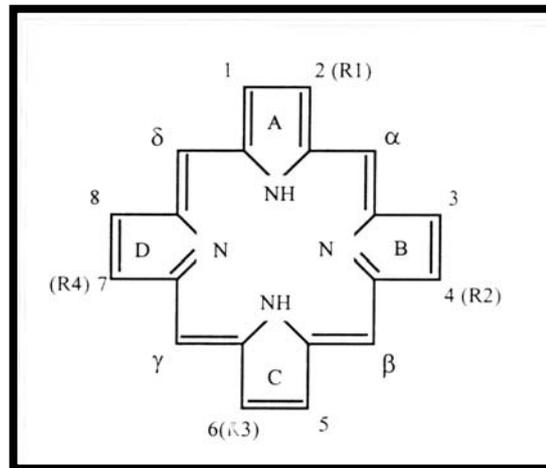
Les porphyrines sont des pigments rouges, fluorescents, à structure cyclique, aromatique et tétrapyrrolique dans lesquels les noyaux pyrrole sont liés entre eux par des ponts méthène ($-\text{CH}=\text{}$) entre deux carbones α (figure 2). Les différentes porphyrines et porphyrinogènes sont définis par les substituants des carbones β :

- URO : 4 acétyl et 4 propionyl
- COPRO : 4 méthyl et 4 propionyl
- PROTO : 4 méthyl, 2 vinyl, 2 propionyl.

Le suffixe « inogène » indique un état réduit des ponts méthènes, le suffixe « ine » un état oxydé. Seuls les dérivés oxydés sont colorés et fluorescents. La disposition des chaînes latérales définit des isomères de position. L'hème est le chélate ferreux de la protoporphyrine IX qui est le seul métabolite intermédiaire à être coloré et fluorescent.

Les différents intermédiaires de la voie de biosynthèse de l'hème sont éliminés sous forme réduite par voie rénale ou hépatique selon leur solubilité. En présence de lumière et d'air ils sont oxydés en porphyrines rouges et fluorescentes.

Figure 2 : Structure des porphyrines.



D'après Gouya (47)

Les substituents latéraux définissent les types de porphyrines.

(Nomenclature de Fisher)

- Protoporphyrine IX : R1, R2 = $-\text{CH}_2=\text{CH}_2$
- Deutéroporphyrine : R1, R2 = $-\text{H}$
- Mésoporphyrine : R1, R2 = $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$
- Coproporphyrine : R1, R2 = $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$
- Uroporphyrine : R1, R2 = $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$

Les quatre radicaux méthyl 1, 3, 5, 8 sont substitués par des résidus acétyl.

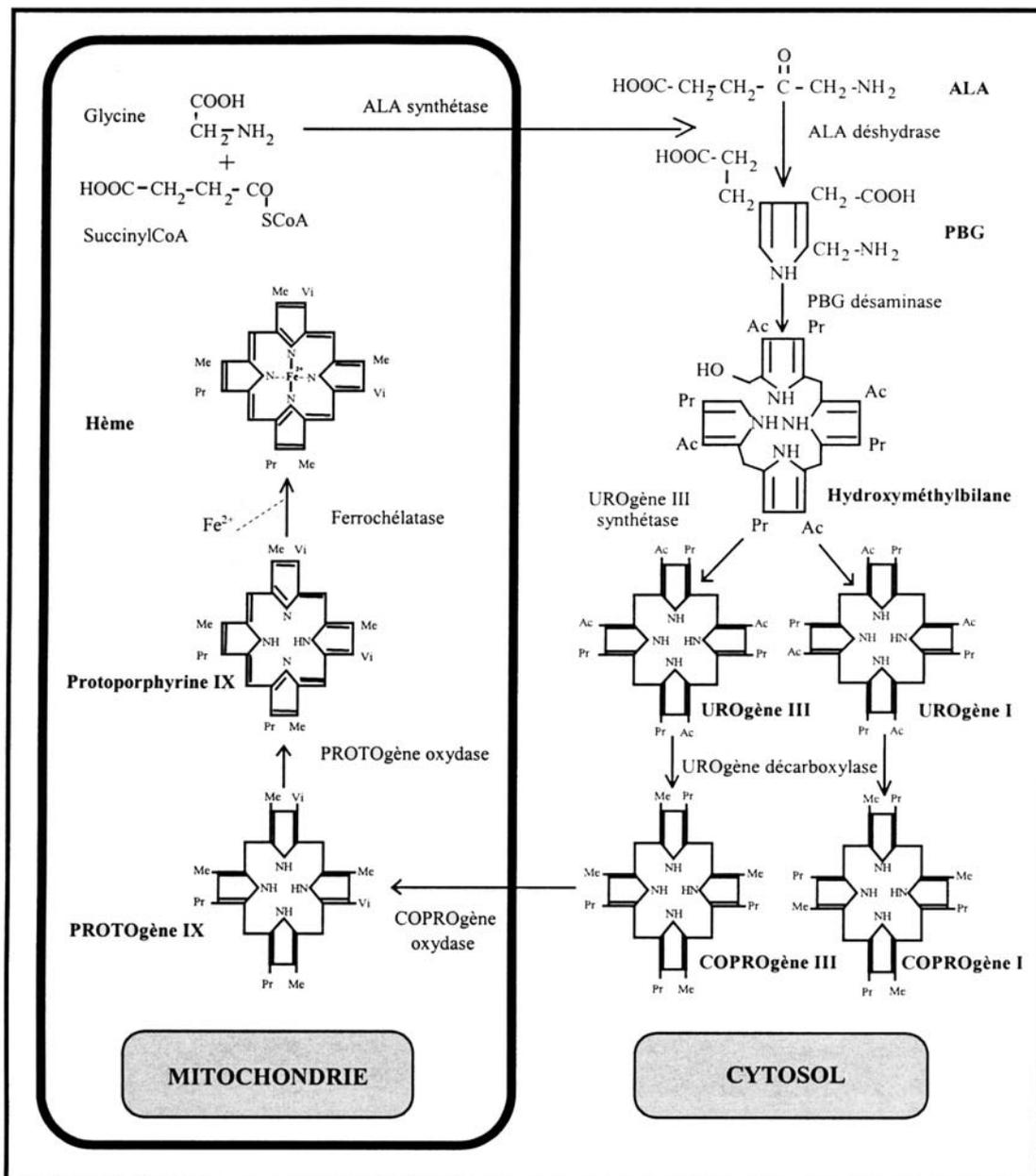
R3, R4 = $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$

La disposition respective des chaînes latérales définit des isomères de position. Seuls les isomères I et III de l'uroporphyrine et de la coproporphyrine et l'isomère IX de la protoporphyrine sont rencontrés dans la nature.

B-Métabolisme de l'hème

Huit enzymes interviennent successivement dans la voie de biosynthèse de l'hème (figure 3). Nous ne détaillerons ici que la structure, le rôle et la régulation de la ferrochélatase, enzyme catalysant la dernière étape de la synthèse de l'hème et déficitaire chez les patients et les animaux souffrant de protoporphyrie érythropoïétique.

Figure 3 : Voie de biosynthèse de l'hème.



D'après Gouya (47)

La ferrochélatase (nom donné par Claude Rimington en 1958) catalyse l'insertion du fer Fe^{2+} dans la protoporphyrine IX pour former l'hème. Chez les eucaryotes la ferrochélatase, incluse dans la membrane interne des mitochondries (site actif situé sur la face matricielle (54)), est vraisemblablement associée au complexe I de la chaîne respiratoire (116). L'environnement lipidique influence son activité (63).

Elle est synthétisée dans le cytoplasme, à partir d'un gène nucléaire, sous la forme d'un précurseur de 44 kilo Dalton (kDa) qui subit une protéolyse dans sa partie N terminale, lors de sa translocation dans la mitochondrie, pour donner une protéine monomérique de 40 kDa (15). *In vivo*, la ferrochélatase se présente sous la forme d'un homodimère de 80 kDa (112).

La ferrochélatase isolée de tissus humains (23,24), de souris (33), de poulet (26), de grenouille (26) et de drosophile (104) est une métalloenzyme avec un *cluster* fer soufre. Ce *cluster*, ou regroupement d'atomes, comprend deux atomes de fer et deux atomes de soufre [2Fe-2S]. Il s'agit d'une structure retrouvée dans des protéines dites Fer-Soufre appartenant à la grande famille des métalloprotéines, protéines ayant dans leur(s) site(s) actif(s) un ou plusieurs métaux. Ces protéines Fer-Soufre sont présentes dans l'ensemble du monde vivant (micro-organismes, plantes, animaux), y jouant un rôle essentiel dans tous les mécanismes d'oxydo-réduction du métabolisme énergétique des cellules vivantes (photosynthèse, respiration cellulaire, fixation de l'azote, etc). La ferrochélatase de levure et des plantes ne possède pas ce *cluster* (34). En revanche, contrairement à ce qui avait été annoncé en 1995 par Ferreira et collaborateurs, le *cluster* existe chez certaines bactéries (21). Le *cluster* n'a pas d'activité catalytique (35) et son rôle biologique n'a pas été totalement élucidé (22). La structure tridimensionnelle de la ferrochélatase de *Bacillus subtilis* a été déterminée avec une résolution de 1,9 Å (3), celle de l'Homme avec une résolution de 2 Å (125).

C-Régulation de la biosynthèse de l'hème

L'hème est un constituant prosthétique de nombreuses protéines : hémoglobine, myoglobine, catalases, cytochromes de la chaîne respiratoire, cytochrome B5 du métabolisme des lipides, cytochrome P450 de la détoxification hépatique (91).

Même si la synthèse de l'hème existe de façon constitutive dans toutes les cellules, c'est dans le tissu érythropoïétique, en raison d'une importance quantitative majeure pour la synthèse de l'hémoglobine et dans le foie, où s'effectue la plus grande partie de la synthèse des hémoprotéines, que sa régulation est la plus étudiée.

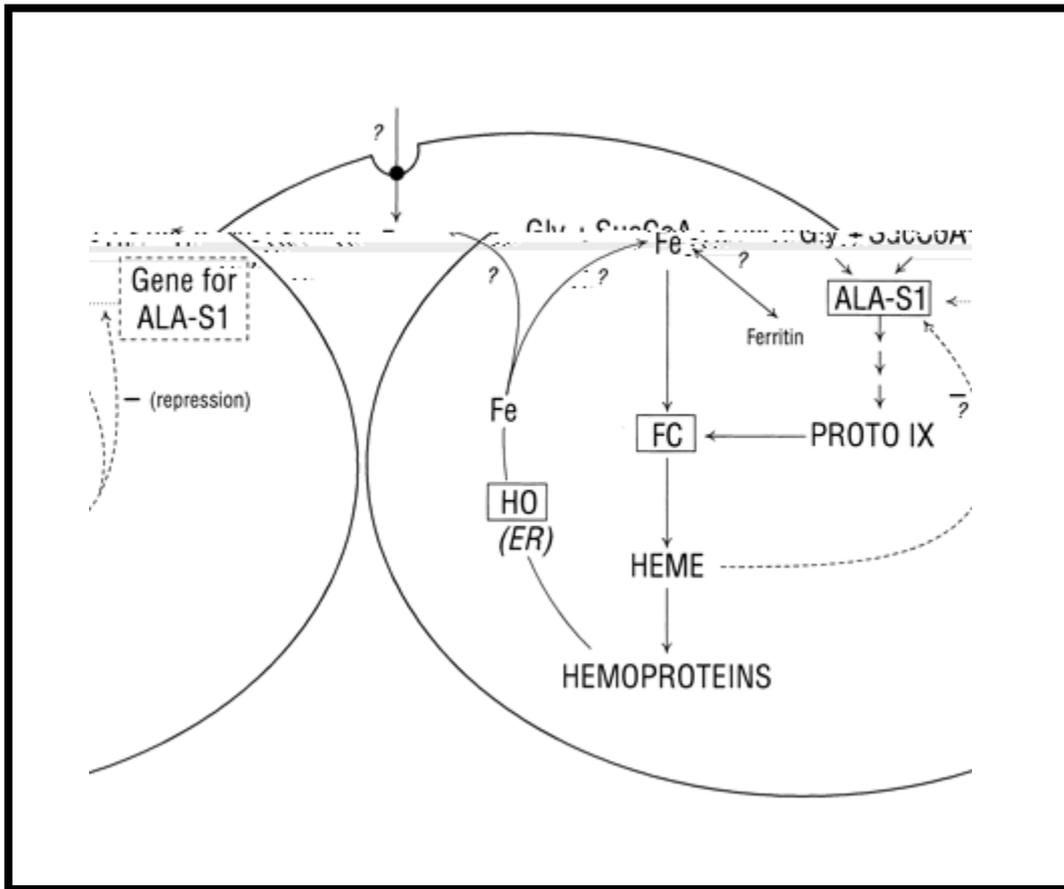
1-Régulation hépatique (Figure 4)

Dans le foie, la synthèse de l'hème est liée à celle des apoprotéines avec lesquelles l'hème s'unit pour former les hémoprotéines hépatiques : cytochromes, tryptophane pyrrolase, catalases... La majorité de l'hème synthétisé dans le foie est consommée par les cytochromes P450 qui ont une demi vie très courte (61). En revanche ce sont les cytochromes mitochondriaux qui renferment la plus grande proportion de l'hème hépatique.

Parmi les cytochromes P450, certains sont inductibles et la synthèse de l'hème est donc fonction de l'induction de ces cytochromes (82).

Les deux enzymes limitantes de la chaîne de biosynthèse de l'hème sont l'ALA-S1 (isoforme ubiquitaire de l'ALA-S) et la PBGD. L'ALA-S1 peut être réprimée ou induite par de nombreuses substances chimiques (inducteurs des cytochromes P450 tels que le phénobarbital ou inhibiteurs de la synthèse d'hème tels que le succinyl acétone). L'induction de l'ALA-S1 par différentes drogues diminuant la synthèse d'hème ou consommant l'hème est rapidement réprimée par l'apport exogène d'hème (109, 61). Cette répression s'observe à des concentrations physiologiques (10^{-8} à 10^{-7} M). Le ou les mécanismes mis en jeu ne sont pas connus, cependant le contrôle s'effectuerait à plusieurs niveaux. L'hème n'agirait pas sur la transcription du gène de l'ALA-S1 mais diminuerait la stabilité des ARNm (53). Des régulations traductionnelle et post-traductionnelle ont été décrites (126), l'hème inhibant la maturation du précurseur ALA-S1 et l'incorporation de l'enzyme mature dans la matrice mitochondriale (110).

Figure 4 : Régulation hépatique de la synthèse d'hème.



D'après Ponka (91)

Légende

Gly : glycine
 SucCoA : succinyl CoA
 Proto IX : protoporphyrine IX
 FC : ferrochelatase
 HO: hème oxygénase
 ER : réticulum endoplasmique

2-Régulation érythropoïétique (Figure 5)

Les mécanismes de régulation de la synthèse d'hème sont différents selon que l'on s'intéresse aux érythrocytes matures ou à leurs précurseurs en voie de maturation.

Des travaux portant sur des cellules érythroleucémiques de souris (cellules MEL) ont montré que l'activité de l'ALA-S2 (isoforme spécifique des cellules érythropoïétiques) est précoce tout comme celle de la ferrochelatase. Cette dernière ne constitue donc pas l'étape limitante de la synthèse de l'hème. En revanche l'hème semble indispensable à l'induction de sa voie de biosynthèse dans les cellules érythroïdes en différenciation (61, 91).

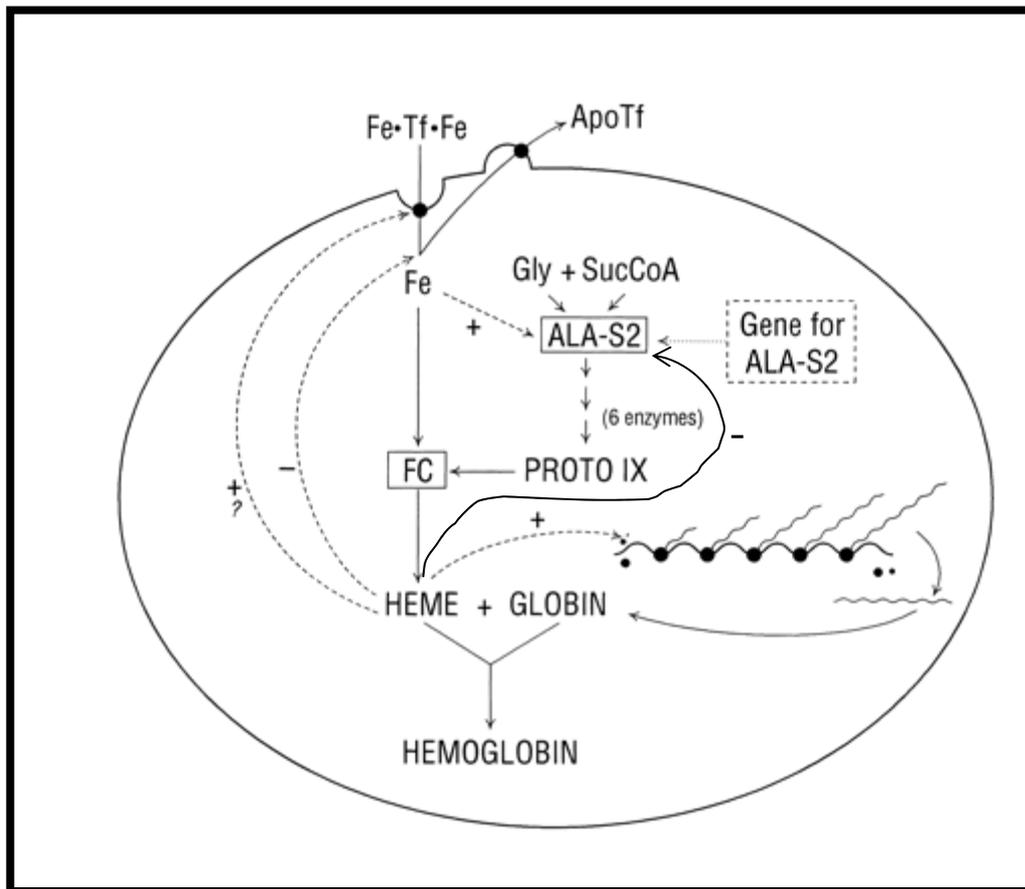
Il semble que la différenciation érythroïde, induite physiologiquement par l'érythropoïétine, conduise à l'activation de toutes les enzymes de la voie de biosynthèse et à l'augmentation du nombre de récepteurs à la transférine.

Enfin, à l'exception de URO-S et URO-D, tous les gènes codant pour les enzymes de la chaîne de synthèse, ainsi que le gène du récepteur à la transferrine, possèdent des sites prédits ou attestés de fixation pour les facteurs transcriptionnels GATA-1 et NF-E2. Des sites de fixations pour ces facteurs étant présents sur les gènes codant pour les globines, il est fort probable que ces facteurs de transcription régulent de façon coordonnée les trois aspects de la synthèse de l'hémoglobine : captage du Fer (récepteurs à la transferrine), biosynthèse de l'hème et synthèse des chaînes protéiques de globines.

Dans les érythrocytes matures (Figure 5), l'hème n'inhibe pas la synthèse de l'ALA-S2 mais inhibe l'absorption du fer par la cellule à partir de la transferrine extracellulaire, sans pour autant diminuer son utilisation pour la synthèse de l'hème (91). De plus, la région 5' non codante de l'ARNm de l'ALA-S2 contient un domaine IRE (*iron responsive element*) qui accroît la traduction du gène de l'ALA-S2 lorsque la concentration en fer augmente, donc son niveau de synthèse et finalement la production d'hème dans la cellule. Enfin le fer pourrait jouer un rôle dans la synthèse et la stabilisation de l'ARNm de l'ALA-S2 (19).

Pour terminer, l'hème lui même participe à une régulation post-traductionnelle de l'expression du gène ALA-S2. Un motif protéique nommé HMR (*heme regulatory motif*), très conservé entre les espèces, a été localisé sur la séquence de l'ALA-S2 de souris. Un rétrocontrôle négatif, exercé par l'hème sur le transport de l'enzyme vers la mitochondrie via ce motif, a été montré *in vitro* (66).

Figure 5 : Régulation érythropoïétique de la synthèse d'hème.



D'après Ponka (91)

Légende

Tf: transférine
Gly : glycine
SucCoA : succiny CoA
Proto IX : protoporphyrine IX
FC : ferrochélatase

D-Catabolisme de l'hème

Chez les mammifères, 95% de l'hème se trouve dans l'hémoglobine des érythrocytes circulants. La rate assure la dégradation des globules rouges anormaux ou sénescents. Le foie joue un rôle important dans la dégradation de l'hème.

L'hème issu des érythrocytes est catabolisé en biliverdine, fer et monoxyde de carbone par l'hème oxygénase (79). La biliverdine est réduite en bilirubine par la biliverdine réductase. Dans les hépatocytes, la bilirubine libre est conjuguée sous l'action d'une bilirubine-UDP-glucuronyl-transférase. La bilirubine conjuguée est ensuite excrétée dans l'intestin, via la vésicule biliaire, où elle subit une hydrolyse bactérienne. Une fraction minime de bilirubine libre est réabsorbée par la circulation porte (cycle entéro-hépatique), la majorité étant réduite par les entérobactéries en pigments biliaires excrétés dans les selles.

III-Les porphyries chez l'Homme

Les porphyries recouvrent un ensemble hétérogène d'anomalies enzymatiques héréditaires ou acquises ayant toutes en commun un trouble du métabolisme des porphyrines. Chaque type de porphyrie présente un profil d'excrétion urinaire, fécal et plasmatique spécifique.

Les porphyries héréditaires sont un ensemble de maladies métaboliques dues à un déficit en l'une des enzymes de la voie de biosynthèse de l'hème. On distingue porphyries érythropoïétiques et porphyries hépatiques en fonction du tissu (moelle osseuse ou foie) dans lequel prédomine le trouble métabolique.

Les différentes porphyries héréditaires sont présentées dans le tableau 1, page 25.

A-Porphyries hépatiques

Le groupe des porphyries hépatiques aiguës rassemble la porphyrie aiguë intermittente (*acute intermittent porphyria* ou AIP en anglais), la coproporphyrine héréditaire, la porphyrie variegata (*variegata porphyria* en anglais), et le déficit extrêmement rare en ALA déshydratase nommé porphyrie de Doss. Les porphyries hépatiques aiguës se caractérisent cliniquement par des douleurs abdominales, des troubles neurologiques et des troubles psychiques. Les patients atteints de coproporphyrine ou de porphyrie variegata peuvent aussi présenter des troubles cutanés proches de ceux observés dans la porphyrie cutanée.

La porphyrie cutanée se manifeste presque exclusivement par des signes cutanés au niveau des régions exposées au soleil (face et mains). Crises douloureuses abdominales et manifestations neurologiques et psychiatriques sont absentes. Après l'exposition au soleil de parties non protégées, des vésicules ou phlyctènes plus ou moins douloureuses apparaissent, cicatrisent lentement, laissant souvent une hyper ou une hypopigmentation. On retrouve fréquemment une fragilité cutanée, une hyperpigmentation et une hypertrichose (région malaire, front, avants bras). Il existe deux types de porphyries cutanées : le type familial, à transmission autosomique dominante, avec un déficit généralisé de l'activité de l'uroporphyrinogène décarboxylase et le type sporadique dans lequel le déficit enzymatique est limité au foie.

La porphyrie hépato-érythropoïétique est très rare et rencontrée chez des patients homozygotes pour des allèles associés à un déficit en uroporphyrinogène décarboxylase.

Elle associe, dès l'enfance, des lésions de photosensibilité cutanée mutilantes et une anémie hémolytique inconstante et d'intensité variable (28).

B-Porphyrines érythropoïétiques

La porphyrie érythropoïétique congénitale ou maladie de Günther (*congenital porphyria* ou *congenital erythropoietic porphyria*, CEP en anglais) associe une coloration rouge des urines, une photosensibilité sévère (lésions mutilantes fréquentes sur les oreilles, les doigts et les paupières), une hypertrichose, une érythrodonie, une anémie hémolytique chronique (pouvant nécessiter des transfusions) et une splénomégalie.

La protoporphyrine érythropoïétique (*erythropoietic protoporphyria* ou EPP en anglais) sera détaillée plus loin.

C-Porphyrines acquises

Les porphyries acquises correspondent à une accumulation de porphyrines ou de précurseurs suite à une inhibition toxique de certaines enzymes de la biosynthèse de l'hème (85). On les rencontre lors d'intoxication au plomb (saturnisme), le plomb étant un inhibiteur de l'ALA déshydratase, de la coproporphyrinogène oxydase et de la ferrochélatase, ou lors d'intoxication à l'hexachlorobenzène (fongicide), inhibiteur de l'uroporphyrinogène décarboxylase hépatique. Chez l'Homme, d'autres substances peuvent entraîner une élévation de la coproporphyrine en particulier les sulfamides, les barbituriques, et l'alcool.

Nous allons ici détailler la protoporphyrine érythropoïétique de l'Homme pour laquelle la souris, sujet de notre étude, est un très bon modèle.

D La protoporphyrine érythropoïétique humaine (PPE)

1-Historique

Magnus décrit en 1961, chez un homme de 35 ans, une photosensibilité majeure évoluant depuis sa naissance. Si l'excrétion urinaire des porphyrines et des précurseurs était normale, il mit en évidence de grandes quantités de porphyrine érythrocytaires et fécales (78). Il donna à cette maladie le nom de protoporphyrine érythropoïétique.

Le caractère familial de l'affection fut mis en évidence en 1963 par Haeger-Aronsen qui décrit trois malades et deux porteurs asymptomatiques sur trois générations d'une même famille (50). Le déficit en ferrochélatase fut découvert en 1975 (11). Bloomer démontra enfin que dans trois familles l'un des parents d'un enfant atteint de PPE avait une activité ferrochélatase réduite, confirmant ainsi qu'il s'agissait bien de l'anomalie biochimique fondamentale de la PPE et qu'elle se transmettait selon un mode autosomique dominant (10).

2-Métabolisme de la protoporphyrine IX

Dans les cellules rouges en maturation s'accumulent, durant l'hémoglobinosynthèse, de faibles quantités de protoporphyrine qui diffusent à travers la membrane des cellules et se lient aux protéines plasmatiques (albumine, hémopexine). La protoporphyrine, insoluble dans l'eau, est éliminée à 85% par la bile sans modification, pouvant aussi subir un cycle de réabsorption entérohépatique. Les 15% restant sont métabolisés en pigments biliaires et éliminés dans les fèces.

La protoporphyrine, très liposoluble, s'accumule facilement au niveau cutané par diffusion à partir des capillaires superficiels. Certains auteurs pensent que ce transfert est photo-induit et que l'accumulation de protoporphyrine est favorisée par la présence, en quantité importante au niveau cutané, du récepteur « *mitochondrial peripheral-type benzodiazepine* » qui lie avec forte affinité la protoporphyrine. Celle-ci absorbe l'énergie lumineuse à différentes longueurs d'onde, particulièrement entre 400 et 410 nm (bande de Soret). Cette excitation peut entraîner la production d'espèces réactives de l'oxygène responsables de dommages cellulaires et d'une activation de la voie du complément (71).

3-Clinique

Chez l'Homme, la protoporphyrie érythropoïétique provoque une photosensibilité sous forme d'épisodes apparaissant dans les minutes ou les heures suivant une exposition solaire et caractérisés par une sensation de brûlure ou piquûre et un érythème fugace. On observe parfois une légère anémie (61).

Dans de rares cas (1 à 3 % des malades) une insuffisance hépatocellulaire majeure et brutale peut se développer, qui peut nécessiter une transplantation hépatique (48, 49). L'autopsie des patients décédés d'atteinte hépatique montre un foie noir, finement nodulaire.

Histologiquement, on note une cirrhose avec une fibrose biliaire et des dépôts massifs de protoporphyrine dans les cellules de Küpffer, les hépatocytes et les canalicules et canaux biliaires (62).

4-Diagnostic

Les éléments qui permettent de poser un diagnostic sont : la concentration normale des porphyrines urinaires, un taux de protoporphyrine érythrocytaire très élevé et une activité résiduelle de la ferrocélatase inférieure à 50% (85).

5-Traitement

Contre la photosensibilité, seul le β carotène semble efficace dans 80% des cas. Pour éviter l'apparition de lésions hépatiques, il est possible de réduire la production de protoporphyrine par un apport oral de fer, l'injection d'hème ou des transfusions sanguines, de favoriser l'élimination hépatique de la protoporphyrine par l'administration de sels biliaires ou d'interrompre la circulation entérohépatique par le cholestyramine ou le charbon activé (61). Ces différents traitements n'ont cependant jamais clairement prouvé leur efficacité, et la dernière ressource thérapeutique en cas de lésion grave du foie reste la transplantation hépatique.

6-Génétique

Le gène de la ferrochélatase a été cloné et localisé sur le bras long du chromosome 18 en 21.3. Il s'agit d'un gène nucléaire unique de 11 exons qui s'étend sur environ 45 kb. Il possède un promoteur qui régule son expression ubiquitaire et érythroïde (61). Plus de soixante mutations très variées dans le gène de la ferrochélatase (substitutions, décalage du cadre de lecture suite à des insertions/délétions, erreurs d'épissage, mutations non sens affectant tous les exons et leurs jonctions) ont été rapportées jusqu'ici (47). Le mode de transmission est le plus souvent dominant.

Les patients sont, en général, porteurs à la fois d'un allèle muté non fonctionnel et d'un allèle normal à faible niveau d'expression (44, 45, 46). Un mode de transmission récessif a été décrit dans quelques cas (65, 100).

L'influence de gènes modificateurs sur le cours de la maladie est suggérée par l'existence, au sein d'une même famille, de patients portant la même mutation et présentant cependant des phénotypes de gravité différente (47).

Tableau 1
Les porphyries héréditaires chez l'Homme.

PORPHYRIE	TRANSMISSION	ENZYME DEFICITAIRE	PRINCIPALES MANIFESTATIONS
en % de l'activité normale			
<u>PORPHYRIES S'HEMATIQUES</u>			
• <u>Porphyrie Cutanée Familiale</u>	AD	UROdécarboxylase(50%)	signes cutanés
• <u>Porphyries Aiguës :</u>			
-P(A)intermittente)	AD	PBG désaminase (50%)	crises neuroviscérales
-Coproporphyrie	AD	COPRO oxydase (50%)	crises neuroviscérales+signes cutanés
-Porphyrie Variégata	AD	PROTO oxydase (50%)	crises neuroviscérales+signes cutanés
-Porphyrie de Doss	AR	ALA déshydrase (<10%)	crises neuroviscérales
<u>PORPHYRIES</u>			
<u>ERYTHROPOIETIQUES</u>	AD	ferrochélatase (25-50%)	signes cutanés
-Protoporphyrie Erythropoïétique			
	AR	UROsynthétase (<10%)	signes cutanés + hémolyse
-Porphyrie Erythropoïétique Congénitale			
<u>PORPHYRIE HEPATO- ERYTHROPOIETIQUE</u>	AR	URO décarboxylase (<10%)	signes cutanés + hémolyse

AD: autosomique dominant

AR: autosomique récessif

(%): pourcentage d'activité résiduelle de l'enzyme

D'après Gouya (47)

IV-Les porphyries chez les animaux

Les porphyries représentent un groupe d'enzymopathies présentes chez l'Homme mais aussi chez différentes espèces animales. Aucune d'entre elles n'a été décrite chez une espèce sauvage, probablement parce qu'elles constitueraient un grave handicap pour l'animal atteint. Il existe cependant une exception à cette constatation. L'Ecureuil fauve (*Sciurus niger*) présente de façon constitutive un état porphyrique sans conséquence pour la survie de l'espèce.

D'autre part, il est connu depuis longtemps que les porphyrines sont présentes de façon naturelle dans des tissus animaux tels que la coquille des œufs de poule, les os des embryons de mammifères ou encore le liquide amniotique de certaines espèces (29). Il est aussi habituel de retrouver des traces de porphyrines dans le duvet de certaines espèces d'oiseaux (124).

A-Porphyries congénitales spontanées chez les animaux

1-Porphyrine érythropoïétique congénitale

a-L'Ecureuil fauve

Les écureuils fauves présentent de façon constitutive une accumulation d'uroporphyrine I dans les os qui prennent une teinte rouge. Les urines, exposées à la lampe de Wood (lumière ultraviolette) présentent une fluorescence dans le rouge à pH acide. Les porphyrines que l'on retrouve dans l'urine sont l'uroporphyrine I et la coproporphyrine I. De même les os et l'urine d'une autre espèce d'écureuils américains, le « Chipmunk » (*Tamias striatus*) présentent une coloration rose due à l'accumulation de porphyrine (119). L'activité de l'uroporphyrinogène III synthétase est considérablement réduite dans le sang, le cœur, le foie, la rate et le rein des écureuils fauves comparée à celle de l'Ecureuil gris (*Sciurus carolinensis*) de même que dans la moelle (69). En l'absence d'activité suffisante de l'enzyme, l'hydroxyméthylbilane est transformé spontanément en uroporphyrinogène I qui en présence d'air et de lumière (ou d'acide) s'oxyde en uroporphyrine I fluorescente. L'uroporphyrinogène I produit par décarboxylation le coproporphyrinogène I qui est ensuite oxydé en coproporphyrine hydrosoluble.

Tous les écureuils fauves semblent présenter cette porphyrie érythropoïétique congénitale analogue à la maladie de Günther de l'Homme.

Les écureuils gris pourtant très proches phylogénétiquement ne sont pas atteints. Contrairement aux hommes atteints de maladie de Günther, les écureuils fauves ne souffrent d'aucune photosensibilité ou anémie (69) et la porphyrie constitutive ne semble donc pas représenter un handicap pour l'espèce. On ignore si elle représente un avantage sélectif qui pourrait expliquer qu'elle ait été conservée et fixée dans l'espèce entière.

b-Le Chat domestique

Deux syndromes, apparemment distincts, de porphyrie érythropoïétique congénitale ont été décrits chez le Chat domestique (*Felis catus*). Le premier cas, décrit en 1964 par Gerald Tobias (118), était un chaton de type européen, noir et blanc, de trois mois et demi, présentant une coloration brun pâle des dents de lait puis des dents définitives et une coloration sanguine des urines. Sous lampe ultraviolette les dents ont présenté une fluorescence rouge. L'analyse des urines a révélé de grandes quantités d'uroporphyrine, de porphobilinogène et de coproporphyrine. Un des trois frères de portée de ce chaton présentait le même tableau clinique. Aucun des deux, maintenus en permanence à l'intérieur, ne présentait de photosensibilité.

En croisant la mère des chatons, également atteinte, avec quatre chats sains non apparentés, il a été possible de construire un pedigree destiné à déterminer le mode de transmission de la maladie. L'observation de chatons atteints dans la descendance a conduit à l'hypothèse d'une transmission autosomique dominante alors qu'elle est autosomique récessive chez l'Homme. En effet, compte tenu de la rareté la maladie dans l'espèce féline il était peu probable que les quatre chats sains, non apparentés à la malade et utilisés pour les croisements aient été hétérozygotes pour l'allèle délétère de la maladie (43).

Le second cas, très différent du premier d'un point de vue clinique, a été décrit dans un pedigree de chats siamois (41). Ce pedigree consistait en une femelle atteinte, accouplée à son frère indemne, ayant donné naissance à une portée de 5 individus : deux chatons morts à la naissance de statut inconnu et trois mâles dont deux atteints. Les animaux atteints présentaient une coloration brun-rouge de l'urine, des os et des dents. Cependant, contrairement au cas décrit par Tobias chez un chat européen, ces siamois présentaient un état léthargique avec une anémie macrocytaire et hypochrome associée à une anisocytose, à une poïkilocytose et à la présence d'hématies nucléées.

Ils présentaient également une atteinte rénale sévère avec une hypercellularité mésengiale, des lésions ischémiques des tubules et une urémie.

Les quantités d'uroporphyrine I et de coproporphyrine I excrétées dans les urines et les fèces étaient beaucoup plus élevées que chez le chat européen et les animaux présentaient une hépatomégalie et une splénomégalie. Tous les tissus examinés (rein, foie, rate, poumon, cœur, pancréas, intestin, testicule...) présentaient une accumulation anormale plus ou moins sévère de porphyrines. L'absence de caractérisation moléculaire de la mutation dans ces deux pedigrees ne permet pas de savoir si la différence de phénotype était due à des mutations différentes dans des gènes différents ou bien à des mutations voisines dont les conséquences cliniques étaient modulées par un effet de la race.

c-Le Lapin

Un unique cas de porphyrie ne résultant pas d'une intoxication a été rapporté en 1991 chez le Lapin (99). L'animal, un lapin blanc de race Néo-Zélandaise entretenu en animalerie de laboratoire est décédé d'une septicémie à *Pasteurella multocida*. A l'autopsie une couleur rouge des dents et des os a été observée, associée à une fluorescence rouge intense sous lumière de Wood. Un échantillon d'urine prélevé dans la vessie a permis de mettre en évidence une grande quantité d'uroporphyrine et de coproporphyrine. La concentration urinaire normale en acide aminolévulinique et en porphobilinogène a permis de rejeter l'hypothèse d'une porphyrie d'origine toxicologique. L'ensemble des données anatomopathologiques permet de suspecter un cas de porphyrie érythropoïétique congénitale.

d-Le Porc

Une coloration brun rouge des os et des dents sur la carcasse d'un porc charcutier ne présentant pas de lésion de photosensibilité est décrite pour la première fois 1911 (57). Les premiers cas de porcs vivants présentant les symptômes de porphyrie érythropoïétique congénitale ont été rapportés en 1944 en Nouvelle-Zélande (18). Les animaux atteints présentaient une coloration des os et des urines due à la présence d'uroporphyrine I et de coproporphyrine I mais pas de photosensibilité. La transmission était probablement autosomique dominante. Des études ultérieures ont permis de confirmer le mode de transmission autosomique dominant de l'anomalie décrite chez des porcs danois descendants tous d'un unique verrat (60). Sur les recommandations du vétérinaire contrôleur les animaux atteints ne furent plus utilisés pour les croisements et la mutation danoise fut éliminée.

En 1980, un syndrome similaire fut décrit chez quatorze des 200 descendants d'un verrat Duroc, au Japon (127). La prévalence de 14/200, trop basse pour signer un mode de transmission autosomique dominant, fut interprétée comme le signe d'une transmission autosomique récessive. Les animaux, en plus du tableau clinique habituel (coloration brun-rouge des os et des urines), présentaient une anémie sévère avec anisocytose, poïkilocytose et un retard de croissance variable selon les individus.

Enfin, en 1995 un cas mixte de porphyrie est décrit à partir de la carcasse d'une femelle Landrace belge (96). A l'abattoir la carcasse avait été écartée de la vente à cause de la coloration anormale de plusieurs organes. L'accumulation d'isomères I des porphyrines proportionnellement plus importante que celle des isomères III, la présence de nombreux produits de décarboxylation dans les tissus ainsi que l'accumulation de protoporphyrine dans de nombreux organes suggèrent une défaillance de l'uroporphyrinogène-III-synthétase et de l'uroporphyrinogène décarboxylase, associée à une inhibition de la ferrochélatase. Cependant, l'absence de dosage de l'activité des enzymes de la voie de biosynthèse de l'hème ne permet pas de conclure de façon formelle. Aucun autre cas n'a été signalé par le propriétaire de l'animal. De plus, l'absence de registre des maladies dans la ferme d'origine de la truie a compromis la mise en place d'une étude familiale.

e-Les bovins

Une forme rare, autosomique récessive (38), de porphyrie érythropoïétique congénitale a été rapportée chez les bovins en 1936 au Swaziland (39) mais les premières descriptions d'une coloration rouge des os chez des bovins apparaissent au début de vingtième siècle dans la littérature vétérinaire (102). Par la suite, des cas de maladie de Günther ont été décrits dans plusieurs races bovines, dans plusieurs pays (4, 59, 117). Ces différents cas ne semblent pas résulter d'un effet fondateur, les animaux atteints appartenant à des races pures établies depuis longtemps. L'intensité des symptômes varie beaucoup d'un animal à l'autre. Les veaux atteints ne se développent pas bien, spécialement après le sevrage. Les trois symptômes prédominants sont la photosensibilité, l'anémie et une coloration rouge des urines. La majorité des veaux atteints présentent une anémie hémolytique à la naissance, accompagnée d'une acidose métabolique sévère et de faiblesse (83). Si le climat est ensoleillé ils développent des lésions de photosensibilité localisées aux régions glabres ou couvertes de poils blancs. Ces lésions inflammatoires, croûteuses et ulcérées régressent lorsque les animaux sont soustraits aux rayons solaires. La fertilité des femelles est réduite.

L'oestrus est peu marqué et les ovaires sont de petite taille. Les hétérozygotes ne présentent aucun symptôme de porphyrie (59).

Le diagnostic peut s'effectuer en mesurant les taux d'uroporphyrine I et de coproporphyrine I, très élevés dans les urines. L'activité de l'uroporphyrine III synthétase est très réduite (68). L'activité enzymatique des hétérozygotes porteurs asymptomatiques est intermédiaire entre celle des individus témoins sains et des animaux atteints (97).

f-Le Chien

Un cas isolé de coloration rose des dents associée à une fluorescence sous lampe de Wood a été observé en 1962 sur un chien de race Labrador (86). Cette coloration rose s'est ensuite transformée en brun et la fluorescence s'est estompée. La localisation du pigment dans les dents ainsi que sa fluorescence étaient caractéristiques des porphyrines. Aucune fluorescence des urines ni de la moelle osseuse n'ont été détectées. Aucune autopsie ni analyse biochimique n'ont été effectuées, ne permettant pas de conclure de façon certaine à une porphyrie qu'elle soit de type congénitale ou toxique. L'animal, conservé par son propriétaire, ne semble pas avoir eu de descendants.

2- Protoporphyrine érythropoïétique

a-Le Poulet

Des cas sporadiques de protoporphyrine érythropoïétique ont été rapportés aux Etats Unis (52) et au Japon (107). L'accumulation de protoporphyrine dans le foie (hépatocytes, cellules de Küpffer, macrophages périportaux et canaux biliaires) et la vésicule biliaire est typiquement détectée lors d'examen histologiques consécutifs à l'observation de foies bruns-verts lors de l'abattage des volailles.

b-Les bovins

En 1977, Ruth, Schwartz et Stephenson décrivent pour la première fois un modèle animal de protoporphyrine érythropoïétique (98). Ils décrivent des symptômes de photosensibilité chez quatre veaux et une vache, nés d'un même géniteur mâle d'origine européenne et de femelles lui étant apparentées. Quelques jours après la naissance les quatre veaux évitaient le soleil et recherchaient l'ombre. Au bout de quelques semaines ils ont présenté des lésions œdémateuses et croûteuses associées à un érythème et à une alopecie, autour du mufle, sur les oreilles et le dos.

Des échantillons de sang prélevés sur les cinq animaux ont émis une fluorescence rouge intense lorsqu'ils ont été exposés à une lumière proche de l'ultraviolet. Les taux de protoporphyrine mesurés dans les globules rouges et les fèces des animaux atteints se sont révélés extrêmement élevés (de 35000 à 46000 µg/100ml dans les globules rouges comparés aux 100 à 310 µg/100ml des parents et d'animaux sains et de 21 à 2650 µg/g de fèces comparés aux 1,2 à 4,2 µg/g relevés chez les parents et les animaux sains). L'activité résiduelle de la ferrochélatase, mesurée dans le foie, la rate, le cœur, le rein et le poumon était de 5 à 20 % chez les malades et d'environ 50 % chez les parents ce qui suggère sans ambiguïté un mode de transmission autosomique récessif alors qu'il est autosomique dominant chez l'Homme.

En 1982, des mesures de l'activité de la ferrochélatase, effectuées sur des cultures de fibroblastes de peau et du foie total issus de bovins protoporphyriques, de leurs parents et de vaches saines confirment le mode de transmission autosomique récessif (9).

Des études d'immunochimie portant sur la mesure du poids moléculaire de l'enzyme purifiée issue de bovins normaux et protoporphyriques et la reconnaissance par des anticorps polyclonaux de lapins de la protéine ferrochélatase ont suggéré que le défaut de l'enzyme, qui conduisait à la réduction de son activité catalytique, n'affectait pas sa structure et résultait probablement d'une mutation ponctuelle dans le gène codant pour l'enzyme (8, 112).

Enfin la protoporphyrie érythropoïétique chez les bovins ne semble pas être associée au dysfonctionnement hépatique sévère que l'on rencontre parfois chez l'Homme. Ceci pourrait s'expliquer par le flux d'acides biliaires plus important chez les bovins que chez l'Homme qui permettrait une excrétion plus efficace de la protoporphyrine (7).

En 1995 la séquence du gène de la ferrochélatase bovine a été déterminée. Le gène s'étend sur plus de 45000 pb et compte 11 exons. La séquence du gène bovin est identique à 86% avec la séquence du gène humain (106). L'utilisation d'hybrides somatiques rongeur-bovin a permis de localiser, en 1997, le gène de la ferrochélatase bovine sur le chromosome 24 (2).

En 1998, a été identifiée la première mutation du gène de la ferrochélatase bovine associée à la maladie. Contrairement à ce qu'avaient prédit les études d'immunochimie, il s'agit d'une transversion au nucléotide 1250, dans le onzième exon du gène qui change un codon stop en une leucine (TGA→ TTA) et rallonge la protéine mutée de 27 acides aminés supplémentaires (58).

La protoporphyrie érythropoïétique bovine a été décrite une fois chez des individus de race Blonde d'Aquitaine (101) et le plus souvent chez des individus de race Limousine (5, 13, 88).

B- Les modèles de porphyries chez les animaux de laboratoire

1- Porphyrie cutanée familiale

La mutation *URO-D deficiency* de la Souris

La porphyrie cutanée humaine, porphyrie la plus répandue chez l'Homme, regroupe deux entités cliniques. La porphyrie cutanée familiale, qui représente un tiers des cas, se transmet de façon autosomique dominante, est caractérisée par une activité de l'uroporphyrinogène décarboxylase réduite de moitié dans tous les tissus et par une accumulation de porphyrines localisée au foie. La porphyrie cutanée sporadique, qui représente deux tiers des cas, est caractérisée par une activité de l'uroporphyrinogène décarboxylase (URO-D) diminuée uniquement dans le foie, en l'absence de mutation dans le gène codant pour l'enzyme. Il est de plus remarquable que les individus portant une mutation dans le gène URO-D ne développent pas tous la maladie. Plusieurs facteurs autres que la mutation du gène URO-D favorisent l'apparition des symptômes : consommation d'alcool, infection par le virus de l'hépatite C, prise orale d'œstrogènes, homozygotie pour une mutation dans le gène responsable de l'hémochromatose (HFE). Dans tous les cas une accumulation de fer est constatée chez les patients développant des symptômes cliniques de porphyrie (14).

Afin de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie, un modèle animal devenait nécessaire. En 2001, une lignée de souris a été établie dans laquelle le gène URO-D a été inactivé par recombinaison homologe dans les cellules souches embryonnaires (ES). L'exon 6 du gène a été remplacé par une séquence exogène contenant le gène de résistance à la néomycine (*neo*) (89). Les souris homozygotes pour la mutation, donc dépourvues d'activité URO-D meurent *in utero*. Les hétérozygotes (URO-D +/-), tout comme les humains hétérozygotes, ne présentent pas de phénotype. Des injections de fer couplées à l'administration orale d'acide aminolévulinique permet de générer chez ces souris hétérozygotes un phénotype porphyrique en trois semaines.

En croisant des souris URO-D +/- avec des souris HFE -/- on obtient des souris URO-D +/-, HFE -/- qui développent un phénotype porphyrique vers l'âge de 14 semaines, associant une excrétion urinaire de porphyrines 40 fois supérieure à celle de souris saines et une accumulation de porphyrines au niveau du foie.

2- Porphyrie hépato-érythropoïétique

La mutation *yquem* du Poisson-zèbre

La porphyrie hépato-érythropoïétique est très rare chez l'Homme et correspond à des cas homozygotes de porphyrie cutanée. Le déficit en URO-D est de plus de 70% alors qu'il n'est que de 50% environ dans la porphyrie cutanée familiale. Le seul modèle animal disponible est la mutation *yquem* du Poisson-zèbre (*Danio rerio*), obtenue après mutagenèse chimique à l'éthynitrosourée (ENU), un puissant agent alkylant largement utilisé chez le Poisson-zèbre et surtout la souris pour produire à haute fréquence de nouvelles mutations (51, 93). Il s'agit d'une mutation ponctuelle (M38R) dans le gène URO-D (122). Les poissons hétérozygotes pour la mutation ne présentent pas de phénotype. Les poissons homozygotes pour la mutation meurent à l'état embryonnaire d'une destruction photo-induite de leurs cellules sanguines devenues auto-fluorescentes suite à l'accumulation de porphyrine dans leur cytoplasme. L'activité enzymatique de l'URO-D est réduite de 64% chez les homozygotes et de 33% chez les hétérozygotes. Les porphyrines retrouvées en majorité dans le corps des homozygotes sont l'uroporphyrinogène I et III ainsi que la 7-carboxylate porphyrine. Il est nécessaire de souligner l'intérêt des poissons hétérozygotes pour la mutation, qui ne présentent pas le phénotype porphyrique mais dont l'activité enzymatique résiduelle de l'URO-D n'est que de 67%. Ils peuvent être très utiles à l'étude des interactions gène-environnement si importantes dans la porphyrie cutanée familiale.

3- Porphyrie aiguë intermittente

La mutation *Pbgd deficiency* de la Souris

Afin de mieux comprendre la survenue des crises de porphyries lors de porphyrie aiguë intermittente chez l'Homme, un modèle de la maladie a été développé chez la Souris (73).

Le gène PBGD (porphobilinogène désaminase) a été inactivé par recombinaison homologue en insérant dans le troisième exon du gène une séquence exogène contenant le gène *neo*. Les souris hétérozygotes pour la mutation présentent les caractéristiques biochimiques typiques de la maladie : diminution de l'activité de l'enzyme PBGD, augmentation de l'activité de la delta-acide aminolévulinique synthétase et excrétion urinaire massive d'acide delta-aminolévulinique après traitement avec une substance inductrice de l'ALA-synthétase, telle que le phénobarbital. Les tests comportementaux ont révélé une diminution de l'activité motrice des souris. L'histologie a permis de mettre en évidence une neuropathie d'origine axonale associée à une atrophie musculaire d'origine nerveuse (72, 73).

4- Porphyrie variegata

La mutation R59W PPOX de la Souris

La porphyrie variegata est une maladie génétique autosomique dominante très rare (prévalence de l'ordre de 0,5 pour 100000 personnes en Grande Bretagne), excepté en Afrique du Sud où elle représente l'une des maladies génétiques les plus fréquentes parmi les immigrants européens (prévalence de l'ordre de 6 pour 1000 personnes). Il semblerait que tous les malades descendent d'un ancêtre commun, une femme hollandaise émigrée en 1688 et porteuse de la mutation R59W dans le gène de la protoporphyrinogène oxydase. Cette mutation ponctuelle (C vers T) transforme une arginine en tryptophane en position 59 dans la protéine (31).

Grâce à la technique de mutagenèse ciblée par recombinaison homologue, un modèle de porphyrie variegata a été obtenu chez la Souris de laboratoire. La mutation humaine R59W a été insérée dans le gène de la protoporphyrinogène oxydase de la Souris. La mutation, tout d'abord introduite dans le génome d'une souris 129/Sv a par la suite été transférée par croisements successifs dans le fonds génétique C57BL/6. L'activité de l'enzyme dans le foie des souris hétérozygotes pour la mutation est d'environ 50% de la normale. Les urines et les fèces contiennent d'importantes quantités de précurseurs de l'hème, tout comme chez l'Homme, en phase quiescente de la maladie. Lorsque les souris reçoivent un régime supplémenté en acide aminolévulinique, il est possible de mimer le profil d'excrétion des porphyrines observé chez l'Homme lors des crises aiguës de porphyrie variegata (80).

5- Porphyrine érythropoïétique congénitale

La Souris

Bien qu'annoncé depuis plusieurs années, il n'existe pas encore, chez la Souris, de modèle de la maladie de Günther (27, 90).

6- Protoporphyrine érythropoïétique

a-La mutation *dracula* du Poisson-zèbre

Un modèle de protoporphyrine érythropoïétique a été identifié chez le Poisson-zèbre suite à une expérience de mutagenèse à l'ENU (123). Les animaux homozygotes pour une mutation d'épissage dans le gène de la ferrochélatase présentent une hémolyse induite par la lumière, une hépatopathie et une accumulation intense de protoporphyrine IX dans tous les tissus (17).

b-La mutation *ferrochelata*se deficiency de la Souris

En 1991 est décrite pour la première fois une mutation dans le gène de la ferrochélatase chez la Souris de laboratoire. Cette mutation, baptisée *ferrochelata*se deficiency, symbole *Fech*^{*mIPas*}, (notée *f* dans la suite du texte) est apparue lors d'un programme de mutagenèse chimique à l'éthylnitrosourée (ENU) conduit dans l'Unité de Génétique de Mammifères de l'Institut Pasteur de Paris dirigée par le Dr Jean-Louis Guénet.

b-1-L'expérience de mutagenèse

Des mâles d'une lignée consanguine, homozygotes pour huit mutations récessives de couleur de pelage, ont été mutagénisés par injection intra-péritonéale d'éthylnitrosourée à la dose de 250 mg/kg (Sigma Chemical C.O. St Louis MO). Ces mâles ont été accouplés avec des femelles des lignées consanguines 129/Sv et BALB/c pour produire une série de pedigrees indépendants. Les descendants mâles de ces croisements, hétérozygotes pour certaines des mutations récessives induites chez les individus mutagénisés, ont été accouplés à leur tour avec des femelles de la lignées BALB/c (albinos), puis avec plusieurs de leurs filles issues de ces croisements, dans le but de produire des individus homozygotes pour l'une ou l'autre des mutations induites.

b-2-La découverte de la mutation

L'un de ces croisements en retour a produit un jour une portée de dix souriceaux dont trois présentaient une pigmentation jaune des oreilles, du sérum et des urines. La coloration jaune discrète des oreilles, détectable grâce à l'absence de pigmentation de ces souris albinos, serait peut être passée inaperçue si ces souris n'avaient pas fait l'objet d'une étude sérologique systématique en vue de rechercher de nouveaux phénotypes mutants. La préparation du sérum mit en évidence une coloration jaune-orangée intense chez ces trois individus (121).

Afin de déterminer si cette anomalie était héritable les individus atteints ont été croisés avec des souris BALB/c de phénotype normal. Tous les individus F1 obtenus ont présenté un phénotype normal. Les F1 accouplés entre eux ont produit des individus F2, mâles et femelles, dont environ 25% ont présenté une coloration jaunes des oreilles, du sérum et des urines. Les 75% restants avaient un phénotype normal. Ces observations et ces proportions étaient compatibles avec un mode de transmission autosomique récessif.

Par la suite, des croisements répétés avec la lignée consanguine BALB/c furent réalisés dans le but d'avoir une colonie sur un fonds génétique proche de cette lignée albinos très commune.

La mutation est encore entretenue dans l'Unité de Génétique des Mammifères par des croisements frère-sœur stricts entre hétérozygotes $+/f$.

b-3-Phénotype de la mutation ferrochelatase deficiency

Le phénotype de la mutation a été initialement décrit en 1991 par Tutois et collaborateurs (120).

Clinique :

Les individus homozygotes ff présentent un sérum de couleur jaune intense et des urines également très colorées. Cette coloration du sérum est suffisamment intense et spécifique pour permettre d'identifier les homozygotes sur la base de ce seul critère.

L'ictère est visible chez les souris non pigmentées, au niveau des oreilles, des pattes et des parties génitales (figure 6). Les individus homozygotes exposés, dans les conditions d'élevage standard, à la lumière de tubes fluorescents, développent souvent des lésions de photosensibilité, inflammatoires voire ulcéreuses sur le dos et les oreilles.

Dans la description originale, les jeunes homozygotes *ff* ne présentaient aucune différence de taille ou de poids comparés aux souriceaux sauvages de la même portée. Ils ne présentaient pas non plus de retard de croissance.

Les caractéristiques ont évoluées au cours des générations et les homozygotes présentent actuellement un retard de croissance significatif.

La fertilité est réduite dans les deux sexes.

Les animaux de plus de trois mois présentent une dilatation abdominale importante (figure 6). Le foie, de très grande taille, fortement pigmenté en brun-noir est visible par transparence à travers la paroi abdominale.

A l'autopsie on observe un foie et une rate hypertrophiés. Dans la description originale du phénotype, le poids du foie représentait $7,36 \% \pm 2,84$ (moyenne \pm erreur standard) du poids du corps pour les homozygotes alors qu'il n'atteignait que $4,39 \% \pm 0,06$ chez les hétérozygotes. Le poids de la rate représentait $1,29 \% \pm 0,07$ du poids corporel pour les homozygotes alors qu'il n'était que de $0,79 \% \pm 0,03$ chez les hétérozygotes. Ces différences sont statistiquement significatives à respectivement $p < 0.001$ et $p < 0.01$ pour 6 souris homozygotes et 7 souris hétérozygotes analysées.

Les hétérozygotes présentent parfois un léger ictère à trois semaines, il disparaît à l'âge adulte; ils ne sont pas photosensibles et leur sérum, leur foie et leur rate sont normaux.

Figure 6 : Photographie d'une souris homozygote *ff* mâle âgée de 4 mois



Hématologie :

Les animaux homozygotes *ff* présentent une anémie normocytaire, hypochrome, régénérative avec un taux élevé de réticulocytes (14% chez les homozygotes *ff* contre 3% chez les hétérozygotes *+f* et les souris normales *+/+*). Les érythrocytes sont hétérogènes en taille (anisocytose) et ont une densité moyenne inférieure à la normale.

Biochimie :

Les animaux *f/f* ont un taux de bilirubine totale plasmatique très élevé comparé à celui des témoins *+/+* ($137 \pm 54 \mu\text{mol/l}$ pour les homozygotes *f/f* contre $2,33 \pm 0,52 \mu\text{mol/l}$ pour les hétérozygotes).

Les phosphatases alcalines (PAL) ainsi que les transaminases hépatiques (ALAT et ASAT) ont des taux également très élevés chez les mutants.

Le taux de protoporphyrine IX est augmenté dans les érythrocytes, le plasma, le foie, les fèces.

Le niveau d'activité résiduel de la ferrocélatase est d'environ 50% chez les hétérozygotes *+/f* et de 2,7 à 6,3% chez les homozygotes *f/f* dans la rate.

Histologie :

L'examen histologique de la rate et de la moelle osseuse révèle une hyperplasie érythroïde.

Le foie présente une fibrose portale et périportale sans modification notable de la morphologie des hépatocytes, ainsi qu'une accumulation intense de pigment brun dans les hépatocytes, les cellules de Küpffer, les canalicules et les canaux biliaires. Certains espaces portes sont infiltrés par des cellules mononucléées.

Physiopathologie :

L'ictère et la coloration jaune du sérum s'expliquent par l'accumulation de protoporphyrine dans le foie qui conduit à un dysfonctionnement hépatobiliaire sévère. La protoporphyrine libérée dans la circulation sanguine après la destruction des érythrocytes qui en sont surchargés est éliminée par le foie, en partie sous forme de bilirubine et en partie sous forme native, dans la bile. Les capacités d'élimination du foie sont rapidement dépassées. La protoporphyrine insoluble s'accumule alors dans le foie et précipite sous forme de cristaux dans les canaux biliaires, conduisant au développement d'un ictère post-hépatique. Un ictère hépatique survient par toxicité hépatocytaire du pigment. Le foie ne peut plus assurer, entre autres, l'élimination de la bilirubine qui s'accumule et colore en jaune tous les tissus. La teneur élevée en sels biliaires et en protoporphyrine de la bile des souris *f/f* pourrait expliquer la fibrose biliaire observée (81).

La rate est augmentée en taille suite à une hyperplasie érythroïde et probablement à la destruction accélérée des hématies dont la membrane est fragilisée par l'accumulation de protoporphyrine.

Cette hémolyse accrue est responsable d'une anémie normocytaire avec taux de réticulocytes élevé.

La baisse de fertilité semble plus être due au mauvais état général des animaux plutôt qu'à une toxicité spécifique du pigment.

Les troubles de la photosensibilité sont dus à l'accumulation de protoporphyrine dans le plasma et au niveau de la peau. La protoporphyrine est fluorescente et absorbe la lumière grâce aux doubles liaisons de sa structure. Les mécanismes de la phototoxicité passent vraisemblablement par la formation d'oxygène singulet, forme active de l'oxygène moléculaire capable de provoquer de nombreuses lésions intracellulaires par l'intermédiaire de processus de peroxydation (16).

Enfin, le dysfonctionnement hépatique est responsable d'un dérèglement du métabolisme des lipides conduisant à une hyperlipidémie et au développement de lésions d'athérosclérose (6).

Analyse moléculaire :

En 1990 la séquence codante du gène de la ferrochélatase de la souris a été clonée et séquencée (115). L'ADNc du gène a été isolé d'une banque d'expression d'ADNc de cellules MEL (*mouse erythroleukemia cells*) par criblage avec un anticorps polyclonal dirigé contre l'enzyme. Cet ADNc s'étend sur 1260 paires de bases.

Le gène de structure de la ferrochélatase a été localisé par l'Unité de Génétique des Mammifères en région distale du chromosome 18 de la souris à l'aide d'un croisement interspécifique. Cette région est homologue à celle du chromosome 18 de l'homme dans laquelle le gène humain avait été localisé.

En séquençant l'ADNc de souris homozygotes pour la mutation, Boulechfar et collaborateurs ont identifié, en 1993, une substitution T→A au nucléotide 293, dans le gène codant pour la ferrochélatase. Elle entraîne le remplacement d'une méthionine par une lysine en position 98 dans la protéine (12). Cette transversion est responsable de la diminution de l'activité de la ferrochélatase chez les souris *ferrochelatase deficiency* (12). Cette mutation supprime un site de restriction de l'enzyme BspHI (5'-TCATGA-3') ce qui a permis le développement d'un test de génotypage pour l'identification des animaux +/+, +/f et f/f. Un fragment d'ADN entourant ce site est amplifié par PCR à l'aide d'oligonucléotides spécifiques. Le produit d'amplification est ensuite digéré par l'enzyme BspHI. Seuls les fragments issus de l'amplification de l'allèle non muté sont digérés.

En 1999, Taketani et collaborateurs ont décrit la structure et la régulation transcriptionnelle du gène codant pour la ferrochélatase de la souris (114). Le gène s'étend sur 25 kilobases (kb) et comporte 11 exons et 10 introns.

L'exon 1 comporte la région 5' non traduite et les 23 premiers codons codants pour les 23 premiers acides aminés. L'exon 11 code pour les 10 derniers acides aminés et comporte la totalité de la région 3' non traduite. Les introns varient en taille de 0,4 à 4,5 kb. La structure générale du gène de la ferrochélatase de souris est très similaire à celle du gène de la ferrochélatase humaine.

Thérapeutique :

Thérapie cellulaire :

L'une des solutions envisagées pour traiter la protoporphyrie érythropoïétique chez la Souris, en vue d'applications futures chez l'Homme, est la greffe de moelle de souris normales à des souris mutantes. En effet, l'excès de précurseur de l'hème qui s'accumule dans cette porphyrie érythropoïétique provient majoritairement des érythrocytes, contrairement à ce qui se produit dans les porphyries hépatiques où le site prépondérant de production de porphyrines est le foie. La greffe hépatique, solution ultime chez les patients ayant déclaré une insuffisance hépatique n'est qu'un palliatif temporaire. Le traitement idéal consisterait en une greffe hépatique couplée à une greffe de moelle. Cependant la faisabilité des greffes de moelle, chez l'Homme, dépend en grande partie de la disponibilité d'un donneur histo compatible. Le bénéfice potentiel des greffes de moelle dans le cas de protoporphyrie érythropoïétique devait être testé dans un animal modèle.

Des expériences préliminaires non publiées, réalisées en 1993 en collaboration entre l'Unité de Génétique des Mammifères, le laboratoire d'Hématologie de l'Hôpital Henri Mondor et le Centre Français des Porphyries, indiquaient qu'une greffe de cellules de moelle osseuse normales permettait de réduire les anomalies hématologiques et biochimiques de souris homozygotes âgées de deux mois sans pourtant améliorer les anomalies histologiques du foie, qui s'installent très précocement.

En l'an 2000, Fontanellas et collaborateurs ont montré l'efficacité d'une telle greffe chez la souris *ferrochelatase deficiency* (37). La greffe de moelle osseuse de souris +/+ à des souris *ff* âgées de 21 à 28 jours, préalablement irradiées à une dose létale, permet une diminution significative du taux de protoporphyrine érythrocytaire. Lorsque la greffe est effectuée chez de jeunes souris, elle permet de plus d'éviter les complications hépatobiliaires et de diminuer l'accumulation de la protoporphyrine dans le foie (37).

Thérapie génique :

L'utilisation de la greffe de moelle chez des patients protoporphyriques, à risque de décompensation hépatique, est limitée par la compatibilité tissulaire entre donneur et receveur (système HLA). En l'absence de donneur compatible, la correction du défaut génique de la ferrocélatase dans les cellules souches hématopoïétiques pourrait être une solution.

On entre alors dans le domaine de la thérapie génique qui consiste à utiliser l'ADN comme un médicament. Il existe deux types de thérapie génique : la thérapie génique germinale qui vise à introduire une modification génétique transmissible aux générations suivantes, et la thérapie génique somatique dont l'objectif est de corriger un défaut moléculaire dans certaines ou dans toutes les cellules somatiques d'un individu.

Deux méthodes sont envisageables pour pratiquer une thérapie génique germinale.

La première consiste à introduire la modification dans toutes les cellules d'un embryon très précoce du développement, voire dans l'unique cellule de l'œuf fécondé. Dans ce cas la modification se retrouvera dans toutes les cellules de l'organisme. Chez l'animal, cette approche dénommée transgénèse est couramment pratiquée. Elle permet d'obtenir des modèles animaux de maladies humaines, de créer des animaux produisant des substances d'intérêt biologique ou est utilisée pour étudier le rôle ou la fonction de certains gènes. La transgénèse consiste à ajouter un segment d'ADN au patrimoine génétique d'un organisme en l'insérant soit au hasard dans les chromosomes, soit à sa place normale, en remplacement du gène dont l'altération est responsable de la maladie.

La seconde forme de thérapie génique germinale consisterait, dans un organisme formé, à intégrer un gène spécifiquement dans les cellules germinales. Il n'existe actuellement aucun moyen de parvenir à ce résultat.

En résumé, dans l'état actuel des connaissances, la thérapie génique germinale ne s'applique pas à l'Homme.

La thérapie génique somatique consiste à introduire les modifications génétiques, dont on espère qu'elles seront curatives, dans les cellules somatiques d'un organisme constitué, sans modifier ses cellules germinales. Le changement génétique produit ne sera pas transmis aux générations suivantes. Selon le type d'affection en cause deux approches sont possibles :

- administration *in vivo* d'un vecteur contenant le gène d'intérêt requis dans le cas où l'affection altère un organe dont il est difficile de prélever ou réinjecter un grand nombre de cellules, ou lorsque l'affection s'exprime au niveau de plusieurs types cellulaires ou tissus ;

- greffe de cellules génétiquement modifiées : il s'agit d'une auto-greffe de cellules génétiquement modifiées en dehors de l'organisme. Les cellules de l'organe atteint sont prélevées chez le malade, traitées *ex vivo* par introduction d'un gène fonctionnel corrigeant le défaut génétique, puis réinjectées au patient. En réalisant une autogreffe on évite le rejet du greffon par l'hôte, ou plus grave, le rejet de l'hôte par le greffon dans le cas d'une greffe de moelle osseuse.

Cette approche est applicable aux cellules de la moelle osseuse, peut être du foie, des vaisseaux, de la peau et du muscle. Elle connaîtra certainement des développements importants grâce aux cellules souches adultes.

Dans le syndrome protoporphyrine érythropoïétique chez la Souris, il est possible de distinguer un phénotype irréversible, l'atteinte hépatique et un phénotype réversible, la photosensibilité et l'élévation du taux de protoporphyrine dans le sang (globules rouges et plasma). La greffe de cellules souches hématopoïétiques provenant de souris mâles *ff*, protoporphyriniques, transfectées avec un rétrovirus exprimant la ferrochélatase humaine, à des souris *ff*, protoporphyriniques, a permis de guérir totalement les deux caractéristiques du phénotype réversible (87). Pour enrichir la population de cellules injectées en cellules ayant intégré le rétrovirus, les auteurs ont utilisé un rétrovirus dans lequel ils avaient introduit le gène de la ferrochélatase et le gène codant pour une protéine fluorescente (*Green Fluorescent Protein* ou GFP). En sélectionnant, avant injection, les cellules fluorescentes par cytométrie en flux, ils ont sélectionné les cellules possédant le gène de la ferrochélatase.

Pour présélectionner les cellules souches hématopoïétiques déficientes transfectées avec une construction rétrovirale exprimant uniquement le gène de la ferrochélatase humaine, l'équipe de Fontanellas et collaborateurs a utilisé la fluorescence de la protoporphyrine IX. Soumise à une lumière de longueur d'onde comprise entre 340 et 360 nm, la protoporphyrine IX émet une fluorescence rouge aux environs de 675 nm. Les cellules portant la construction rétrovirale ont pu être sélectionnées par cytométrie en flux grâce à leur faible fluorescence comparées à celle des cellules déficientes en ferrochélatase ayant accumulé de la protoporphyrine. Ils sont ainsi parvenus à corriger le phénotype réversible de la protoporphyrine de la souris *Fech^{mIPas}* et à améliorer le phénotype hépatique (36).

Enfin, toujours en 2001, la même équipe a réussi à reproduire ce résultat, sans présélection des cellules injectées. Les cellules souches ont été transfectées avec un vecteur lentiviral exprimant la ferrochélatase humaine sous le contrôle d'un promoteur spécifique de la lignée érythroïde (95).

Toutes ces approches permettent d'envisager, à long terme, l'application des techniques de thérapie génique chez des patients protoporphyriques présentant une photosensibilité sévère qui ne rétrocede pas aux thérapeutiques conventionnelles et aux patients présentant un fort taux de protoporphyrine qui les expose au risque de développer une atteinte hépatique très sévère.

Effet du fonds génétique

La mutation *ferrochelatase deficiency* est apparue dans un fonds génétique voisin de la lignée BALB/c et a été par la suite croisée en retour plusieurs fois sur cette lignée. Parallèlement aux expériences de thérapie cellulaire, une expérience de correction du phénotype par transgénèse a été entreprise (collaboration entre l'Unité de Génétique des Mammifères de l'Institut Pasteur et le laboratoire du Pr. B. Grandchamp de l'Hôpital Bichat, Paris). Des femelles F1 entre les lignées consanguines C57BL/6 et SJL/J ont été superovulées et accouplées avec des mâles homozygotes pour la mutation sur le fonds BALB/c. Les œufs produits, hétérozygotes pour la mutation, ont été injectés avec le gène de la ferrochélatase humaine sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire. Les souriceaux nés ont été croisés entre eux pour produire des individus homozygotes dont certains seraient transgéniques. Aucun des individus, transgéniques ou non et dont le statut homozygote pour la mutation avait été confirmé par génotypage, ne présentait le phénotype ictérique habituel. Du fait des croisements réalisés, ces souris possédaient en moyenne 50% de leurs allèles d'origine BALB/c, 25% d'origine C57BL/6 et 25% SJL/J. Ceci suggérait que des allèles provenant des lignées C57BL/6 et/ou de SJL/J avaient rendu le phénotype moins sévère que sur le fonds génétique BALB/c pur. Pour étudier l'influence de ces deux fonds génétiques, deux lignées congéniques pour la mutation *ferrochelatase deficiency* furent développées à partir des lignées C57BL/6 et SJL/J en réalisant dix croisements en retour [pour obtenir une pureté théorique de 99,9 % (108)].

c-Mutation induite par une délétion de l'exon 10 de la ferrochélatase, chez la Souris

En 1999, un deuxième modèle de protoporphyrie érythropoïétique a été créé chez la Souris sur un fonds génétique proche de C57BL/6. Par recombinaison homologue dans les cellules souches embryonnaires (ES), une délétion de l'exon 10, analogue à l'une des mutations retrouvées chez des patients humains a été introduite dans le gène de la ferrochélatase de souris.

Les souris hétérozygotes pour cette nouvelle mutation ont été croisées pour produire des individus normaux (+/+), hétérozygotes (+/-) et homozygotes (-/-). Les hétérozygotes +/- souffrent de photosensibilité mais pas de dommages hépatiques et aucun individu -/- viable n'a été obtenu, certainement à cause d'une létalité embryonnaire due à l'absence totale d'activité enzymatique (76, 77). Ce nouveau modèle de protoporphyrine érythropoïétique étend la gamme des phénotypes protoporphyriniques rencontrés chez les animaux.

Il est semblable en terme de pathologie au modèle bovin, mais reproduit le mode de transmission autosomique dominant de la pathologie humaine.

Ainsi, quatre modèles animaux de protoporphyrine érythropoïétique humaine existent à l'heure actuelle, qui permettent d'envisager des études génétiques, physiopathologiques et thérapeutiques, en vue d'améliorer le futur des patients protoporphyriniques (tableau 2).

Tableau 2
Comparaison des différents modèles de protoporphyrine érythropoïétique.

	Bovins Limousins	Souris <i>Fech^{m1Pas}</i>	Souris délétées pour l'exon 10	Zebrafish <i>dracula</i>	Homme
Transmission	AR	AR	AD	AR	AD*
Photosensibilité	+	+	+	+	+
Anémie	-	+	?	+	+
Complications hépatiques	-	+	-	+	+/-**
Nature de la mutation	Ponctuelle, suppression du codon stop	Ponctuelle	Délétion de l'exon 10	Ponctuelle dans un site d'épissage, codon stop prématuré	Plus de 60 mutations, voir annexe 1
Activité résiduelle de l'enzyme	5 à 20 %	3 à 7 %	37 %	?	15 à 35 %
Thérapie génique disponible	- sans intérêt	+	- possible mais pas encore faite	- possible mais pas encore faite	- possible, d Tf9

Cependant, bien que quatre modèles de protoporphyrie érythroïdique existent chez trois espèces animales, les bovins sont les seuls animaux à souffrir de protoporphyrie érythroïdique spontanée. Jusqu'en 1991, année de la découverte de la mutation *ferrochelatase deficiency* chez la Souris suite à une expérience de mutagenèse, ils sont demeurés le seul modèle animal disponible. Après 1991, la Souris s'est imposée comme le modèle de choix pour étudier la maladie. Facilité de manipulation, environnement contrôlable, temps de génération court, possibilité de réaliser des croisements à façon de taille théoriquement illimitée, en font un outil biologique irremplaçable. De plus, la souris protoporphyrique *Fech^{mIPas}* présente les symptômes hépatiques, que ne présentent ni les bovins ni la souris portant la délétion de l'exon 10 de la ferrochélatase, et qui font la gravité de la maladie chez l'Homme. En ce sens, elle demeure un modèle incontournable de la protoporphyrie érythroïdique humaine.

Une étude détaillée du phénotype de la mutation, dans les trois fonds génétiques, chez la Souris, était donc le préalable indispensable à toute étude génétique ou essai thérapeutique. Ce mémoire résume les résultats des analyses phénotypiques effectuées sur les souris *ferrochelatase deficiency* des trois fonds génétiques consanguins BALB/c, SJL/J et C57BL/6.

C- Fonds génétique et pathologie animale

Lorsque, chez l'Homme, le nombre de cas d'une même maladie, dans une famille est plus élevé que celui attendu, compte tenu de la fréquence de la maladie dans la population générale, les médecins parlent d'agrégation familiale. Cette agrégation familiale peut être la conséquence d'habitudes comportementales intrinsèques à chaque famille (alimentation, rites, tabagisme...), de facteurs de l'environnement particuliers (altitude, climat, proximité d'une source de toxiques...), d'un ou plusieurs allèles délétères qui ségrègent dans la famille (maladie génétique) ou encore de la combinaison de ces divers facteurs. Lorsque aucun facteur comportemental ou de l'environnement ne semble permettre d'expliquer une agrégation familiale, la recherche d'une composante génétique est justifiée.

Pour un nombre croissant de maladies génétiques à déterminisme monogénique, le gène responsable a été identifié. Ces maladies génétiques présentent des manifestations cliniques souvent graves pour le patient mais ne touchent qu'une toute petite fraction de la population générale (mucoviscidose, chorée de Huntington, myopathie de Duchenne...).

Cependant, la plupart des maladies communes (diabète, hypertension artérielle, schizophrénie...) présentent une agrégation familiale mais leur transmission ne suit pas les lois de Mendel. Ces maladies dues à la combinaison de facteurs génétiques, comportementaux et de l'environnement sont appelées maladies multifactorielles.

Il est cependant devenu rapidement évident, pour les généticiens, que des maladies monogéniques peuvent présenter un très grand nombre de phénotypes différents. En effet, pour une même maladie génétique, l'âge à l'apparition des symptômes ou bien la sévérité des symptômes peut varier d'un individu à l'autre. On parle alors d'expressivité variable du phénotype. Il peut aussi arriver que dans certaines maladies (par exemple l'otospongiose ou la cardiomyopathie hypertrophique chez l'Homme), des individus portant au locus causal le même génotype que des individus malades ne présentent aucun des symptômes caractéristiques de la maladie. Le généticien parle alors de pénétrance incomplète pour caractériser cette hétérogénéité. Parmi les diverses causes capables d'expliquer une pénétrance et/ou une expressivité variable du phénotype pour une maladie génétique mendélienne, on peut distinguer la présence de facteurs de l'environnement, la présence de plusieurs allèles au locus causal, ou bien la présence de gènes modificateurs de phénotype. La présence de plusieurs allèles au locus causal d'une maladie, appelée allélisme ou hétérogénéité génétique au locus a été incriminée dans nombre de maladies génétiques, chez l'homme (103, 111) et chez les animaux domestiques (20, 25) pour expliquer des différences de phénotype. Parfois même, la tâche du généticien se trouve compliquée car une seule entité nosologique regroupe des étiologies génétiques différentes [des mutations dans différents gènes produisent un même phénotype (1, 40)]. On parle alors d'hétérogénéité génétique.

L'existence de gènes modificateurs de phénotype est suspectée dès lors que des variations phénotypiques, entre membres d'une même famille, atteints d'une même maladie monogénique, ne peuvent pas être expliquées par une hétérogénéité génétique ou par l'effet de facteurs d'environnement. Un gène modificateur se définit comme un gène capable d'influencer l'expression phénotypique d'un autre gène, dont l'effet est majeur sur le phénotype étudié. L'effet phénotypique induit par l'interaction entre gènes non allèles est appelé épistasie. Un gène modificateur de phénotype représente donc un cas particulier d'épistasie. Cependant l'adjectif épistatique est souvent utilisé de façon restrictive pour désigner un allèle d'un gène capable de masquer l'expression des allèles d'un autre gène.

Un exemple classique d'épistasie est rencontré chez les gènes responsables de la couleur de la robe chez les animaux domestiques : chez les Labradors retrievers, trois couleurs de pelage coexistent : le sable, le chocolat et le noir. Deux allèles appelés *B* (*black*) et *b* (*brown*) d'un premier gène déterminent la couleur noir ou marron. Les animaux *B/B* ou *B/b* sont noirs et les animaux *b/b* sont chocolat. Un second gène, noté *E*, contrôle le dépôt du pigment dans le poil (allèle *E* dominant permettant le dépôt du pigment et *e* récessif ne le permettant pas). Ainsi quel que soit le génotype d'un chien au locus *B*, s'il est *e/e*, le pigment ne se dépose pas dans le poil et le chien est sable. Un autre exemple classique est la mutation albinos qui se traduit par une absence de synthèse de tout pigment : des animaux albinos sont systématiquement blancs, quel que soit leur génotype à d'autres locus contrôlant la pigmentation.

Une bonne illustration des gènes modificateurs selon la définition que nous en avons donnée et des méthodes d'analyse de ces gènes est l'exemple de la mutation *Min* (*multiple intestinal neoplasia*) de la Souris. Cette mutation semidominante a été découverte à la suite d'une expérience de mutagenèse à l'ENU (84). Les animaux hétérozygotes *Min/+* sur le fonds génétique de la lignée consanguine de laboratoire C57BL/6J développent de multiples adénomes sur la totalité du tractus intestinal. Le gène responsable de ce phénotype a été localisé sur le chromosome 18 de la souris (74). Il s'agit de l'homologue souris du gène APC humain (*Adenomatous Polyposis Coli*) qui, lorsqu'il est muté, est responsable du syndrome FAP (*Familial Adenomatous Polyposis*). La mutation siégeant dans le gène *Apc* de la souris *Min* a été identifiée en 1992 (113). En croisant des souris *Min/+* avec des lignées consanguines AKR et MA/MyJ, les auteurs se sont aperçus que l'effet de la mutation dépendait étroitement du fonds génétique des animaux. Les hybrides F1 *Min/+* obtenus par croisement entre un individu hétérozygote sur le fonds C57BL/6 et un individu des lignées AKR ou MA/MyJ présentent 5 fois moins de tumeurs intestinales que les souris C57BL/6 *Min/+* d'origine (30).

Pour localiser le ou les gènes modificateurs en cause, les auteurs ont réalisé un croisement en retour entre les lignées C57BL/6 (portant la mutation *Min*) et la lignée AKR ([C57BL/6 *Min/+* x AKR +/+]*F1* x C57BL/6 +/+). Ils ont observé que la plus grande partie de l'effet était contrôlée par un gène qu'ils ont pu localiser sur le chromosome 4 de la souris. Une cartographie fine de la région leur a permis de réduire la taille de l'intervalle chromosomique dans lequel se trouvait le gène modificateur. Néanmoins, cet intervalle contenait encore plusieurs gènes et il était difficile, en l'absence d'indices sur la fonction possible du gène modificateur, d'en retenir un plutôt qu'un autre.

Il s'agit là d'une difficulté importante dans l'étude des gènes modificateurs de phénotype. Dans la mesure où ils réalisent une modulation fine d'un caractère, il est difficile de formuler *a priori* des hypothèses sur leur nature et leur mode d'action. Il est toutefois logique de rechercher des gènes intervenant dans des voies de synthèse biochimique ou des processus de développement concernés par le gène principal dont ils modulent les effets.

Cette difficulté est encore une fois illustrée par m

Cette hypothèse n'est pourtant pas toujours vraie. En effet, la mutation mise en évidence dans le gène de la phospholipase A2, chez les souris présentant le plus grand nombre de tumeurs intestinales (fonds génétique C57BL/6), est une insertion d'un nucléotide dans l'exon 3 provoquant l'apparition d'un codon stop prématuré dans l'exon 4 du gène. Les deux transcrits résultant de cette modification génétique codent pour des protéines peu ou pas fonctionnelles. La présence d'une phospholipase A2 fonctionnelle en quantité normale réduit le nombre de tumeurs intestinales chez les souris *Min* alors que l'absence d'une activité de type phospholipase A2 n'a aucun effet sur la formation tumorale.

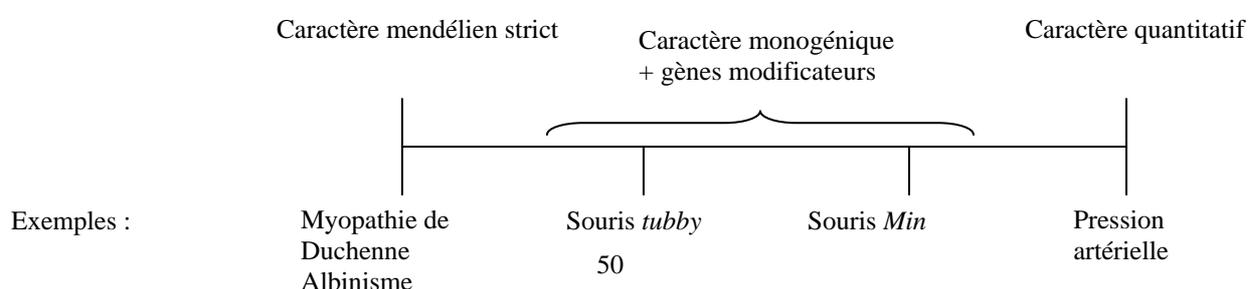
L'hétérogénéité clinique que l'on observe pour de nombreuses maladies à agrégation familiale chez l'Homme, ou lorsque l'on croise des animaux de fonds génétiques différents chez la Souris, nécessite d'avoir recours à des paramètres biologiques permettant de quantifier le phénotype. La mise en évidence d'une hétérogénéité clinique chez les souris *Min/+* a reposé sur une classification des individus non seulement en fonction de l'absence ou la présence de tumeurs mais selon le nombre de tumeurs intestinales observées. D'un caractère discret à deux modalités nous sommes passés à un caractère continu, quantifiable par une mesure. De la génétique mendélienne nous sommes passés à la génétique quantitative. En génétique quantitative il n'est plus possible de relier de façon univoque un phénotype à un génotype à un locus donné comme c'est le cas en génétique mendélienne. En effet, dans le cas des souris *Min*, le nombre de tumeurs intestinales est déterminé génétiquement par l'interaction de plusieurs gènes. Le phénotype ne s'explique pas par un gène causal mais par une association d'allèles. De nouveaux outils ont donc été développés par les généticiens pour analyser les caractères génétiques quantitatifs. Un caractère quantitatif possède des variations phénotypiques mesurables, dues à l'influence du génome et/ou de l'environnement. Les valeurs prises par le caractère quantitatif peuvent être discrètes comme c'est le cas pour le nombre de porcelets d'une portée de truie par exemple, ou continues comme dans le cas de la taille, du poids ou de la mesure de la pression artérielle. On définit par Quantitative Trait Locus (QTL) un locus génétique dont les allèles sont associés à des valeurs moyennes différentes du caractère quantitatif. En général un caractère quantitatif est gouverné par plusieurs QTL et par des facteurs de l'environnement. Il est donc possible de se trouver en présence d'un ou plusieurs QTL gouvernant un caractère quantitatif. L'environnement peut aussi influencer les variations du caractère quantitatif, seul, ou en interagissant avec le patrimoine génétique de l'individu. Chaque QTL a un effet plus ou moins fort sur le phénotype analysé.

Alors que certains QTL ne contrôlent que quelques pourcents de la variation phénotypique totale observée dans une population en ségrégation, d'autres ont un effet majeur et peuvent parfois apparaître comme des caractères mendéliens simples.

Un gène modificateur qui module quantitativement le phénotype d'un locus mendélien se comporte comme un QTL. Par exemple le gène *Mtap1*, modificateur du locus *tubby* chez la souris, est considéré comme un QTL (42, 56, 64). La mutation *tubby*, autosomique récessive, provoque obésité, surdité et dégénérescence rétinienne chez les souris *tub/tub*. La mutation a été localisée sur le chromosome 7 de la souris et le gène *tubby* code pour une protéine impliquée dans la survie et les fonctions du lignage cellulaire neuronal. Les capacités auditives des souris *tub/tub* mutantes peuvent être quantifiées par un test appelé ABER (*Auditory Brainstem Evoked Response*). A la faveur d'un croisement de type F2 entre des souris B6-*tub/tub* et des souris AKR-+/+ il est apparu que la distribution des réponses au test ABR, dans la population des souris F2 *tub/tub*, était continue. Un QTL responsable d'une part importante de cette variation phénotypique a été localisé sur le chromosome 2 de la souris. Au sein de ce locus, a été identifié le gène modificateur *Mtap1* dont les mutations sont responsables de la quasi-totalité des variations de la réponse au test ABR observées chez les souris *tubby*.

La distinction entre caractère mendélien simple et QTL n'est pas forcément cruciale dans la mesure où un QTL est un caractère mendélien mais son identification utilise des méthodes différentes. Dans la réalité, la classification du contrôle génétique des caractères suit un continuum (figure 7). A l'une des extrémités du spectre on trouve des maladies génétiques mendéliennes simples dont les deux phénotypes (sain ou malade) sont gouvernés par un unique gène. La relation phénotype-génotype est directe. A l'autre extrémité du spectre on trouve des caractères gouvernés par de multiples gènes ou QTL, chaque QTL participant pour une proportion variable dans l'expression du phénotype. Entre ces deux extrêmes se situent les caractères gouvernés par plus d'un gène (un gène majeur et des gènes modificateurs par exemple) et dont le phénotype présente des degrés variables. S'ajoute à cela la part de l'environnement qui est variable pour chaque affection étudiée.

Figure 7 : Classification des modes de contrôle génétiques des caractères



La mise en évidence de QTL, chez l'Homme et les animaux domestiques, reste très délicate à cause de l'interaction qui peut exister entre le ou les QTL recherchés, l'environnement et le patrimoine génétique de l'individu aussi appelé fonds génétique (55). S'il est possible de s'affranchir de l'influence de l'environnement chez les animaux domestiques en les élevant dans des conditions d'animalerie contrôlées, cela reste impossible chez l'Homme. D'autre part, l'information phénotypique n'est pas toujours disponible et les méioses ne sont pas toujours informatives. Enfin, chez les animaux domestiques, tout comme chez l'Homme, le généticien dispose d'arbres généalogiques plus ou moins étendus mais prédéterminés. Chez les animaux domestiques il reste toutefois possible de réaliser des croisements à façon afin d'enrichir le matériel disponible (schémas de croisements spécifiques chez les animaux de rente). Cependant, chez les espèces de grande taille, où l'intervalle entre générations est long, ce type d'étude est peu réalisé pour une question de temps. Plus l'intervalle entre générations et la durée de la gestation sont courts, plus les croisements peuvent être produits rapidement.

L'étude des gènes modificateurs de phénotype, bien que toujours longue et délicate, est toutefois plus simple dans des espèces modèles telles que le rat ou la souris et les conclusions que l'on peut tirer de ces études fournissent des pistes de recherche pour le généticien humain.

Au titre des atouts que présentent le Rat ou la Souris dans ce domaine précis, citons en particulier l'existence de nombreuses lignées consanguines, des cartes génétique et physique très riches et très précises, la possibilité de réaliser des croisements à façon de taille théoriquement illimitée, et la possibilité de transférer à volonté un segment de chromosome d'une lignée consanguine à une autre grâce aux lignées congéniques. Ajoutons enfin que les conditions d'élevage des rongeurs de laboratoire étant parfaitement standardisées, il est possible de s'affranchir des fluctuations liées aux paramètres d'environnement.

La recherche de QTL ou de gènes modificateurs de phénotype par une approche QTL repose sur l'observation d'une différence phénotypique pour le caractère étudié entre deux lignées de souris consanguines. Les souris étant consanguines et entretenues dans des conditions d'élevage identiques, toute différence phénotypique transmissible est susceptible d'être d'origine génétique. Soulignons toutefois qu'il existe une variation entre individus au sein d'une même lignée consanguine ou entre individus F1 entre deux lignées consanguines. Cette variation d'origine non génétique est appelée variation interindividuelle.

Dans le cas des gènes modificateurs, la différence intéresse le phénotype de la même mutation présente dans les deux lignées de souris, cette différence pouvant aussi apparaître à la faveur d'un croisement d'individus de la lignée mutante avec des individus d'un autre fonds génétique. A partir de cette observation, on réalise généralement un croisement de type *backcross* ou F2 entre les deux lignées. Un croisement de type *backcross* est réalisé en croisant un descendant F1 (issu de l'union entre un individu de la première lignée et un individu de la seconde lignée) avec un individu de l'une des lignées parentales. Un croisement de type F2 est réalisé en accouplant deux individus F1. Dans la population *backcross* ou F2, on observe une plus grande variabilité phénotypique entre les individus, qui reflète leur hétérogénéité génétique. Dans cette population *backcross* ou F2 le principe général de la détection de QTLs repose sur le test de différences phénotypiques entre classes d'individus selon l'origine grand-parentale de segments chromosomiques hérités d'un parent. Dans tous les cas les individus *backcross* ou F2 sont génotypés pour un jeu de marqueurs moléculaires répartis de façon homogène sur le génome.

L'analyse statistique repose sur deux méthodes principales qui utilisent toutes deux la comparaison des valeurs phénotypiques moyennes de groupes d'individus, chaque individu étant rangé dans un groupe en fonction de son génotype au marqueur considéré.

La méthode la plus simple pour analyser un croisement *backcross* ou F2 repose sur l'analyse de la variance au locus du marqueur. Dans un croisement *backcross*, à un locus donné, un individu possède un génotype qui ne peut être que de deux types : homozygote (type parental) ou hétérozygote. Pour chaque marqueur typé les individus sont groupés en deux catégories selon leur génotype et l'on compare les valeurs phénotypiques moyennes des deux groupes d'individus. Si celles-ci sont différentes, on conclut à la présence d'un QTL à proximité du marqueur analysé. Dans le cas d'une F2, les individus présentent l'un des trois génotypes possibles au locus marqueur et on teste l'effet du génotype à ce locus sur le caractère étudié par une analyse de la variance. L'intérêt de cette méthode d'analyse des marqueurs l'un après l'autre (« point par point ») est sa simplicité. En revanche, elle souffre de trois faiblesses. Premièrement la localisation du QTL n'est indiquée que par l'observation des marqueurs donnant une différence phénotypique la plus grande entre les groupes de génotypes. L'effet apparent du QTL au marqueur sera plus petit que l'effet réel du QTL si il existe une recombinaison entre le QTL et le marqueur. Deuxièmement les individus dont il manque un typage pour un marqueur doivent être éliminés. Troisièmement quand le QTL se trouve à grande distance de tous les marqueurs testés la puissance de la détection diminue.

Pour supprimer ces trois inconvénients la méthode d'*interval mapping* (cartographie d'intervalle) a été développée. Les marqueurs y sont considérés par couples définissant des intervalles successifs et l'analyse statistique permet d'extrapoler le génotype des animaux entre deux marqueurs et de maximiser la vraisemblance de présence d'un QTL dans l'intervalle étudié. De plus, cette méthode permet de tenir compte, dans l'analyse, des individus pour lesquels il manque des données de génotype. Cependant, ces deux approches ont d'abord été développées sous l'hypothèse de la présence d'un seul QTL et, le cas échéant en considérant comme hypothèse alternative l'absence de QTL liés aux marqueurs dont la transmission a été analysée. La présence de QTL liés ou situés sur des chromosomes différents a des conséquences négatives sur la robustesse et la puissance des méthodes de détection ne considérant qu'un seul QTL à la fois ainsi que sur la qualité des estimations des paramètres qui le caractérisent. Des méthodes multi-QTL ont donc été mises au point. Elles représentent des aménagements de la méthode d'*interval mapping* et prennent en compte les interférences qui peuvent émaner de la présence de plusieurs QTL liés ou non.

Une fois le/les QTL identifiés dans le croisement il reste à valider leur effet avant d'identifier le/les gène(s) et les mutations/polymorphismes responsables de l'effet phénotypique. Cette étape fait généralement appel à des lignées de souris particulières : les lignées congéniques.

Les lignées congéniques.

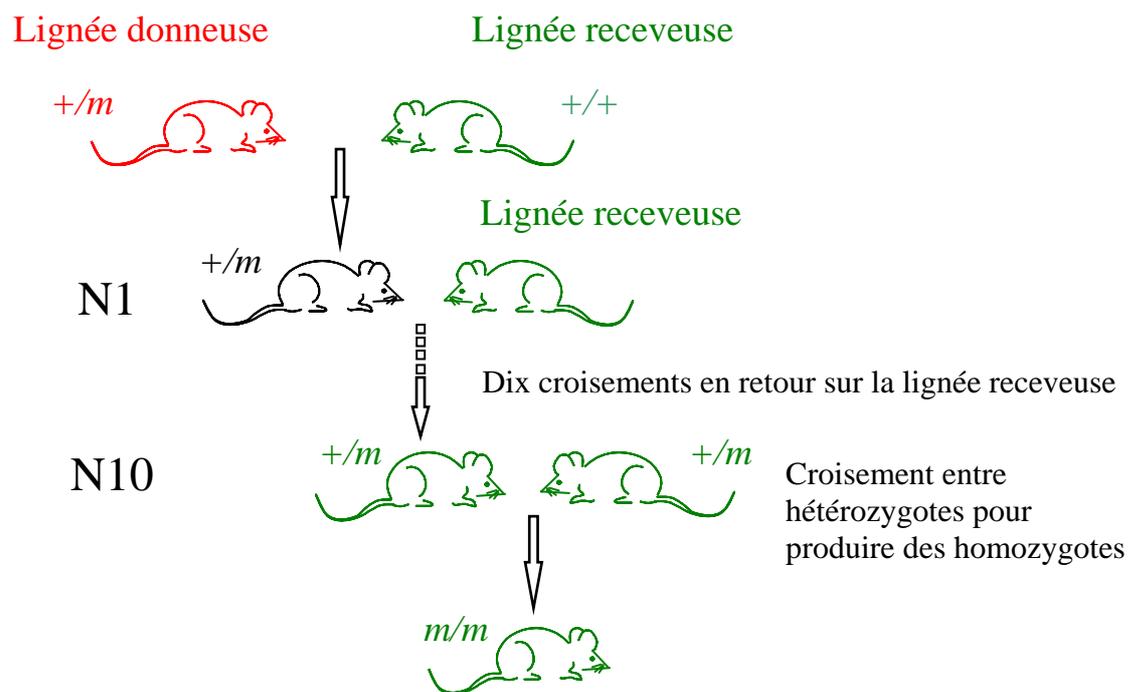
Il existe différentes raisons pour lesquelles on peut être conduit à transférer un segment de chromosome d'un fonds génétique à un autre, c'est-à-dire à établir des lignées congéniques. Lorsque l'on étudie l'effet d'une mutation, d'un transgène ou d'un QTL, pour éviter les fluctuations de phénotype liées à l'influence d'un fonds génétique hétérogène entre les individus, il est nécessaire que les groupes d'individus étudiés aient le même fonds génétique. On peut, au contraire, chercher à étudier l'effet d'une mutation, d'un transgène ou d'un QTL sur différents fonds génétiques. On peut enfin, vouloir confirmer la candidature d'un QTL ou d'un gène modificateur de phénotype en transférant le QTL de la lignée où s'exprime son effet à une lignée où il ne s'exprime pas ou bien, en ce qui concerne le gène modificateur, de la lignée présentant la mutation ou le polymorphisme à la lignée possédant un allèle de type sauvage.

Le transfert d'un allèle mutant, ou d'un transgène d'une lignée consanguine de souris à une autre est réalisé en croisant en retour de façon répétée des souris portant l'allèle mutant ou le transgène et la lignée consanguine dans laquelle cet allèle ou transgène doit être importé. La lignée de souris portant l'allèle ou le transgène à transférer est appelée donneuse et la lignée dans laquelle il doit être importé est appelée receveuse.

Le schéma de croisement utilisé pour créer une lignée congénique d'une autre dépend de la possibilité d'identification des hétérozygotes pour la mutation ou le transgène. Lorsqu'il est possible d'identifier les hétérozygotes parmi les individus F1 ou N1 produits par le croisement d'un individu de la lignée donneuse avec un individu de la lignée receveuse ceux-ci sont choisis pour produire la génération suivante (notée N2) en les croisant avec un individu de la lignée receveuse, et ainsi de suite (figure 8).

Dans le cas d'un transfert de QTL, on a recours à une sélection des hétérozygotes grâce à des marqueurs flanquant le locus. On utilise des marqueurs polymorphes entre les deux lignées consanguines de souris utilisées pour le schéma de croisement et encadrant au plus près le QTL.

Figure 8. Schéma de croisement utilisé pour obtenir des lignées congéniques : cas où il est possible d'identifier à chaque génération les individus hétérozygotes.



Création d'une lignée congénique par transfert de la mutation m de la lignée donneuse à la lignée receveuse à l'aide de 10 croisements en retour puis production d'individus homozygotes pour la mutation m grâce à un croisement frère-sœur.

Lorsqu'il est impossible d'identifier à chaque génération d'un croisement d'une souris homozygote de la lignée receveuse, obligatoirement, on doit pour produire une génération N1, que l'on croise à nouveau avec la lignée receveuse, et ainsi de suite pour la génération N2, et ainsi de suite.

Figure 9. Schéma de croisement d'une souris impossible d'identifier à chaque génération.

Lignée donneuse



Ces deux types de croisements comportent dix croisements en retour avec la lignée receveuse. Le nombre de croisements en retour est noté en le faisant précéder de la lettre N. A partir de N10, la lignée obtenue est dite congénique de la lignée receveuse. Par la suite il est possible de fixer le transgène, l'allèle mutant ou le QTL à l'état homozygote en croisant deux individus hétérozygotes entre eux et en croisant systématiquement les homozygotes obtenus entre eux. Ceci n'est bien sûr envisageable que si les homozygotes sont viables et fertiles. Dans le cas contraire on peut continuer de faire ségréger l'allèle normal et l'allèle mutant dans des individus hétérozygotes à chaque génération. Dans ce cas on choisit plutôt de poursuivre les croisements en retour avec la lignée receveuse.

Les lignées congéniques possèdent des propriétés génétiques particulières. Les individus issus du premier croisement entre la lignée donneuse et la lignée receveuse notés N1 ou F1 sont hétérozygotes à tous les locus du génome pour lesquels les deux lignées parentales portent des allèles différents. Dans le cas simple où tous les locus du génome sont dans ce cas, les individus N1 sont hétérozygotes à tous les locus de leur génome et la moitié de leur génome provient de la lignée donneuse, l'autre moitié de la lignée receveuse. Lors de la méiose, leurs gamètes haploïdes portent, à chaque locus, l'un des deux allèles. Cet assortiment d'allèles est différent d'un gamète à l'autre puisqu'il résulte à la fois d'un tirage au sort entre les deux exemplaires de chaque chromosome et de la recombinaison méiotique qui produit des échanges entre les deux chromosomes parentaux. Au total, chaque gamète de la génération N1 porte en moyenne l'un des allèles parentaux à la moitié des locus et l'autre allèle à l'autre moitié. Lors du croisement en retour, ce gamète féconde (ou est fécondé par) un gamète de la lignée receveuse et l'individu qui naît est hétérozygote à environ la moitié des locus du génome et homozygote pour l'allèle de la lignée receveuse à l'autre moitié. La proportion du génome de ces individus issu de la lignée donneuse est donc de 25 %. On choisit bien sûr des individus dans lesquels le locus à transférer est encore à l'état hétérozygote pour produire la génération suivante. De façon générale, au cours de l'établissement de la lignée congénique, le pourcentage global de génome provenant de la lignée donneuse est divisé par deux à chaque croisement avec la lignée receveuse et cette proportion de génome provenant de la lignée donneuse est égale à la moitié de la proportion des locus à l'état hétérozygote. Au bout de dix croisements en retour, le pourcentage de génome issu de la lignée donneuse atteint donc théoriquement $(1/2)^{10}$, soit environ 0,1 %. Ce pourcentage théorique ne prend pas en compte la liaison génétique.

En réalité, il est pratiquement certain que la lignée congénique ne porte plus aucun allèle de la lignée donneuse sur les chromosomes autres que celui qui porte le locus transféré ou le fragment de chromosome transféré. En revanche, du fait de la liaison génétique, les individus hétérozygotes pour le locus transféré, sélectionnés à chaque génération, sont également hétérozygotes aux locus situés à proximité du locus muté. Ce n'est donc pas un locus qui est transféré dans une lignée congénique, mais un segment chromosomique qui contient le locus sélectionné. La taille de ce segment n'est pas négligeable puisque, au bout de dix générations de croisements en retour, elle est en moyenne de 20 centimorgans – 40 mégabases chez la souris, soit environ 1,5 % du génome (figure 10).

Figure 10. Taille du segment de la lignée donneuse transféré chez la lignée receveuse (en cM) en fonction du nombre de croisements en retour (N), lors de la création d'une lignée congénique



Il faut environ trois ans pour réaliser les dix croisements en retour nécessaire pour atteindre le degré de pureté visé. Cependant, la puissance d'analyse qu'offrent les lignées congéniques ne peut être atteinte par aucune autre stratégie. En transférant l'intégralité de l'intervalle candidat identifié dans un croisement, on peut confirmer la présence d'un QTL en comparant le phénotype de la lignée receveuse avec celui de la lignée congénique. Pour affiner la localisation du QTL, on développe plusieurs lignées congéniques dont les segments transférés sont plus petits et partiellement chevauchants. En comparant le phénotype observé pour les différentes lignées, on peut assigner avec certitude le QTL à une région très petite et mettre parfois en évidence que l'effet phénotypique initialement attribué à un seul QTL résulte en réalité de la combinaison des effets individuels de plusieurs QTL très liés, en les individualisant dans des lignées congéniques différentes.

Les lignées congéniques constituent un outil incomparable pour étudier les effets individuels des QTL. Les caractères étudiés dans les analyses QTL chez la souris sont souvent des caractères globaux comme la plus ou moins grande sensibilité à un type de cancer, à l'hypertension, au diabète, etc. Chaque QTL possède cependant un effet discret sur un élément du processus physiopathologique, on parle alors de sous-phénotype. Grâce aux lignées congéniques, on peut étudier très finement l'effet de chaque QTL en comparant les caractéristiques de la lignée congénique et celles de la lignée receveuse. La possibilité de produire un nombre illimité d'animaux de génotype identique accroît la puissance de l'analyse et permet de multiplier les mesures.

De plus, une fois que l'effet individuel des QTL a été étudié, on peut croiser entre elles différentes lignées congéniques pour étudier la façon dont les interactions entre ces QTL se manifestent : effet additif ou épistatique.

Enfin, les lignées congéniques permettent de détecter des QTL à effet faible. Lorsqu'un QTL à effet majeur, c'est-à-dire qui explique une forte proportion de la variance phénotypique, ségrège dans un croisement, il est souvent difficile d'identifier d'autres QTL dont les effets sont plus faibles. Si deux lignées consanguines 1 et 2 diffèrent pour un QTL à effet majeur et que l'on souhaite rechercher d'autres QTL à effet plus faible différenciant ces deux lignées il suffit d'établir une lignée congénique en transférant, pour le QTL à effet majeur préalablement identifié, l'allèle provenant de la lignée parentale 1 vers le fonds génétique de la lignée parentale 2. Les deux lignées 1 et congénique de 2 pour l'allèle de 1 du QTL à effet majeur ne diffèrent plus pour le QTL à effet majeur, ce qui augmente la probabilité d'identifier des QTL à effet plus faible, lorsque l'on croise ces deux lignées.

Bien que le nombre de QTL identifiés pour toutes sortes de maladies complexes soit chaque jour plus important, peu de gènes correspondant à ces QTL ont été découverts. Jusqu'en 2001, sur plusieurs centaines de régions chromosomiques suspectées de contenir un QTL pour un caractère quantitatif chez les mammifères, seulement 29 ont permis l'identification d'un gène en cause (64). L'identification de ces gènes est bien plus difficile pour les maladies complexes que pour les caractères mendéliens simples. En effet ces maladies sont sujettes à une hétérogénéité génétique, à des phénomènes d'épistasie entre locus, à une pénétrance souvent faible, à une expressivité variable et le pouvoir des méthodes statistiques multi-QTL reste encore limité (42). Cependant l'amélioration des techniques moléculaires permettant de détecter du polymorphisme et facilitant la cartographie, la publication de la séquence du génome de la Souris et de l'Homme et le développement de nouveaux outils statistiques rendent ce type d'étude de plus en plus abordable. C'est pourquoi entre 1991 et 1998 seulement 8 gènes modificateurs ont été identifiés alors que 4 l'étaient en 1999, 7 en 2000 et 11 en 2001 (64). Si la route qui mène à la compréhension des maladies complexes est semée d'embûches, elle s'annonce néanmoins de plus en plus courte à mesure que les outils de la génétique se développent.

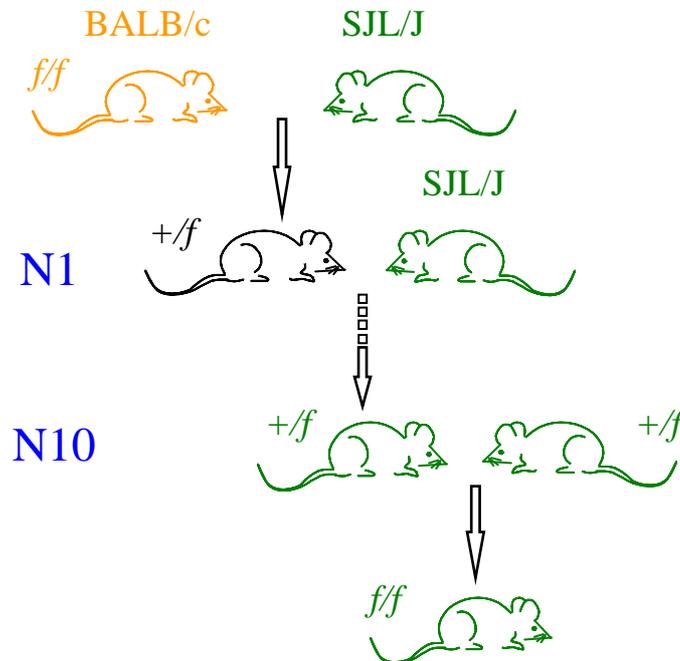
Matériel et méthodes

I- Les souris

La mutation *ferrochelatase deficiency* (symbole $Fech^{mIPas}$, f dans la suite du texte) est entretenue dans une lignée très proche de la lignée consanguine de laboratoire BALB/c. Nous avons produit deux lignées congéniques sur les fonds génétiques C57BL/6 et SJL/J, deux autres lignées consanguines de laboratoire très utilisées, par dix croisements en retour. A chaque génération, des mâles hétérozygotes pour la mutation ont été accouplés avec des femelles de l'une des deux lignées consanguines. Au bout de dix croisements en retour, des souris hétérozygotes ont été accouplées pour produire des homozygotes (figure 11). Les lignées ont ensuite été entretenues par croisements consanguins, soit entre souris hétérozygotes, soit entre une souris homozygote et une souris hétérozygote afin de garder, dans le même fonds génétique, l'allèle mutant et l'allèle sauvage au locus ferrochélatase. Les animaux sont entretenus dans des conditions d'animalerie standard : cages munies de capots filtrants, litière de copeaux de bois, alimentation et eau à volonté, éclairage artificiel 12 heures de jour et 12 heures de nuit, température comprise entre 20 et 24°C, changement complet de la litière une fois par semaine.

Nous avons réalisé les analyses sur des groupes de cinq souris, mâles et femelles mélangés. Pour chacun des trois fonds génétiques, quatre groupes d'âge ont été étudiés pour les génotypes $+/+$, $+/f$ et ff : 4-6 semaines, 11-12 semaines, 14-15 semaines et 6-8 mois. Seuls les résultats des souris âgées de 4-6 semaines et 6-8 mois seront présentés.

Figure 11. Obtention d'une lignée congénique de SJL/J pour le locus *ferrochelata* deficiency



II- Extraction de l'ADN

L'extrémité de la queue (environ 3 mm) est prélevée sur les souris âgées de trois semaines.

On y ajoute : -300µl de tampon PCR :

- 50mM KCl
- 10mM Tris-HCl (pH=8.3)
- 2,5mM MgCl₂-6H₂O
- 0,1mg/ml gélatine
- 0,45% v/v Nonidet P40
- 0,45% v/v Tween 20

-3µl de protéinase K à 20mg/ml dans H₂O

Les tissus sont digérés par incubation dans un vortex à 55°C pendant 4 heures. La protéinase K est dénaturée par chauffage à 100°C pendant 10 minutes. Une centrifugation à 10000 tours par minute pendant 10 minutes permet d'éliminer les fragments de tissus non digérés.

III- Génotypage

La mutation ponctuelle présente dans le gène de la ferrochélatase supprime un site de restriction pour l'enzyme *BspHI* (TCATGA→TCAAGA). Le génotype des souris au locus ferrochélatase (symbole *Fech*) a été déterminé en amplifiant par PCR une séquence de 100 paires de bases contenant le site de la mutation. J'ai réalisé les réactions de PCR sur l'ADN extrait d'un fragment de queue, à l'aide des amorces suivantes:

F: 5'-CGAAACCCTTGGAGAAGTTCAA -3'

R : 5'-TGTTTTGAATGGGAAGTGTC-3'

La taille attendue du produit est de 80 pb. Après digestion par *BspHI*, le produit d'un allèle normal est coupé en deux fragments de 57 et 23 pb.

Les conditions d'amplification étaient les suivantes: 2 minutes à 94°C, 35 cycles comportant 40 secondes à 94°C, 40 secondes à 55°C et 30 secondes à 72°C. La digestion du produit d'amplification a été réalisée en incubant à 37°C pendant 2 heures 10 µl du produit d'amplification, 1,2 µl de tampon de digestion, 0,5µl d'eau et 0,5 µl d'enzyme *BspHI*. Les fragments ont été visualisés en gel d'agarose 4% coloré au bromure d'éthidium.

Le segment de chromosome d'origine BALB/c contenant le locus *Fech* et conservé dans les lignées congéniques a été étudié à l'aide de marqueurs microsatellites *D18MitNNN* obtenus chez Research Genetics (Huntsville, AL) amplifiés selon le même protocole que précédemment.

IV- Hématologie

J'ai effectué les analyses hématologiques dans l'Unité de Génétique des Mammifères, Institut Pasteur, Paris, sur un automate SCIL VET'ABC® (SCIL animal care compagny GmbH, Viernheim Germany), sur 50 µl de sang total prélevé sur EDTA (10 mM). Les paramètres suivants ont été étudiés : nombre de globules rouges par ml, hématocrite, concentration en hémoglobine et volume globulaire moyen (VGM). La fluorescence des globules rouges, qui est un indicateur de leur teneur en protoporphyrine, a été évaluée par cytométrie en flux sur un Facscan® (Amersham, Little Chalfont Buckinghamshire United Kingdom), canaux FL2, FL3, sur sang total dilué dans du NaCl 0,9%.

V- Biochimie

Les analyses biochimiques ont été réalisées dans le Centre Français des Porphyrries de l'Hôpital Louis Mourier de Colombes (collaboration avec le Pr J.C. Deybach), sur 200 µl de sérum congelé prélevé sur héparine grâce à un automate Dimension®RxL (Dade Behring, Deerfield Illinois, USA). Les paramètres suivants ont été étudiés: bilirubine totale, phosphatases alcalines et transaminases hépatiques (aspartate amino transférase et alanine amino transférase). Les concentrations en protoporphyrine dans les érythrocytes et dans les selles ont été mesurées respectivement sur 100µl de culot érythrocytaire prélevé sur héparine, et 4 crottes grâce à une méthode adaptée de Poulos et collaborateurs (92).

VI- Enzymologie

J'ai dosé l'activité de la ferrochélatase dans le foie et la rate (conservés à -80°C) grâce à la détection fluorimétrique de la synthèse de mésoporphyrine-zinc, dans le Centre Français des Porphyrries, en suivant un protocole adapté de Li et collaborateurs (70).

VII- Histologie

J'ai prélevés et fixés dans du liquide de Tellyesniczky-Fekete pendant 36 heures puis conservé dans de l'éthanol à 70%, des échantillons de peau, de rate, de foie et de rein (94). Je les ai coupés et colorés (hémalin/éosine/safran), dans les laboratoires d'Anatomie Pathologique et Histologie et de Biologie Moléculaire de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort. Une seconde analyse des coupes a été réalisée en collaboration avec Florence Bernex du laboratoire d'Anatomie Pathologique et Histologie de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort en utilisant des colorations complémentaires de Perls (mise en évidence du fer) et de Hall (mise en évidence de la bilirubine).

VIII- Analyse statistique

Les paramètres dont la distribution des valeurs était gaussienne (vérification graphique de la distribution) nous ont permis de réaliser une analyse de la variance à l'aide du programme Stat View® (SAS Institute Inc.). Le degré de signification des tests statistiques est indiqué selon le code suivant :

ns : non significatif ; • : $0,01 < p \leq 0,05$; •• : $0,001 < p \leq 0,01$; ••• : $p \leq 0,001$.

Rapport-Gratuit.com

Résultats

I- Obtention de la lignée congénique sur fonds BALB/c

La mutation *ferrochelatase deficiency* est apparue chez des souris issues d'une expérience de mutagenèse à l'ENU réalisée sur des souris d'une lignée consanguine. Les premiers individus homozygotes ont été observés après que la colonie a fait l'objet de plusieurs croisements en retour avec la lignée BALB/c. Dans un premier temps, d'autres croisements en retour ont été effectués pour que la mutation se trouve sur un fonds génétique très proche de BALB/c. Après plus de dix croisements en retour, nous avons entretenu cette lignée congénique par des croisements consanguins.

II- Production et caractérisation des lignées congéniques sur les fonds C57BL/6 et SJL/J

Nous avons produit les deux lignées congéniques sur fonds génétiques C57BL/6 et SJL/J, à partir de la lignée congénique sur fonds BALB/c, par 10 croisements en retour sur ces deux fonds. Ces lignées congéniques diffèrent des lignées consanguines correspondantes par un segment de chromosome 18 contenant le locus *Fech* et dont la taille théorique moyenne devrait être d'environ 20 cM compte tenu du nombre de croisements effectués (108). Pour connaître la taille réelle de ce segment dans les deux lignées congéniques, j'ai caractérisé douze souris de chaque lignée (6 homozygotes et 6 hétérozygotes) pour plusieurs marqueurs microsatellites polymorphes entre BALB/c et C57BL/6 ou entre BALB/c et SJL/J. Les haplotypes des 18 chromosomes recombinants sont présentés dans les tableaux 3 (C57BL/6) et 4 (SJL/J). Dans la lignée sur fonds C57BL/6, la taille du segment congénique varie selon les souris entre 31 cM (haplotype I) et 48 cM (haplotype V). Dans la lignée du fonds SJL/J, elle varie entre 18 cM (haplotype I) et 47 cM (haplotype VI). Il s'agit de tailles maximales, déterminées à partir des positions des marqueurs microsatellites de génotype C57BL/6 et SJL/J qui bordent immédiatement le segment congénique.

Les variations dans la taille du segment issu de la lignée consanguine BALB/c, proviennent de ce que chaque lignée congénique de C57BL/6 ou SJL/J a été établie sous la forme de plusieurs familles plus ou moins indépendantes où les événements de recombinaison sont apparus de façon indépendante.

Tableau 3

Haplotypes au chromosome 18 de souris de la lignée C57BL/6

Marqueur	Position (MGD)	I	II	III	IV	V
<i>D18Mit67</i>	4	B	B	B	B	B
<i>D18Mit197</i>	6	B	B	B	*	C
<i>D18Mit111</i>	11	B	B	B	C	C
<i>D18Mit17</i>	20	C	B	C	C	C
<i>D18Mit123</i>	31	C	C	C	C	C
<i>D18Mit50</i>	41	C	C	C	C	C
<i>D18Mit9</i>	42	B	C	C	C	C
<i>D18Mit185</i>	43	B	C	C	C	C
<i>D18Mit186</i>	45	B	C	C	C	C
<i>D18Mit210</i>	47	B	C	C	C	C
<i>D18Mit189</i>	48	B	C	C	B	C
Fréquence		1/18	6/18	1/18	1/18	9/18

Légende : B : allèle de type C57BL/6, C : allèle de type BALB/c, S : allèle de type SJL/J, * : donnée manquante.

Tableau 4

Haplotypes au chromosome 18 de souris de la lignée SJL/J

Marqueur	Position (MGD)	I	II	III	IV	V	VI
<i>D18Mit197</i>	6	S	S	C	C	C	C
<i>D18Mit111</i>	11	S	S	C	C	C	C
<i>D18Mit17</i>	20	S	S	C	C	C	C
<i>D18Mit24</i>	25	S	C	C	C	C	C
<i>D18Mit9</i>	42	C	C	S	C	S	C
<i>D18Mit185</i>	43	S	S	S	S	C	C
<i>D18Mit210</i>	47	S	S	S	S	S	S
<i>D18Mit189</i>	48	S	S	S	S	S	S
Fréquence		7/18	4/18	1/18	4/18	1/18	1/18

Légende : B : allèle de type C57BL/6, C : allèle de type BALB/c, S : allèle de type SJL/J, * : donnée manquante.

III- Observations cliniques

L'effet du fonds génétique a été suspecté très tôt par l'observation d'une hétérogénéité clinique chez les animaux de fonds mélangé. Grâce aux lignées congéniques nous avons pu décrire précisément le phénotype de la mutation dans les trois fonds consanguins qui définissent ainsi trois variantes de ce modèle animal.

Dans les trois fonds génétiques, les souris homozygotes *f/f* présentent une coloration jaune intense du sérum et des urines. L'ictère est visible chez les souris albinos (BALB/c et SJL/J) à 4 semaines et, chez les souris BALB/c adultes, au niveau des oreilles, des membres et des parties génitales. Dans des conditions d'élevage standard (animaux sous éclairage artificiel fluorescent et cages munies de capots filtrants) je n'ai pas observé de lésions de photosensibilité. De telles lésions avaient été rapportées par Tutois et collaborateurs dans la description originale de la mutation à une époque où les cages n'étaient pas équipées de capots filtrants. Les souris homozygotes BALB/c présentent une alopecie discrète et diffuse. Une distension abdominale consécutive à une hépato-splénomégalie s'observe dès 11 semaines chez les souris BALB/c (foie visible par transparence) et C57BL/6, alors qu'elle peut passer inaperçue ou être très tardive chez les souris SJL/J. La fertilité est réduite dans les deux sexes chez les souris BALB/c et C57BL/6. A l'autopsie on observe une hépatomégalie et une splénomégalie dans les trois fonds génétiques. L'ictère est visible dans les trois fonds par une coloration jaune-orangée des muqueuses et du conjonctif sous cutané.

Il est cependant beaucoup plus marqué chez les souris de fonds BALB/c. Aucune autre lésion n'a été observée.

Les hétérozygotes *+/f*, dont la masse corporelle totale ne diffère pas significativement de celle des individus sauvages, présentent parfois à trois semaines un léger ictère visible chez les souris albinos qui disparaît à l'âge adulte. Ils ne présentent ni lésion de photosensibilisation, ni coloration anormale des urines. A l'autopsie la couleur du sérum, le foie et la rate sont normaux.

Sur les fonds BALB/c et C57BL/6, les souris *f/f* présentent un retard de croissance par rapport aux souris *+/f*, observable dès l'âge de 3 semaines (figure 12). La différence pondérale persiste rarement à l'âge adulte. Aucune différence significative n'est observée entre les souris *+/f* et les souris *+/+*. Les résultats pour les lignées BALB/c et C57BL/6 sont présentés dans le tableau 5.

A l'autopsie, le foie et la rate apparaissent hypertrophiés dans les trois fonds dès l'âge de 4 semaines, ainsi que le montrent le tableau 6 et la figure 13.

Tableau 5

Masse corporelle (en g) de souris de 4 semaines, issues de 4 portées: moyennes et écarts types

Lignée	+/+	+/ <i>f</i>	<i>f/f</i>	p (+/ <i>f</i> , <i>f/f</i>)
C57BL/6	10,2±4,30 (n=6)	12,9±3,90 (n=19)	8,00±1,50 (n=6)	••
BALB/c	10,9±1,25 (n=6)	12,0±1,10 (n=9)	7,58±1,16 (n=6)	•••

n : nombre d'individus pour chaque génotype

Tableau 6

Masse du foie et de la rate (moyennes et écarts types en g) de souris de 6 semaines

Fonds	Génotype	Foie	Rate	Poids total	Foie/total (%)	Rate/total (%)
BALB/c	+/+ (n=5)	1,41±0,21	0,10±0,01	19,6±1,71	7,30±1,70	0,52±0,08
	<i>f/f</i> (n=6)	1,37±0,52	0,25±0,07	14,56±4,04	9,20±1,30	1,74±0,14
	p				•	•••
C57BL/6	+/+ (n=8)	1,05±0,27	0,08±0,02	19,8±2,42	5,20±0,90	0,42±0,14
	<i>f/f</i> (n=7)	2,39±1,15	0,28±0,07	18,71±5,01	12,20±2,60	1,13±0,21
	p				•••	•••
SJL/J	+/+ (n=5)	1,19±0,17	0,08±0,01	18,4±1,54	6,40±0,50	0,43±0,09
	<i>f/f</i> (n=11)	2,22±0,55	0,27±0,06	19,80±3,90	11,1±1,10	1,17±0,29
	p				•••	••

n : nombre d'individus pour chaque groupe

• : 0,01 < p ≤ 0,05 ; •• : 0,001 < p ≤ 0,01 ; ••• : p ≤ 0,001

Figure 12 : Aspect macroscopique de souris hétérozygotes et homozygotes pour la mutation, issues des mêmes portées.



A : deux souris mâles BALB/c âgées de 4 semaines. B : deux souris mâles BALB/c âgées de 8 mois.

C : deux souris femelles C57BL/6 âgées de 4 semaines. Noter la différence de taille chez les souris de 4 semaines et la couleur jaune des oreilles chez les souris albinos *ff*.

Figure 13 : Deux souris femelles BALB/c (A) et SJL/J (B) âgées de 6 semaines



Noter l'hypertrophie hépatique et splénique chez les deux souris ainsi que la coloration jaune de la peau des oreilles et des extrémités des pattes, de la muqueuse orale et du conjonctif sous cutané, très marquée chez la souris BALB/c.

IV- Analyses hématologiques ,biochimiques et enzymatiques

L'ensemble des résultats des analyses pratiquées sur les souris de 4-6 semaines et de 6-8 mois est représenté graphiquement dans la figure 14. Ces données montrent que plusieurs paramètres sont affectés par la mutation de façon différente en fonction du fonds génétique. L'influence, sur chaque paramètre étudié, de plusieurs facteurs qualitatifs (génotype, fonds génétique, âge), pris isolément ou en interaction, a été testée par une analyse de la variance. Cette influence n'a pas pu être étudiée sur la concentration en protoporphyrine dans les hématies et dans les selles qui ne présentaient pas une distribution normale.

Figure 14 : Résultats (moyennes et erreurs standards) des analyses pratiquées sur les souris de 4-6 semaines et 6-8 mois

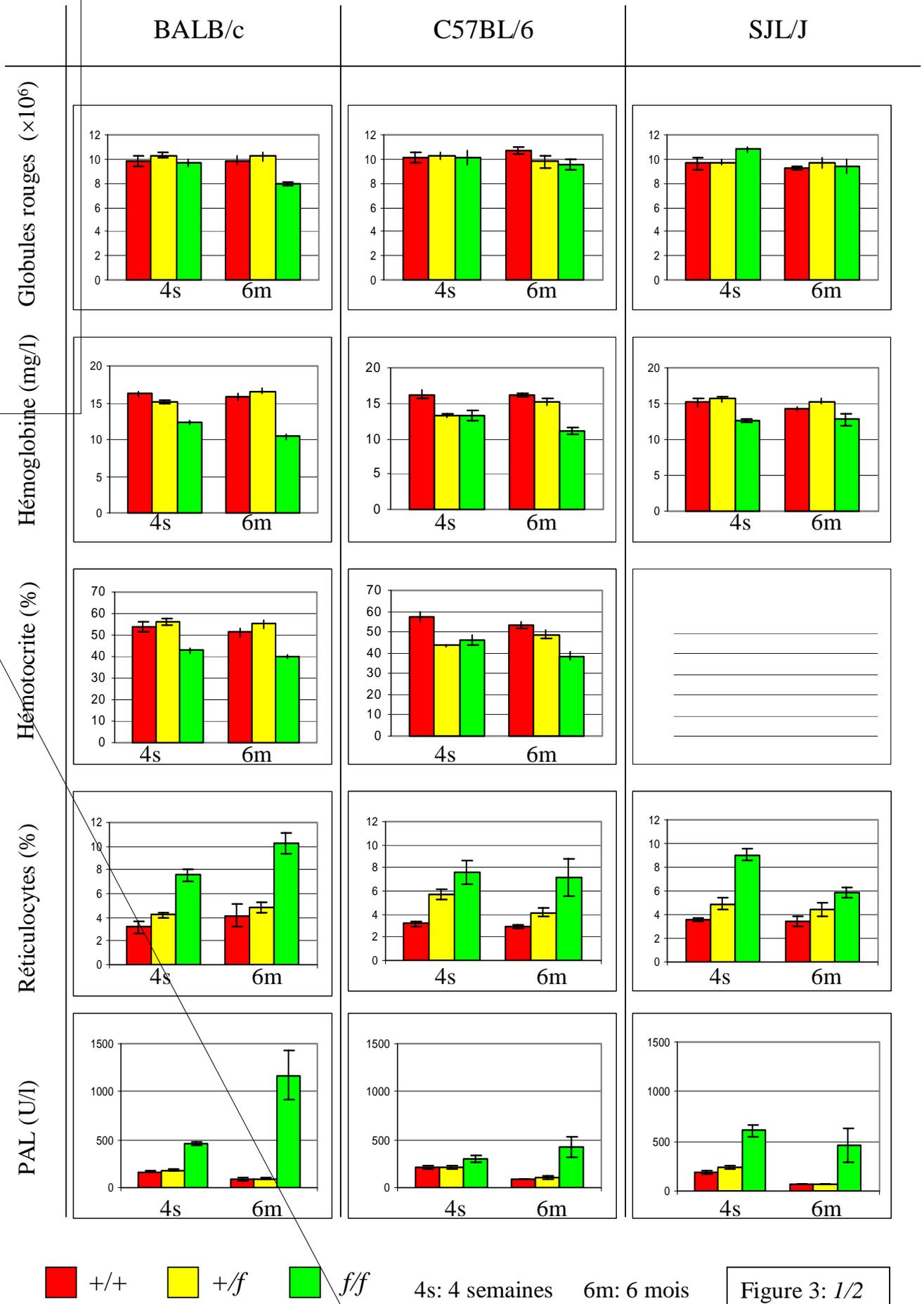
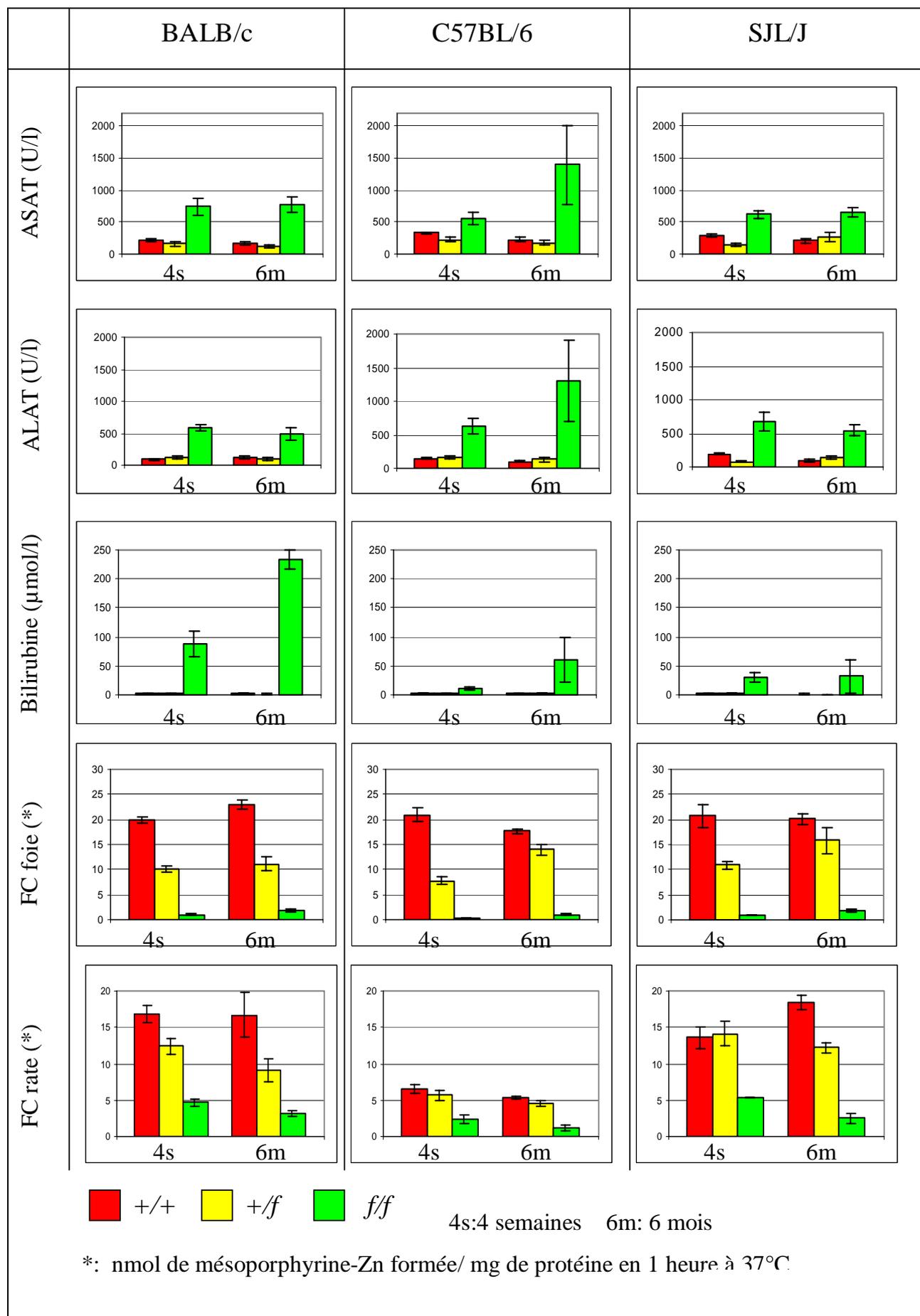


Figure 14 suite



A- Effet du génotype au locus *Fech* (tableaux 7 et 8)

Dans cette analyse de la variance nous avons testé l'effet du génotype (+/+ ; +/f ou f/f) sur les différents paramètres mesurés, pour les deux classes d'âge 4-6 semaines et 6-8 mois. Des comparaisons ont donc été effectuées entre les trois classes de génotype, pour chaque paramètre, chaque classe d'âge et chaque fonds génétique pris séparément.

D'une façon générale, les souris hétérozygotes présentent des valeurs peu différentes de celles des individus sauvages alors que celles des souris mutantes sont très altérées (figure 14). Chez les souris de 4-6 semaines, tous les paramètres étudiés varient en fonction du génotype, sauf le nombre de globules rouges dans les trois fonds, l'hématocrite chez les souris SJL/J et les PAL chez les souris C57BL/6. De plus, le degré de signification est toujours très bas : inférieur à 1% pour la moitié des comparaisons. Il semble donc que le génotype influence nettement la valeur des différents paramètres hématologiques et biochimiques chez les jeunes souris. En revanche le nombre de globules rouges, chez les jeunes animaux, ne varie pas en fonction du génotype. En ce qui concerne les PAL chez C57BL/6 les trois génotypes présentent des valeurs très peu différentes et l'écart type est important chez les souris f/f, ce qui explique que la différence entre génotypes ne soit pas statistiquement significative au seuil de 5%. Enfin, pour l'hématocrite chez SJL/J les deux génotypes +/+ et +/f présentent des valeurs similaires (respectivement $50,0 \pm 5,0$ et $50,0 \pm 3,8$) alors que les f/f présentent un hématocrite bien plus bas : $46,1 \pm 1,9$. Le peu de différence entre les +/+ et +/f ainsi que les grands écarts types permettent d'expliquer que la différence observée entre les trois génotypes ne soit pas statistiquement significative.

Tableau 7
Effet du génotype sur les paramètres hématologiques et biochimiques
chez des souris de 4-6 semaines

4-6 sem	GR	Hb	Ht	Rétic	PAL	ASAT	ALAT	BTS
BALB/c	ns	•••	•••	•••	•••	••	•••	••
C57BL/6	ns	••	•	••	ns	••	••	••
SJL/J	ns	•••	ns	•••	•••	•••	••	••

Légende : ns : non significatif ; • : $0,01 < p \leq 0,05$; •• : $0,001 < p \leq 0,01$; ••• : $p \leq 0,001$

Chez les animaux de 6-8 mois la situation est plus nuancée : dans le fonds BALB/c la valeur de tous les paramètres étudiés est affectée par le génotype des souris. Le nombre de globules rouges chez C57BL/6 et SJL/J ainsi que l'hématocrite chez SJL/J ne sont pas affectés par le génotype tout comme ce que l'on observe chez les souris de 4-6 semaines. Les mesures d'ASAT, ALAT et bilirubine totale sérique (BTS) sont affectées de fluctuations interindividuelles importantes chez les souris homozygotes C57BL/6 (figure 14), ce qui explique l'absence d'effet significatif du génotype sur ces paramètres, même si leur niveau est apparemment très augmenté. Il en va de même pour la BTS chez les souris *f/f* sur le fonds SJL/J.

Tableau 8
Effet du génotype sur les paramètres hématologiques et biochimiques
chez des souris de 6-8 mois

6-8 mois	GR	Hb	Ht	Rétic	PAL	ASAT	ALAT	BTS
BALB/c	•••	•••	•••	••	••	•••	••	•••
C57BL/6	ns	•••	•••	•	••	ns	ns	ns
SJL/J	ns	••	ns	•	•	••	•••	ns

Légende : ns : non significatif ; • : $0,01 < p \leq 0,05$; •• : $0,001 < p \leq 0,01$; ••• : $p \leq 0,001$

En conclusion, le génotype influence tous les paramètres hématologiques et biochimiques chez les jeunes souris de 4-6 semaines, le nombre de globules rouges mis à part. De façon attendue, les différences les plus importantes sont observées entre le génotype *f/f* et les génotypes *+/+* et *+/f*.

A 6-8 mois l'effet du génotype est globalement le même, les différences observées pour certains paramètres biochimiques n'étant pas statistiquement significatives du fait d'une grande dispersion interindividuelle des valeurs. On soulignera enfin que les trois fonds génétiques ne se comportent pas de la même façon pour les différents paramètres étudiés. Ceci est particulièrement net pour les souris de 6-8 mois. En effet seul le fonds BALB/c présente un effet marqué du génotype à cet âge.

B- Effet du fonds génétique (tableaux 9, 10 et 11)

Nous avons alors cherché à confirmer les différences d'effet du fonds génétique sur les paramètres étudiés, décelées lors de l'analyse précédente. Pour cela nous avons analysé l'effet du fonds génétique sur les paramètres, à âge et génotype identiques.

A l'âge de 4-6 semaines, les souris *+/+* des trois fonds présentent des valeurs très proches que ce soit pour les paramètres hématologiques ou les paramètres biochimiques. En revanche, il est intéressant de constater qu'à l'âge de 6-8 mois, une différence importante est observée concernant les paramètres hématologiques, principalement la teneur en hémoglobine. En analysant les données individuelles on s'aperçoit que cette différence provient du fait que la lignée SJL/J présente des valeurs nettement plus faibles pour ces paramètres, par exemple une réduction de 10,7% de l'hématocrite par rapport à BALB/c et de 13,4% par rapport à C57BL/6 ou encore une réduction de 11,7% de la teneur en hémoglobine par rapport à C57BL/6.

Chez les souris de génotype *+/-*, les différences hématologiques se confirment mais seulement à l'âge de 4-6 semaines. Elles disparaissent à l'âge adulte. En revanche, la tendance est inversée pour SJL/J. Les souris de ce fonds ont des valeurs pour la teneur en hémoglobine et l'hématocrite plus élevées que les souris C57BL/6 et sensiblement identiques à celles des souris BALB/c.

La différence observée chez les souris *+/-* de 6-8 mois avec un seuil de signification extrêmement bas pour la BTS n'a aucune signification biologique. En effet les moyennes des trois fonds BALB/c, SJL/J et C57BL/6 sont respectivement de $1,20 \pm 0,20$; $1,00 \pm 0,00$ et $3,00 \pm 0,32$ UI/L.

Chez les souris *f/f*, le fonds génétique influence la sévérité du phénotype chez les souris adultes : 5 des 8 paramètres étudiés présentent une différence liée à l'effet du fonds génétique, principalement le nombre de globules rouges, la concentration en hémoglobine et le taux de BTS.

Certaines différences ne sont pas significatives du fait d'un très grand étalement des valeurs. C'est notamment le cas pour les transaminases qui sont extrêmement élevées chez C57BL/6.

Tableau 9

**Effet du fonds génétique sur les paramètres hématologiques et biochimiques
chez les souris +/+**

	GR	Hb	Ht	Rétic	PAL	ASAT	ALAT	BTS
4-6 sem.	ns	ns	ns	ns	•	••	•	ns
6-8 mois	•	•••	•	ns	ns	ns	ns	ns

Tableau 10

**Effet du fonds génétique sur les paramètres hématologiques et biochimiques
chez les souris +/f**

	GR	Hb	Ht	Rétic	PAL	ASAT	ALAT	BTS
4-6 sem.	ns	•••	•••	ns	ns	ns	•	ns
6-8 mois	ns	ns	ns	ns	•	ns	ns	•••

Tableau 11

**Effet du fonds génétique sur les paramètres hématologiques et biochimiques
chez les souris f/f**

	GR	Hb	Ht	Rétic	PAL	ASAT	ALAT	BTS
4-6 sem.	ns	ns	ns	ns	•	ns	ns	••
6-8 mois	••	••	ns	•	•	ns	ns	•

Légende : ns : non significatif ; • : $0,01 < p \leq 0,05$; •• : $0,001 < p \leq 0,01$; ••• : $p \leq 0,001$

Il est donc très net que les trois fonds génétiques ne présentent pas les mêmes propriétés, notamment sur le plan hématologique, indépendamment de la présence de la mutation. Pour les souris de génotype mutant *f/f* ces différences sont néanmoins modestes lorsqu'on les étudie point par point. De plus elles ne se manifestent généralement qu'à l'âge adulte.

C- Influence du fonds génétique sur l'effet du génotype (tableau 12)

L'observation de la figure 15 montre que l'effet de la mutation sur certains paramètres n'est pas le même en fonction du fonds génétique. Par exemple, l'anémie observée chez les mutants (qui se traduit par une baisse des valeurs absolues des paramètres hématologiques) est beaucoup plus importante dans la lignée BALB/c que dans la lignée SJL/J.

Il semble donc que le fonds génétique puisse agir non seulement sur les valeurs des paramètres dans les différents groupes d'individus mais aussi sur les différences de valeurs entre les individus $+/+$ et f/f . Pour tester cette hypothèse nous avons donc entrepris une étude systématique de l'influence du fonds génétique sur l'effet du génotype à l'aide d'une analyse de la variance à deux facteurs croisés. Rappelons qu'il s'agit d'analyser les données en faisant apparaître la part de la variance totale qui est expliquée par chacun des deux facteurs pris isolément et par l'interaction entre ces deux facteurs. Ainsi, si l'effet de la mutation sur un paramètre est le même quel que soit le fonds génétique, l'ANOVA ne révèle pas d'interaction entre les deux facteurs. Si, au contraire, elle mesure une interaction statistiquement significative entre les deux facteurs, on conclut que l'effet de la mutation (facteur génotype) n'est pas le même dans les trois fonds génétiques.

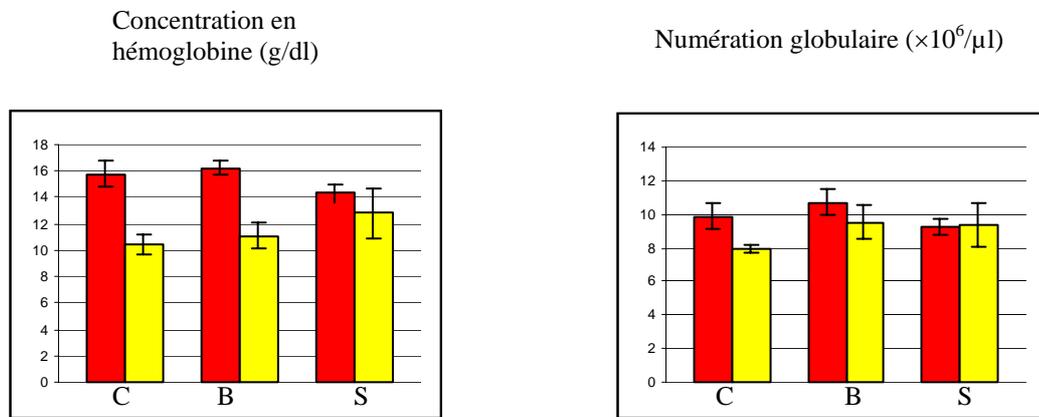
Le tableau 12 indique les résultats de l'ANOVA pour chaque paramètre étudié, en donnant le degré de signification statistique de l'interaction entre les facteurs fonds génétique et génotype.

Tableau 12
Influence du fonds génétique sur l'effet du génotype
ou mesure de l'interaction entre ces deux facteurs

$+/+$ $+/f$	GR	Hb	Ht	Rétic	PAL	ASAT	ALAT	BTS
f/f								
4-6 sem.	ns	••	••	ns	•••	ns	ns	••
6-8 mois	•	••	••	•••	••	ns	ns	•••

Légende : ns : non significatif ; • : $0,01 < p \leq 0,05$; •• : $0,001 < p \leq 0,01$; ••• : $p \leq 0,001$

Figure 15 : Comparaison des valeurs de numération globulaire et de concentration en hémoglobine pour des souris de 6-8 mois, *+/+* et *f/f* dans les trois fonds génétiques (moyennes et écarts types).



Légende : C : BALB/c, B : C57BL/6, S : SJL/J.

■ *+/+* ■ *f/f*

L'analyse montre que, chez les souris de 4-6 semaines, l'effet de la mutation sur l'hématocrite et la concentration en hémoglobine dépend du fonds génétique. Cet effet s'étend à la numération globulaire et réticulocytaire chez les souris adultes. Ce résultat conforte donc l'observation précédente, en démontrant que les paramètres hématologiques sont moins affectés par la mutation dans le fonds SJL/J que dans les deux autres fonds. L'effet de la mutation sur le taux de bilirubine totale sérique est également variable selon le fonds génétique, la plus forte augmentation chez les homozygotes étant observée dans le fonds BALB/c.

Aucune influence du fonds génétique n'est observée pour les transaminases sériques alors que l'augmentation chez les homozygotes est la plus forte dans le fonds C57BL6. L'effet n'est pas statistiquement significatif du fait de la grande variabilité interindividuelle chez les souris de ce fonds.

D- Influence de l'âge sur l'effet du génotype (tableau 13)

Les analyses précédentes ont mis en évidence l'importance de l'âge auquel les souris sont étudiées: les différences observées entre fonds génétiques sont plus importantes à l'âge de 6-8 semaines qu'à l'âge de 4-6 semaines.

Dans un premier temps, nous nous sommes demandé si, dans les trois fonds étudiés, l'effet de la mutation (facteur génotype) variait en fonction de l'âge. Nous avons répondu à cette question par une analyse de variance à deux facteurs croisés en recherchant une interaction éventuelle entre les facteurs âge et génotype.

Les résultats montrent un effet inégal de l'âge sur l'effet de la mutation dans les trois fonds génétiques. Il est le plus marqué dans le fonds BALB/c dans lequel on observe le plus fort impact chez les animaux adultes. La figure 14 montre que l'effet de la mutation sur les paramètres hématologiques mesuré par les différences entre souris *+/+* et *f/f* dépend, dans la lignée C57BL/6 et dans la lignée BALB/c, de l'âge auquel les animaux sont étudiés. Ces différences sont plus marquées chez les souris de 6-8 mois que chez les souris de 4-6 semaines. L'effet de la mutation sur les paramètres biochimiques ne dépend pas de l'âge mis à part pour la concentration en hémoglobine, les PAL et le taux de BTS chez les souris BALB/c. Dans cette lignée, en effet, le taux de BTS chez les homozygotes ne cesse d'augmenter avec l'âge, ce qui est corrélé avec l'aggravation des lésions hépatiques.

Tableau 13
Influence de l'âge sur l'effet du génotype (*+/+*, *+f*, *f/f*)

Lignée	GR	Hb	Ht	Rétic	PAL	ASAT	ALAT	BTS
BALB/c	•	••	ns	ns	••	ns	ns	•••
C57BL/6	ns	••	•	ns	ns	ns	ns	ns
SJL/J	ns	ns	ns	••	ns	ns	ns	ns

Légende : ns : non significatif ; • : $0,01 < p \leq 0,05$; •• : $0,001 < p \leq 0,01$; ••• : $p \leq 0,001$

Cette analyse confirme que les conséquences de la mutation sur les paramètres biologiques étudiés s'aggravent avec l'âge dans le fonds BALB/c.

E-Influence du fonds génétique sur l'interaction âge-génotype (tableau 14, figures 16 et 17)

L'analyse précédente a montré que l'effet de la mutation sur les paramètres étudiés n'était pas le même chez des jeunes souris (4-6 semaines) ou des adultes (6-8 mois) et que cette différence semblait dépendre du fonds génétique. Pour le confirmer, nous avons analysé nos données par une analyse de la variance à trois facteurs croisés et recherché une interaction entre ces trois facteurs afin de répondre à la question: la différence entre souris *+/+* et souris *f/f* évolue-t-elle de la même façon avec l'âge dans les trois fonds génétiques. L'analyse de la variance à trois facteurs a mis en évidence une interaction forte ($p < 0,01$) pour trois paramètres. Les résultats pour la concentration en hémoglobine sont synthétisés dans la figure 12 qui représente, pour chaque groupe d'âge et de fonds génétique, le rapport entre les valeurs de concentration en hémoglobine des souris *f/f* et des souris *+/+*. C57BL/6 et BALB/c présentent une nette diminution de ce rapport avec l'âge, alors que SJL/J montre une légère augmentation.

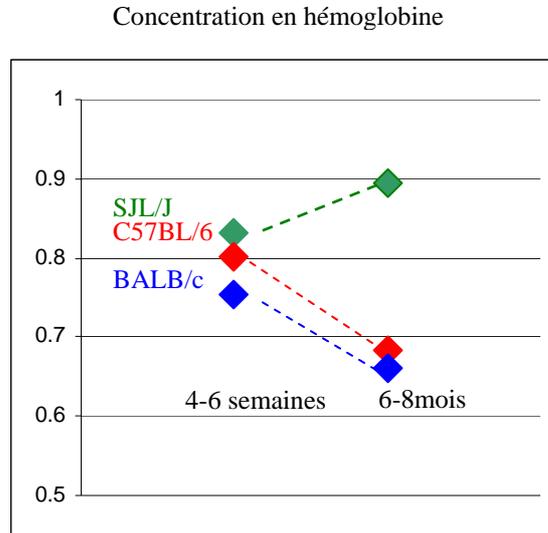
Tableau 14

Influence du fonds génétique sur l'interaction âge-génotype (*+/+*, *+/f*, *f/f*)

	GR	Hb	Ht	Rétic	PAL	ASAT	ALAT	BTS
Interaction	ns	••	ns	•	••	ns	ns	•••

Légende : ns : non significatif ; • : $0,01 < p \leq 0,05$; •• : $0,001 < p \leq 0,01$; ••• : $p \leq 0,001$

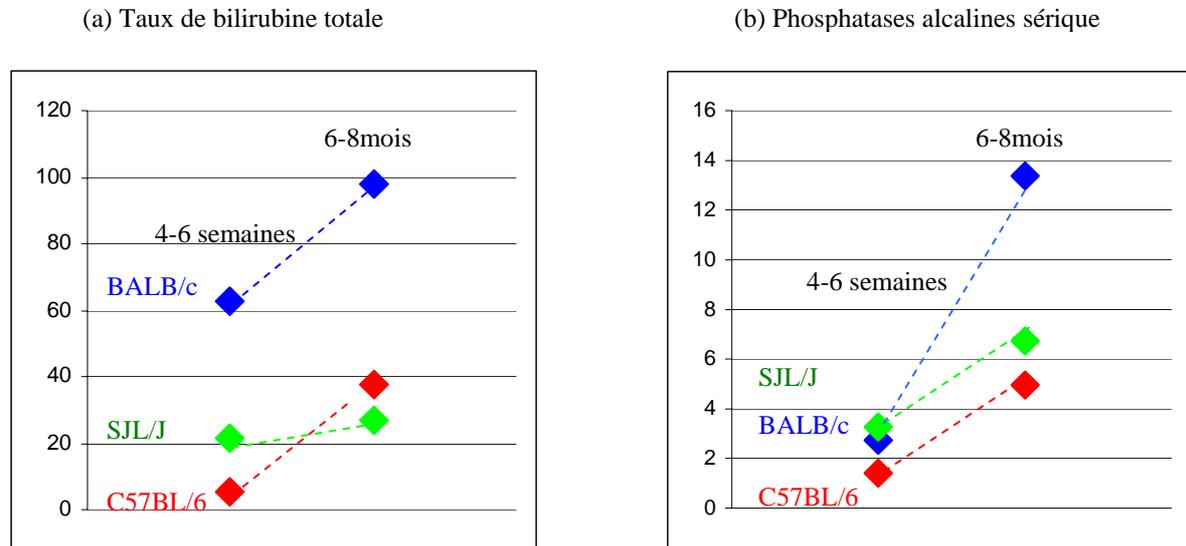
Figure 16 : Evolution au cours du temps du rapport entre les moyennes des valeurs des souris *f/f* et celles des souris *+/+* pour la concentration en d'hémoglobine, dans les trois fonds génétiques.



L'interaction fonds génétique, âge, génotype est également très forte pour le taux de BTS ($p < 0,001$) et les PAL ($p < 0,01$). L'analyse de la figure 17 (a) montre que l'augmentation avec l'âge du rapport du taux de BTS est identique et bien plus fort chez les souris de fonds BALB/c et C57BL/6 que chez les souris de fonds SJL/J.

L'analyse de la figure 17 (b) permet de montrer que l'augmentation avec l'âge du rapport du taux de phosphatases alcalines sériques est quasi identique et plus faible chez les souris de fonds SJL/J et C57BL/6 que chez les souris de fonds BALB/c.

Figure 17 a et b: Evolution au cours du temps du rapport entre les moyennes des valeurs des souris *f/f* et celles des souris *+/+* pour le taux de bilirubine totale sérique (a) et pour le taux de phosphatases alcalines (b) dans les trois fonds génétiques.



On constate donc une forte interaction entre génotype, fonds génétique et âge pour la concentration en hémoglobine, les PAL et la BTS, qui traduit une aggravation, avec l'âge, du phénotype des souris, plus marquée dans le fonds BALB/c que dans les deux autres fonds.

F- Taux de protoporphyrines dans les hématies et les fèces (figures 18, 19 et 20)

Le déficit en ferrochélatase se traduit par une accumulation de protoporphyrine dans les hématies et son élimination accrue dans les matières fécales.

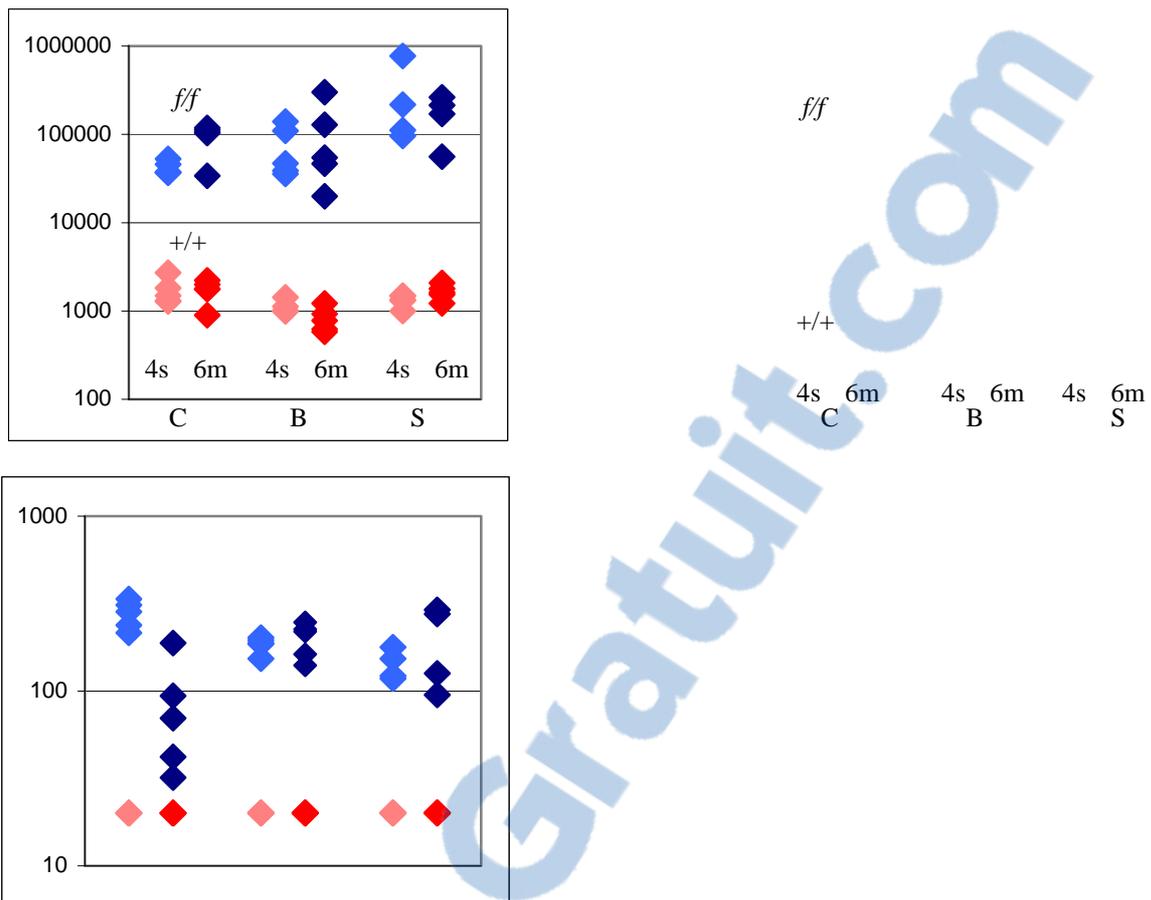
Les valeurs individuelles du taux de protoporphyrine mesurés dans les érythrocytes et dans les selles sont représentées dans la figure 18. Les résultats obtenus sont très voisins entre les trois fonds génétiques aussi bien chez les individus normaux (+/+) que chez les homozygotes (*f/f*), même si chez ces derniers la concentration érythrocytaire semble plus élevée dans le fonds SJL/J que dans le fonds BALB/c chez les souris de 4-6 semaines. Un test non paramétrique (U de Mann-Whitney) permet de valider cette constatation ($p=0,014$). Graphiquement on n'observe pas non plus de différence évidente en fonction de l'âge des souris. Les taux de protoporphyrine n'ayant pas une distribution normale il n'est pas possible de tester l'interaction entre le génotype et le fonds génétique ou entre le génotype et l'âge des souris. On notera simplement la grande dispersion des valeurs pour la concentration en protoporphyrine dans les selles chez BALB/c à 6-8 mois.

Nous avons également analysé le rapport entre ces deux taux, qui permet d'apprécier la surproduction ou le défaut d'élimination de la protoporphyrine (figure 19).

Figure 18 : Représentation en échelle semi-logarithmique de la concentration en protoporphyrine dans les érythrocytes en nmol/l (a) et dans les selles en nmol/g de poids sec (b) chez des souris +/+ et *f/f* de 4-6 semaines et 6-8 mois.

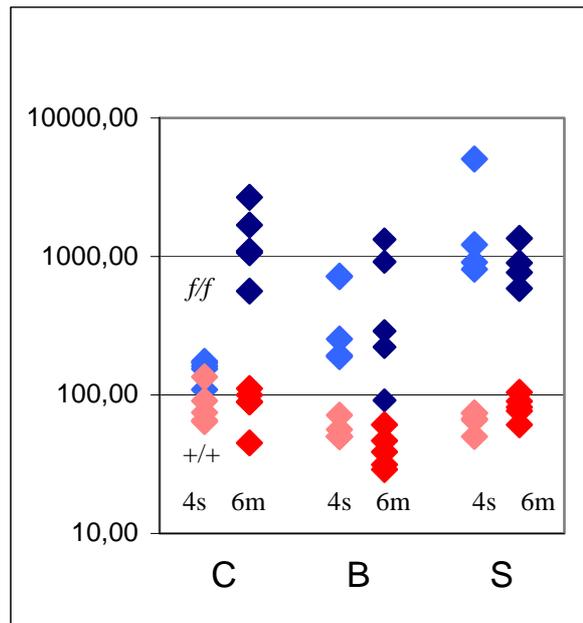
(a)

(b)



Légende : 4s : 4-6 semaines, 6m : 6-8 mois, C : BALB/c, B : C57BL/6, S : SJL/J. Rouge *+/+*, bleu *f/f*.

Figure 19 : Représentation en échelle semi logarithmique du rapport de la concentration en protoporphyrine dans les érythrocytes sur la concentration en protoporphyrine dans les selles chez des souris *+/+* et *f/f* de 4-6 semaines et 6-8 mois.



Légende : 4s : 4-6 semaines, 6m : 6-8 mois, C : BALB/c, B : C57BL/6, S : SJL/J. Rouge +/+, bleu *f/f*.

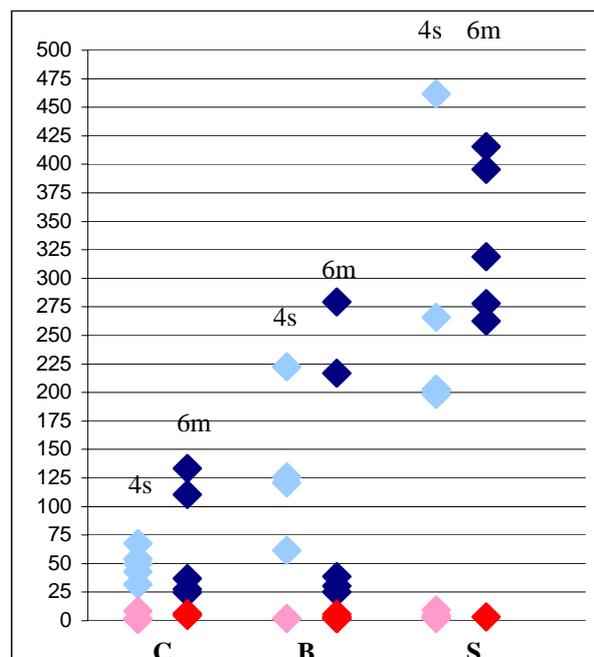
On constate, pour ce rapport, peu de différences entre les trois fonds chez les souris +/+ quel que soit leur âge. On peut faire la même constatation pour les souris mutantes *f/f* de 6-8 mois. En revanche il existe une différence nette entre les souris des trois fonds de 4-6 semaines. Pour le confirmer, nous avons réalisé un test non paramétrique de Kruskal-Wallis qui permet de comparer trois distributions non gaussiennes. Ce test montre un effet fort ($p=0,003$) du fonds génétique sur le rapport entre la concentration érythrocytaire et fécale en protoporphyrine chez les souris de 4-6 semaines.

Les jeunes souris mutantes *f/f* semblent donc produire plus de protoporphyrine, ou moins bien l'éliminer lorsqu'elles sont de fonds génétique SJL/J par rapport aux souris des autres fonds. Cette tendance se normalise à l'âge adulte auquel on ne note plus de différence entre les fonds génétiques. On remarquera que cette observation ne s'accorde pas avec les résultats de l'histologie du foie, les souris SJL/J *f/f* de 4-6 semaines étant celles qui accumulent le moins de cristaux de protoporphyrine dans leur foie et qui présentent les lésions hépatiques les plus discrètes.

Nous avons également évalué la concentration érythrocytaire en protoporphyrine (qui est fluorescente) à l'aide d'un cytofluorimètre. Seule la protoporphyrine IX est naturellement fluorescente dans le sang lorsqu'elle est soumise à une lumière de longueur d'onde voisine de 400nm. La lumière laser du cytofluorimètre, qui possède une longueur d'onde 340-360nm,

permet d'exciter la protoporphyrine. Ainsi illuminée la protoporphyrine émet une fluorescence rouge de longueur d'onde voisine de 670nm, observable sur les deux canaux FL2 et FL3 du cytofluorimètre. Le cytofluorimètre donne, pour chaque hématie, une valeur de fluorescence qui varie proportionnellement avec la concentration en protoporphyrine sans pour autant en être une mesure exacte. Pour évaluer la part de la fluorescence attribuable à l'accumulation de la protoporphyrine, nous avons retranché, pour chaque échantillon, la valeur de fluorescence mesurée chez une souris normale (souris C57BL/6 de 12 semaines, de génotype +/+). Nous n'avons pas pu utiliser l'analyse de la variance pour l'analyse des résultats car les valeurs obtenues n'étaient pas distribuées selon une loi normale (figure 20).

Figure 20 : Représentation en échelle linéaire de la fluorescence des érythrocytes chez des souris +/+ et *f/f* de 4-6 semaines et 6-8 mois.



Légende : 4s : 4-6 semaines, 6m : 6-8 mois, C : BALB/c, B : C57BL/6, S : SJL/J. Rouge +/+, bleu *f/f*.

L'analyse de la figure 20 montre que la fluorescence des globules rouges se comporte globalement comme la concentration en protoporphyrine dans les globules rouges : les souris BALB/c ont les plus petites valeurs, suivent ensuite les souris C57BL/6 puis SJL/J. La mesure de la fluorescence semble donc un bon estimateur de la concentration en protoporphyrine dans les globules rouges qui est un paramètre délicat et fastidieux à mesurer.

On remarque cependant un effet net du fonds génétique, les souris SJL/J *f/f* ayant la fluorescence la plus forte. Un test non paramétrique de Kruskal-Wallis confirme cette observation. La différence entre les trois fonds génétiques est significative à $p=0,008$ pour les souris de 4-6 semaines et significative à $p=0,015$ pour les souris de 6-8 mois. L'âge, en revanche, ne semble influencer ce paramètre que chez les souris *f/f* de fonds SJL/J.

G- Analyse enzymatique

Le dosage de l'activité de la ferrochélatase est réalisé grâce à une méthode fluorimétrique qui évalue la formation de mésoporphyrine-zinc. Les valeurs brutes ont été ramenées à la quantité de protéines dans l'échantillon. L'activité enzymatique a été exprimée en nmol de mésoporphyrine-zinc formée par mg de protéine en 1 heure à 37°C.

Dans la description originale de la mutation par Tutois et collaborateurs [Tutois et al 1981], les activités enzymatiques mesurées dans le foie et la rate étaient d'environ 55% de la normale chez des souris *+/f* et d'environ 5% chez des souris *f/f*. Les résultats que nous avons obtenus, présentés en valeurs moyennes dans la figure 14 et donnés sous forme de rapport dans le tableau 15, sont plus hétérogènes. Les valeurs mesurées dans le foie présentent globalement les rapports attendus même si l'activité mesurée chez les souris C57BL/6 *+/f* de 6-8 mois était un peu élevée. En revanche, les valeurs mesurées dans la rate présentent des écarts importants par rapport à ces proportions attendues. Par exemple, les taux mesurés dans la rate sont très faibles chez les souris C57BL/6, en particulier chez les souris *+/+*. L'activité de 104% observée chez les *+/f* de fonds SJL/J peut s'expliquer également par une activité un peu faible chez les *+/+*.

Il est possible que les écarts aux proportions attendues observés dans la rate soient le reflet de fluctuations de la composition cellulaire de cet organe qui est affecté par les perturbations érythropoïétiques liées à la maladie. Enfin, on ne relève pas de différence statistiquement significative, de l'activité de la ferrochélatase dans le foie ou la rate, entre les trois fonds génétiques à âges et génotypes identiques.

Tableau 15

Rapport des activités de la ferrochélatase dans le foie et la rate (en %)

	Foie	Rate
--	------	------

Fonds	Age	$\frac{+/f}{+/+}$	$\frac{f/f}{+/+}$	$\frac{+/f}{+/+}$	$\frac{f/f}{+/+}$
BALB/c	4-6 sem	51	5	74	28
	6-8 mois	48	7,8	54	18
C57BL/6	4-6 sem	37	2	86	36
	6-8 mois	90	10	85	22
SJL/J	4-6 sem	57	4,6	104	39
	6-8 mois	70	5	66	7

H- Histologie

Aucune lésion macroscopique ou microscopique n'a été observée chez les souris $+/f$.

Chez les souris f/f , nous n'avons trouvé aucune lésion histologique de photosensibilité (inflammation, phlyctène) sur les prélèvements de peau dorsale et d'oreille ce qui, par rapport à la description originale, pourrait s'expliquer par la présence de capots filtrants sur les cages, qui arrêtent une partie des rayonnements lumineux. Le foie présentait différents types de lésions en fonction de l'âge et du fonds génétique. Quatre types de colorations ont été réalisés : HES (hémalin-éosine-safran), Perls (coloration spéciale du fer), Hall (coloration spéciale de la bilirubine) et coloration spéciale à l'argent de la réticuline qui permet d'apprécier la désorganisation tissulaire. Trois individus ont été analysés par groupe de génotype, de fonds génétique et d'âge.

A 4-6 semaines, plusieurs types de lésions ont été observées grâce à la coloration HES, qui sont présentées dans le tableau 16. Les colorations de Perls et Hall n'ont pas mis en évidence d'accumulation de fer ou de bilirubine dans les coupes de foies observées.

Tableau 16 : Lésions histologiques du foie des souris *fff* de 4-6 semaines

Type de lésion	C57BL/6	BALB/c	SJL/J
Fibrose péri-portale	+ / +++	++ / +++	+
Fibrose intra-sinusoïde	+ / +++	+ / ++	0 / +
Fibrose péri-vasculaire	+ / +++	+ / +++	0 / +
Hyperplasie des canaux biliaires	+++	+ / +++	+ / +++
Hépatocytes séquestrés dans la réaction péri portale	+	0	+
Infiltration de cellules mononuclées	+	++	+ / +++
Ectasie des vaisseaux lymphatiques	Oui	Oui	Oui
Surcharge pigmentaire des cellules de Küpffer	++ / +++	++	+ / +++
Surcharge pigmentaires des hépatocytes	++ / +++	+	+
Surcharge pigmentaire des canaux biliaires	++ / +++	+	+
Déstructuration du parenchyme	+	+	0 / +
Dégénérescence vacuolaire hépatocytaire	0	+ / +++	0
Nécrose hépatocytaire	+	+ / +++	+ / +++

Légende : 0 : rare, + : discrète, ++ : modérée, +++ : intense

A 6-8 mois, plusieurs types de lésions ont été observées grâce à la coloration HES, qui sont présentées dans le tableau 17. Là encore les colorations de Perls et Hall n'ont pas mis en évidence d'accumulation de fer ou de bilirubine dans les coupes de foies observés.

Tableau 17 : Lésions histologiques du foie des souris *fff* de 6-8 mois

Type de lésion	C57BL/6	BALB/c	SJL/J
Fibrose péri-portale	+ / ++	++ / +++	+
Fibrose intra-sinusoïde	+ / ++	++	+ / ++
Fibrose péri-vasculaire	+ / ++	++	+ / ++
Hyperplasie des canaux biliaires	+++	++ / +++	+
Hépatocytes séquestrés dans la réaction péri portale	++	+++	++
Infiltration de cellules mononuclées	++	++ / +++	++
Ectasie des vaisseaux lymphatiques	Oui	Oui	Oui
Surcharge pigmentaire des cellules de Küpffer	++ / +++	++	+
Surcharge pigmentaires des hépatocytes	++ / +++	++	++
Surcharge pigmentaire des canaux biliaires	++ / +++	++	+
Déstructuration du parenchyme	+++	++ / +++	+++
Dégénérescence vacuolaire hépatocytaire	++ / +++	+ / ++	++ / +++
Nécrose hépatocytaire	++ / +++	+ / ++	++ / +++
Hématopoïèse extramédullaire	-	+	++ / +++
Nodules de régénération	++	-	++
Hépatome	++	-	++

Légende : - : absence, 0 : rare, + : discrète, ++ : modérée, +++ : intense

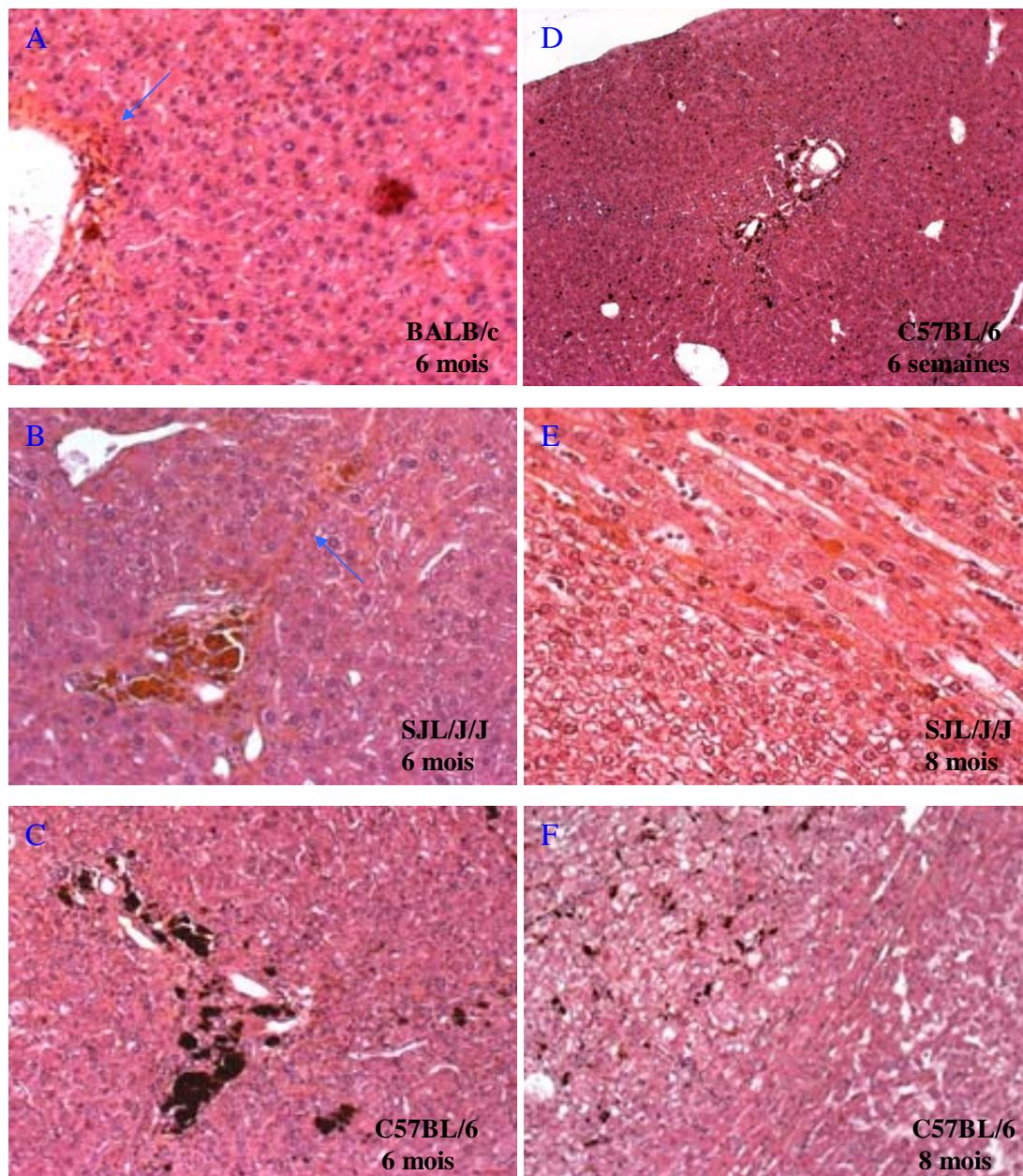
L'illustration de ces lésions est présentée dans la figure 21.

Chez les jeunes souris les lésions observées sur le foie sont plus discrètes que chez les individus adultes. La faible surcharge pigmentaire (principalement due à la protoporphyrine) dans les hépatocytes, les canaux biliaires et les cellules de Küpffer, dans les fonds BALB/c et SJL/J, paraît corrélée avec le moindre degré histologique des lésions observées dans ces deux fonds, par comparaison avec C57BL/6.

Chez les souris adultes on constate une aggravation de l'atteinte hépatique, les souris de fonds C57BL/6 étant toujours le plus sévèrement touchées et les souris de fonds SJL/J présentant les lésions les plus limitées.

On constate, enfin, une hématopoïèse extramédullaire significative chez les souris SJL/J, très discrète chez BALB/c, alors qu'elle est absente chez C57BL/6.

Figure 21 : Histologie du foie de souris *fff* de 4-6 semaines et 6-8 mois



Photos A-B-C: Grossissement $\times 10$. Accumulation de cristaux de protoporphyrine, modérée chez BALB/c (A) et SJL/J (B), mais intense chez C57BL/6 (C), animaux âgés de 6 mois. On note de plus la fibrose autour de ces canaux biliaires et des veines hépatiques (flèches).

Photo D: Grossissement $\times 10$. Accumulation de cristaux de protoporphyrine dans le foie d'une souris C57BL/6 âgée de 6 semaines.

Photo E: Grossissement $\times 20$. Hépatome sur un lobe du foie d'une souris SJL/J de 8 mois. En bas à gauche l'hépatome est constitué d'un tissu peu organisé, formé de petites cellules rondes ; en haut à droite le parenchyme hépatique présente des cellules aplaties longitudinalement

Photo F: Grossissement $\times 10$. Nodule d'hyperplasie sur un lobe du foie d'une souris C57BL/6 de 8 mois. En bas à droite le foyer d'hyperplasie est constitué de cellules ayant l'aspect d'hépatocytes, non écrasées et organisées. En haut à gauche le tissu hépatique fibrosé est parsemé de cristaux de protoporphyrine.

Discussion

Avant la description de la mutation *ferrochelatase deficiency* de la souris par Tutois et collaborateurs en 1991, un seul modèle animal de protoporphyrie érythropoïétique spontanée avait été décrit chez les bovins. En dehors de l'intérêt pratique évident que représente la possibilité de disposer d'un modèle animal de petite taille, le modèle souris de protoporphyrie érythropoïétique s'est imposé comme référence du fait d'une grande ressemblance avec la forme grave de la maladie humaine, en particulier la présence constante de l'hépatopathie chez ces souris. En effet, chez les bovins protoporphyriques, il a été observé un tableau clinique associant photosensibilité, taux très élevés de protoporphyrine dans les hématies et les selles, activité réduite de la ferrochélatase mais aucune anomalie hématologique ni lésion hépatique. La protoporphyrie des bovins a donc rapidement montré ses limites en tant que modèle de la protoporphyrie érythropoïétique humaine. La mutation *ferrochelatase deficiency* de la Souris, sur fonds BALB/c est rapidement devenue un outil pour l'étude de la maladie. Les souris mutantes *ff* présentent un phénotype qui reproduit le phénotype le plus sévère que l'on puisse rencontrer chez les patients atteints de protoporphyrie érythropoïétique. Toutes les souris *ff* présentent une anémie et une atteinte hépatique sévère alors que chez l'Homme ces deux caractères phénotypiques ne sont observés que chez 1 à 3 % des malades selon les études. Ce sont ces deux caractéristiques qui font toute la gravité de la maladie. Si l'hépatopathie n'est pas traitée par une transplantation hépatique, la mort est inéluctable. Grâce au modèle souris de protoporphyrie érythropoïétique, il est désormais possible d'étudier la physiopathologie de la maladie afin de mieux comprendre les mécanismes qui régissent l'apparition des symptômes hépatiques. Des traitements peuvent également être testés chez cet animal. L'une des solutions envisagées, à long terme, pour traiter la protoporphyrie érythropoïétique chez l'Homme, est l'auto-greffe de moelle après correction du défaut génétique siégeant dans le gène de la ferrochélatase de façon à restaurer une activité enzymatique correcte. Afin de mettre au point cette technique de thérapie génique plusieurs études ont été réalisées grâce à la souris *ferrochelatase deficiency* (voir chapitre bibliographie).

La mutation *ferrochelatase deficiency* avait été introduite dans un fonds proche de BALB/c. Au cours d'une expérience de transgénèse, il avait été découvert que la mutation ne s'exprimait pas avec la même intensité sur le fonds d'origine et dans un fonds hybride composé pour 50% de BALB/c, pour 25% de C57BL/6 et pour 25% de SJL/J.

Ces observations laissaient penser que le phénotype de la mutation était influencé par le fonds génétique, par l'intermédiaire de gènes modificateurs. Xavier Montagutelli avait alors entrepris d'introduire la mutation dans les fonds génétiques consanguins C57BL/6 et SJL/J, en développant deux lignées congéniques.

L'hypothèse de départ de notre travail était que l'un des deux fonds génétiques C57BL/6 ou SJL/J portait des allèles à des locus modificateurs atténuant la sévérité du phénotype de la mutation *ferrochelatase deficiency* initialement observé dans la lignée BALB/c. Des lignées congéniques portant la mutation *ferrochelatase deficiency*, sur trois fonds consanguins, ont été produites et l'objectif de notre travail était d'en caractériser le phénotype. Dans un premier temps, nous avons déterminé la taille du segment congénique, d'origine BALB/c, porteur de la mutation, qui avait été introduit dans les fonds C57BL/6 et SJL/J, à l'aide de marqueurs microsatellites. L'hétérogénéité des haplotypes identifiés à l'intérieur d'une même lignée s'explique par le fait que, lors de l'établissement de la lignée, plusieurs couples de géniteurs sont constitués à chaque génération, qui ont hérité d'événements de recombinaison différents. Selon les haplotypes, la taille du segment congénique a varié de 18 à 48 cM. Ces valeurs sont surévaluées par rapport à la réalité, puisque nous avons considéré les bornes extrêmes des intervalles. Des marqueurs plus rapprochés permettraient d'affiner ces données. Toutefois, nous nous servons de ce résultat pour entretenir les deux lignées congéniques à partir des souris portant les segments les plus courts pour limiter l'effet indésirable des gènes situés à proximité du locus *Fech*. Incidemment, l'haplotype I de la lignée SJL/J nous montre que ce locus se trouve entre les marqueurs *D18Mit24* et *D18Mit185*, entre les positions 25cM et 43cM.

L'ensemble des analyses que nous avons réalisées nous permet de décrire le phénotype de la mutation dans les trois fonds génétiques.

Dans le fonds génétique BALB/c, les souris *ff* présentent une dégradation de l'état général qui s'aggrave avec l'âge ainsi qu'une alopecie diffuse. L'hépatosplénomégalie, observée dès l'âge de 4 semaines, est responsable d'une distension abdominale à l'âge adulte. La fertilité est réduite, principalement chez les mâles. L'ictère est particulièrement marqué dès le plus jeune âge. L'anémie est très prononcée, avec une réduction de 34% de la concentration en hémoglobine et un taux de réticulocytes élevé, en particulier chez les adultes. Sur le plan biochimique, BALB/c se distingue des deux autres fonds par une élévation très forte de la bilirubine totale sérique et des phosphatases alcalines qui signe une altération des fonctions excrétoires biliaires. Les lésions histologiques observées dans le foie sont modérées chez les jeunes souris mais s'aggravent avec l'âge.

La surcharge pigmentaire reste modérée même à l'âge adulte mais la structure du parenchyme est désorganisée et l'hyperplasie des canaux biliaires est conséquente.

Les souris *ff* de fonds génétique C57BL/6 présentent un bon état général malgré un retard de croissance dans le jeune âge. La fertilité est un peu réduite mais moins que dans la lignée BALB/c. Une distension abdominale, comparable à celle observée dans le fonds BALB/c, est notable dès 3 mois. L'anémie est également très prononcée à 6 mois, avec une réduction de 31% de la concentration en hémoglobine et un hématoците de 38,5%. C'est dans ce fonds génétique que l'atteinte histologique du foie semble la plus marquée: les transaminases sont à des taux moyens très élevés chez les adultes et l'histologie du foie montre une accumulation massive de protoporphyrine dès l'âge de 4 semaines. La déstructuration du parenchyme hépatique, la nécrose hépatocytaire ainsi que l'hyperplasie des canaux biliaires sont intenses. Enfin, nous avons observé des activités ferrochélatase faibles dans la rate, y compris chez les souris *+/+*, sans être actuellement en mesure d'en évaluer les conséquences physiopathologiques.

Les souris *ff* de fonds génétique SJL/J sont certainement celles qui présentent le phénotype le moins sévère. Leur état général n'est pas affecté. La fertilité est normale dans les deux sexes. Un ictère est observé transitoirement vers l'âge de 4 semaines mais il disparaît à l'âge adulte. Les souris présentent parfois une distension abdominale qui apparaît tardivement et peut rester discrète. C'est dans ce fonds que la numération globulaire, le taux d'hémoglobine et l'hématoците sont les plus bas chez les souris *+/+* mais, inversement, les plus élevés chez les souris *ff*. L'anémie induite par la mutation est donc très modérée. L'augmentation de la bilirubine totale sérique chez les souris *ff* de 6-8 mois est deux fois moindre que chez les souris C57BL/6 et sept fois moindre que chez les souris BALB/c. Ces taux faibles expliquent l'absence d'ictère visible. Les lésions hépatiques observées lors de l'analyse histologique sont très discrètes chez les jeunes souris mais comme dans les autres fonds s'accroissent avec l'âge. C'est dans ce fonds génétique que l'on observe la surcharge pigmentaire et une hyperplasie des canaux biliaires les plus faibles.

Les valeurs mesurées pour les différents paramètres, chez les souris *ff*, sont donc non seulement différentes dans les trois fonds génétiques mais leur évolution au cours du temps est aussi différente.

La physiopathologie de la protoporphyrine érythropoïétique a pour point de départ un déficit enzymatique en ferrochélatase. Celui-ci conduit d'une part à une synthèse réduite d'hème et d'autre part à une accumulation intra-érythrocytaire de protoporphyrine qui fragilise les hématies et induit une cytolysse accrue responsable d'une anémie modérée.

La dégradation dans la rate des hématies anormales libère des quantités élevées de protoporphyrine dans le plasma et s'accompagne d'une forte production de bilirubine. Protoporphyrine et bilirubine sont captées par le foie pour être éliminées dans les voies biliaires. Toutefois, leurs concentrations élevées induit une saturation rapide des capacités excrétoires. La protoporphyrine, insoluble, forme des cristaux de précipités dans les canaux biliaires dont l'épithélium se trouve altéré, puis dans le parenchyme hépatique où ils sont responsables d'une souffrance cellulaire chronique et peut-être du développement d'hépatomes. La protoporphyrine qui circule dans les tissus induit des lésions de photosensibilité vraisemblablement par la formation d'oxygène singulet, forme active de l'oxygène moléculaire capable de provoquer de nombreuses lésions intracellulaires par l'intermédiaire de processus de peroxydation. Les variations phénotypiques observées entre les trois fonds génétiques relèvent certainement de mécanismes physiopathologiques différents.

Chez les souris BALB/c l'anémie est intense, la concentration en protoporphyrine dans les hématies élevée et la concentration en protoporphyrine dans les selles relativement basse. La production de protoporphyrine est donc intense comparée à son élimination. Les capacités excrétoires du foie sont rapidement surchargées et la protoporphyrine s'accumule dans l'organisme, sous forme brute dans le foie ou, sous forme transformée en bilirubine dans de nombreux tissus. Ces souris présentent donc rapidement un très mauvais état général. Une activité intense des enzymes de la voie de biosynthèse de l'hème associée à une hématopoïèse augmentée pourrait expliquer le schéma physiologique.

Chez les souris C57BL/6, comme chez les souris BALB/c, l'anémie est intense et la production de protoporphyrine est élevée comparée à son élimination. Cependant, contrairement à ce qui se produit chez les souris BALB/c, le taux de bilirubine totale sérique est faible. La majeure partie de la protoporphyrine s'accumule et précipite sous forme native dans le foie sans être transformée en bilirubine. La surcharge pigmentaire est intense dès l'âge de 4 semaines. La souffrance hépatique est attestée par une élévation très nette des transaminases sériques.

Chez les souris SJL/J les paramètres hématologiques des souris +/+ sont bas. L'anémie, la plus faible des trois fonds, est modérée. L'accumulation de protoporphyrine dans le foie est modérée de même que la concentration en bilirubine totale sérique. Une faible activité de la voie de biosynthèse de l'hème, qui produirait peu de protoporphyrine, pourrait rendre compte de cette faible accumulation dans le foie et du faible retentissement du déficit en ferrochélatase sur l'état général des souris.

Une observation reste cependant sans explication : le très fort rapport production sur élimination de la protoporphyrine, surtout chez les jeunes souris, souligné par une fluorescence intense des hématies en cytofluorimétrie.

Le premier résultat de notre travail est d'avoir caractérisé trois formes différentes de la protoporphyrine érythropoïétique, qui représentent des modèles pour les formes de gravité variable de la maladie. Chez l'Homme le phénotype de la maladie est très hétérogène en raison de l'hétérogénéité génétique globale des individus. Il s'étend d'une photosensibilité mineure à une atteinte hépatique nécessitant la transplantation. Chez la souris de fonds consanguin BALB/c tous les individus *fff* présentent, en raison de leur similitude génétique, le même phénotype qui reproduit la forme sévère de la maladie humaine. Nous avons vu que la souris représentait un bon modèle animal mais un modèle restrictif. La création de lignées congéniques sur les fonds C57BL/6 et SJL/J a permis de mieux représenter l'étendue du phénotype que l'on observe chez l'Homme. Il est fort probable que si ce même travail était réalisé pour d'autres mutations nous enrichirions les modèles existants de maladies humaines.

Notre étude nous a donc permis de mettre en évidence des différences caractéristiques entre les trois fonds génétiques. Toutefois, des études complémentaires sont indispensables pour émettre des hypothèses sur les mécanismes physiopathologiques à l'origine de ces différences. En particulier, nous projetons de mesurer la demi-vie des hématies pour évaluer la libération de protoporphyrine liée à leur dégradation. Une quantification du niveau d'activité des enzymes se trouvant en amont de la ferrochelatase, dans le voie de biosynthèse de l'hème, permettrait peut être, dans le cas d'une surproduction de précurseurs d'hème, d'expliquer les différences d'accumulation de protoporphyrine que l'on observe entre les souris de la lignée C57BL/6 et les souris des lignées BALB/c et SJL/J.

Enfin les conditions d'élevage des souris ne nous ont pas permis d'observer de lésions de photosensibilité. Afin de savoir s'il existe des différences entre les lignées, nous projetons d'étudier les réactions de souris soumises à un éclairage de longueur d'onde appropriée (spectre visible).

De cette étude nous retiendrons de plus que les paramètres qui semblent les plus discriminants pour évaluer les différences de phénotype entre les souris des trois lignées BALB/c, C57BL/6 et SJL/J sont certainement les paramètres hématologiques, le taux de BTS et le taux de PAL.

Bien que nous ayons observé de grandes différences de lésions histologiques dans le foie des souris des trois lignées, ce paramètre qualitatif est difficilement exploitable pour la suite de notre étude. Il constitue tout de même un indicateur précieux du niveau de saturation du foie en protoporphyrine.

Pour la suite de notre projet, nous avons entrepris la production d'hybrides F1 entre les trois fonds génétiques et nous les caractériserons pour savoir si leur phénotype ressemble à l'une des deux lignées parentales ou s'il est intermédiaire. Ces animaux seront étudiés pour les mêmes paramètres que leurs parents consanguins.

Une fois le phénotype de la mutation caractérisé chez les trois F1, nous établirons une stratégie de croisement pour tenter d'identifier des régions du génome capables de modifier la sévérité des symptômes. En fonction du phénotype des F1, nous réaliserons un croisement en retour (backcross) ou une génération F2 entre deux des lignées congéniques. Nous choisirons les lignées parentales présentant le plus grand écart phénotypique. Si les individus F1 présentent un phénotype intermédiaire entre les deux parents, un croisement F2 sera entrepris. Si au contraire les F1 présentent un phénotype se rapprochant de celui de l'un des parents, nous croiserons en retour les F1 avec l'autre lignée parentale.

Chaque individu sera phénotypé précisément pour les paramètres quantitatifs (hématologiques, biochimiques, enzymatiques, histologiques...) retenus à la suite de l'étude des lignées congéniques et des F1 pour leur robustesse et leur valeur diagnostique. Les individus présentant des valeurs phénotypiques extrêmes feront l'objet d'une analyse de leur constitution génétique à l'aide de marqueurs microsatellites. Une analyse statistique permettra d'évaluer l'effet de chaque région du génome sur la valeur des différents paramètres et d'identifier celles qui sont associées à des différences de phénotype. C'est dans celles-ci que pourront être recherchés des gènes modificateurs de phénotype.

Conclusion

Chaque individu d'une population non consanguine est unique en ce qui concerne les différents aspects de sa biologie, que constituent sa morphologie, son comportement, sa physiologie, son développement ou encore sa sensibilité aux maladies quelles qu'elles soient. Beaucoup de ces caractères phénotypiques sont contrôlés par de multiples gènes et sont donc appelés caractères multigéniques ou caractères génétiques complexes. Cette dénomination les oppose aux phénotypes contrôlés par un seul gène (monogéniques) encore appelés caractères mendéliens. Toutefois la capacité que possède le fonds génétique à modifier l'expression phénotypique de ces caractères monogéniques montre qu'en réalité très peu de caractères mendéliens sont réellement monogéniques. Les gènes modificateurs de phénotype prennent chaque jour plus d'importance en génétique humaine ou animale. Les étudier permet de mieux expliquer la gamme de phénotypes que l'on peut rencontrer dans une maladie dite monogénique et éventuellement de développer de nouveaux outils diagnostiques et pronostiques chez l'Homme.

L'étude des gènes modificateurs offre également un moyen d'étudier la physiopathologie d'une maladie. L'analyse de leurs effets permet d'approfondir nos connaissances sur la régulation des grandes voies métaboliques et nous ouvrent la voie à une compréhension globale des systèmes biologiques dans la mesure où ils modulent un phénotype intégré.

Dans les vingt dernières années, beaucoup de gènes contrôlant des caractères monogéniques ont été clonés. En comparaison, bien peu de gènes participant au contrôle de caractères complexes ont été identifiés. En effet, l'identification de gènes modificateurs de phénotype est extrêmement complexe chez l'Homme pour au moins trois raisons. Tout d'abord, du fait que leur effet est très souvent apprécié à l'aide de variables quantitatives, leur localisation fait appel aux techniques d'identification de QTL (*Quantitative Trait Locus*) qui sont très lourdes et peu résolutive chez l'Homme. Ensuite, les effets observés résultent couramment de l'interaction entre plusieurs gènes, chacun d'eux ayant un effet faible sur le phénotype. Enfin, ces effets sont probablement modulés par des facteurs d'environnement ou par le passé médical des patients, ce qui accroît encore la dispersion des observations.

La situation chez les animaux domestiques, de compagnie, de loisir ou de rente est sensiblement la même que chez l'Homme : les pedigrees analysables sont de taille relativement restreinte et il peut exister une hétérogénéité génétique forte entre ces pedigrees. Les paramètres d'environnement sont omniprésents, il est difficile de recueillir l'anamnèse des cas cliniques et les échantillons biologiques ne sont pas toujours disponibles pour extraire de l'ADN. La recherche de gènes modificateurs de phénotype est donc aussi délicate chez les animaux domestiques que chez l'Homme et bien plus longue si l'on prend en compte les moyens disponibles. Ceci explique certainement, qu'à l'heure actuelle, aucune étude n'ait été menée dans ce sens chez des animaux tels que les bovins, les ovins, les porcins, le Cheval et les carnivores domestiques, espèces dont la génétique est en pleine expansion.

L'étude des gènes modificateurs de phénotype, bien que toujours longue et délicate, est toutefois plus simple dans des espèces modèles telles que les rongeurs de laboratoire (Rat ou Souris) Au titre de leurs atouts citons en particulier l'existence de nombreuses lignées consanguines, de cartes génétique et physique très riches et très précises, la possibilité de réaliser des croisements à façon de taille théoriquement illimitée et la possibilité de transférer à volonté un segment de chromosome d'une lignée consanguine à une autre grâce aux lignées congéniques. Ajoutons enfin que, les conditions d'élevage des rongeurs de laboratoire étant parfaitement standardisées, il est possible de s'affranchir des fluctuations liées aux paramètres d'environnement. Les conclusions que l'on peut tirer des études réalisées sur les rongeurs de laboratoire peuvent fournir des pistes de recherche pour le généticien humain. La recherche de gènes modificateurs de phénotype est une des approches permettant d'identifier des voies métaboliques impliquées dans le contrôle des fonctions biologiques chez les mammifères. Par exemple, la mise en évidence d'un gène modifiant de façon bénéfique le phénotype de la protoporphyrie érythropoïétique chez les souris pourrait peut-être permettre de démontrer l'importance d'une voie métabolique impliquée dans l'élimination de la protoporphyrine et plus généralement des pigments biliaires. Ces voies métaboliques intégrées interviennent dans la modulation du phénotype de maladies génétiques mendéliennes mais aussi dans des maladies génétiques complexes ou de nombreux gènes interviennent pour composer un phénotype particulier (hypertension, diabète, auto-immunité). Ces voies métaboliques, identifiées grâce à l'étude des gènes modificateurs, peuvent alors devenir le point de départ de la recherche d'agents thérapeutiques aux applications très larges. Ces nouvelles cibles thérapeutiques permettront sûrement de développer des médicaments utilisables chez l'Homme mais aussi chez les animaux de compagnie.

Pour reprendre l'exemple précédent, la mise en évidence de gènes impliqués dans la régulation des fonctions d'excrétion biliaire permettrait de rechercher des médicaments utilisables pour soigner nombre de maladies hépato-biliaires humaines ou animales à déterminisme complexe.

Le champ d'action des gènes modificateurs de phénotype ne se limite donc pas à la modulation d'un phénotype à déterminisme mendélien. Ces gènes interviennent dans des systèmes biologiques complexes impliqués dans de très nombreuses maladies multifactorielles. Leur intérêt dépasse le cadre de la Génétique. Ils permettront de faire avancer nos connaissances sur les grands mécanismes biologiques qui contrôlent la physiologie des organismes vivants et permettront le développement de nouvelles thérapeutiques.

Références bibliographiques

- (1) ADATO A, RASKIN L, PETIT C, BONNE-TAMIR B. Deafness heterogeneity in a Druze isolate from the Middle East: novel OTOF and PDS mutations, low prevalence of GJB2 35delG mutation and indication for a new DFNB locus. *Eur. J. Hum. Genet.* 2000, **8**, 437-442.
- (2) AGABA MK, KEMP SJ, BARENDSE W, TEALE A. Comparative mapping in cattle of genes located on human chromosome 18. *Mamm. Genome* 1997, **8**, 530-532.
- (3) ALKARADAGHI S, HANSSON M, NIKONOV S, JONSSON B, HEDERSTEDT L. Crystal structure of ferrochelatase: the terminal enzyme in heme biosynthesis. *Structure* 1997, **5**, 1501-1510.
- (4) AMOROSO EC, LOOSMORE RM, RIMINGTON C, TOOTH FRS, TOOTH BE. Congenital Porphyrria in Bovines : First Living Cases in Britain. *Nature* 1957, **180**, 230-231.
- (5) ARMSTRONG SC, JONSSON NN, BARRETT DC. Bovine congenital erythrocytic protoporphyria in a Limousin calf bred in the UK. *Vet. Rec.* 2002, **150**, 608-610.
- (6) BLOKS VW, PLOSCH T, VAN GOOR H, ROELOFSEN H, BALLER J, HAVINGA R, *et al.* Hyperlipidemia and atherosclerosis associated with liver disease in ferrochelatase-deficient mice. *J. Lipid Res.* 2001, **42**, 41-50.
- (7) BLOOMER JR, STRAKA JG, HILL HD, WEIMER MK, RUTH GR. Comparison of bile porphyrin concentrations in cattle and human beings with protoporphyria. *Am. J. Vet. Res.* 1990, **51**, 1144-1146.
- (8) BLOOMER JR, HILL HD, MORTON KO, ANDERSON-BURNHAM LA, STRAKA JG. The enzyme defect in bovine protoporphyria. Studies with purified ferrochelatase. *J. Biol. Chem.* 1987, **262**, 667-671.
- (9) BLOOMER JR, MORTON KO, REUTER RJ, RUTH GR. Bovine protoporphyria: documentation of autosomal recessive inheritance and comparison with the human disease through measurement of heme synthase activity. *Am. J. Hum. Genet.* 1982, **34**, 322-330.
- (10) BLOOMER JR, BONKOVSKY HL, EBERT PS, MAHONEY MJ. Inheritance in protoporphyria. Comparison of haem synthetase activity in skin fibroblasts with clinical features. *Lancet* 1976, **31**, 226-228.

- (11) BONKOVSKY HL, BLOOMER JR, EBERT PS, MAHONEY MJ. Heme Synthetase Deficiency in Human Protoporphyrin. Demonstration of the defect in liver and cultured skin fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 1975, **56**, 1139-1148.
- (12) BOULECHFAR S, LAMORIL J, MONTAGUTELLI X, GUENET JL, DEYBACH JC, NORDMANN Y, *et al.* Ferrochelatase Structural Mutant (Fech^{m1Pas}) in the House Mouse. *Genomics* 1993, **16**, 645-648.
- (13) BUCHANAN M, CRAWSHAW WM. Bovine congenital erythropoietic protoporphyria in a pedigree Limousin heifer. *Vet. Rec.* 1995, **136**, 640.
- (14) BULAJ ZJ, PHILLIPS JD, AJIOKA RS, FRANKLIN MR, GRIFFEN LM, GUINEE DJ, *et al.* Hemochromatosis genes and other factors contributing to the pathogenesis of porphyria cutanea tarda. *Blood* 2000, **95**, 1565-1571.
- (15) CAMADRO JM, LABBE P. Purification and Properties of Ferrochelatase from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 1988, **263**, 11675-11682.
- (16) CAMADRO JM. *Contribution à l'étude des étapes terminales de la voie de biosynthèse du protohème*. Thèse de Doctorat. Université Paris 7, Paris, 1989.
- (17) CHILDS S, WEINSTEIN BM, MOHIDEEN M, DONOHUE S, BONKOVSKY H, FISHMAN MC. Zebrafish dracula encodes ferrochelatase and its mutation provides a model for erythropoietic protoporphyria. *Curr. Biol.* 2000, **10**, 1001-1004.
- (18) CLARE NT, STEPHENS EH. Congenital Porphyria in Pigs. *Nature* 1944, **153**, 252-253.
- (19) COX TC, BAWDEN MJ, MARTIN A, MAY BK. Human Erythroid 5-Aminolevulinate Synthase - Promoter Analysis and Identification of an Iron-Responsive Element in the Messenger-Rna. *Embo J.* 1991, **10**, 1891-1902.
- (20) CRAWLEY AC, YOGALINGAM G, MULLER VJ, HOPWOOD JJ. Two mutations within a feline mucopolysaccharidosis type VI colony cause three different clinical phenotypes. *J. Clin. Invest.* 1998, **101**, 109-119.
- (21) DAILEY TA, DAILEY HA. Identification of [2Fe-2S] clusters in microbial ferrochelatases. *J. Bacteriol.* 2002, **184**, 2460-2464.

- (22) DAILEY HA, DAILEY TA, WU CK, MEDLOCK AE, WANG KF, ROSE JP, *et al.* Ferrochelatase at the millenium: structure, mechanisms and [2Fe-2S] clusters. *Cell. Mol. Life Sci.* 2000, **57**, 1909-1926.
- (23) DAILEY HA, FINNEGAN MG, JOHNSON MK. Human Ferrochelatase Is an Iron-Sulfur Protein. *Biochemistry* 1994, **33**, 403-407.
- (24) DAILEY HA, SELLERS VM, DAILEY TA. Expression and chracterization of normal and two human protoporphyrinic ferrochelatases. *J. Biol. Chem.* 1994, **269**, 390-395.
- (25) DAVIS AP, JUSTICE MJ. Mouse alleles: if you've seen one, you haven't seen them all. *Trends Genet.* 1998, **14**, 438-441.
- (26) DAY AL, PARSONS BM, DAILEY HA. Cloning and characterization of Gallus and Xenopus ferrochelatases: Presence of the [2Fe-2S] cluster in nonmammalian ferrochelatase. *Arch. Biochem. Biophys.* 1998, **359**, 160-169.
- (27) DE VERNEUIL H, MOREAU-GAUDRY F, GED C. Modèle de la porphyrie érythropoïétique congénitale pour le transfert de gènes dans les cellules hématopoïétiques. *Transfus. Clin. Biol.* 1997, **4**, 263-266.
- (28) DE VERNEUIL H, BOURGEOIS F, DE ROOIJ F. Characterization of a new mutation (R292G) and a deletion at the human uroporphyrinogen decarboxylase locus in two patients with hepatoerythropoietic porphyria. *Hum. Genet.* 1992, **89**, 548-552.
- (29) DERRIEN E. Note préliminaire sur quelques faits nouveaux pour l'histoire naturelle des porphyries animales. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 1924, **91**, 634-636.
- (30) DIETRICH WF, LANDER ES, SMITH JS, MOSER AR, GOULD KA, LUONGO C, *et al.* Genetic Identification of *Mom-1* a Major Modifier Locus Affecting *Min*-Induced Intestinal Neoplasia in the Mouse. *Cell* 1993, **75**, 631-639.
- (31) ELDER GH, SMITH SG, SMYTH SJ. Laboratory Investigation of the Porphyrrias. *Ann. Clin. Biochem.* 1990, **27**, 395-412.
- (32) ELDER GH, MEISSNER PN. The acute porphyrias. *Lancet* 1997, **349**, 1613-1617.
- (33) FERREIRA GC, FRANCO R, LLOYD SG, PEREIRA AS, MOURA I, MOURA JGG, *et al.* Mammalian Ferrochelatase, a New Addition to the Metalloenzyme Family. *J. Biol. Chem.* 1994, **269**, 7062-7065.

- (34) FERREIRA GC, FRANCO R, LLOYD SG, MOURA I, MOURA JJG, HUYNH BH. Structure and Function of Ferrochelatase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1995, **27**, 221-229.
- (35) FERREIRA GC. Ferrochelatase. *Int J. Biochem. Cell Biol.* 1999, **31**, 995-1000.
- (36) FONTANELLAS A, MENDEZ M, MAZURIER F, CARIO-ANDRE M, NAVARRO S, GED C, *et al.* Successful therapeutic effect in a mouse model of erythropoietic protoporphyria by partial genetic correction and fluorescence-based selection of hematopoietic cells. *Gene Ther.* 2001, **8**, 618-626.
- (37) FONTANELLAS A, MAZURIER F, LANDRY M, TAINÉ L, MOREL C, LAROU M, *et al.* Reversion of hepatobiliary alterations by bone marrow transplantation in a murine model of erythropoietic protoporphyria. *Hepatology* 2000, **32**, 73-81.
- (38) FOURIE PJJ. Bovine Congenital Porphyrinuria (Pink Tooth) Inherited as a Recessive Character. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 1939, **13**, 383-398.
- (39) FOURIE PJJ. The Occurrence of Congenital Porphyrinuria (Pink Tooth) in Cattle in South Africa (Swaziland). *Onderstepoort J. Vet. Res.* 1936, **7**, 535-566.
- (40) FRANCIS PJ, BERRY V, BHATTACHARYA SS, MOORE AT. The genetics of childhood cataract. *J. Med. Genet.* 2000, **37**, 481-488.
- (41) GIDDENS WEJ, LABBE RF, SWANGO LJ, PADGETT GA. Feline congenital erythropoietic porphyria associated with severe anemia and renal disease. Clinical, morphologic, and biochemical studies. *Am. J. Pathol.* 1975, **80**, 367-386.
- (42) GLAZIER AM, NADEAU JH, AITMAN TJ. Finding Genes That Underlie Complex Traits. *Science* 2002, **298**, 2345-2349.
- (43) GLENN BL, GLENN HG, OMTVEDT IT. Congenital Porphyrinuria in the Domestic Cat (*Felis catus*): Preliminary Investigations on Inheritance Pattern. *Am. J. Vet. Res.* 1968, **29**, 1653-1657.
- (44) GOUYA L, PUY H, ROBREAU AM, BOURGEOIS M, LAMORIL J, DA SILVA V, *et al.* The penetrance of dominant erythropoietic protoporphyria is modulated by expression of wildtype FECH. *Nat. Genet.* 2002, **30**, 27-28.
- (45) GOUYA L, PUY H, LAMORIL J, DA SILVA V, GRANDCHAMP B, NORDMANN Y, *et al.* Inheritance in erythropoietic protoporphyria: A common wild-type ferrochelatase allelic variant with low expression accounts for clinical manifestation. *Blood* 1999, **93**, 2105-2110.

- (46) GOUYA L, DEYBACH JC, LAMORIL J, DASILVA V, BEAUMONT C, GRANDCHAMP B, *et al.* Modulation of the phenotype in dominant erythropoietic protoporphyria by a low expression of the normal ferrochelatase allele. *Am. J. Hum. Genet.* 1996, **58**, 292-299.
- (47) GOUYA L. *Bases moléculaires de la protoporphyrie érythropoïétique humaine.* Thèse de Doctorat. Université Paris 6, Paris, 2000.
- (48) GROSS U, HOFFMANN GF, DOSS MO. Erythropoietic and hepatic porphyrias. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2000, **23**, 641-661.
- (49) GROSS U, FRANK M, DOSS MO. Hepatic complications of erythropoietic protoporphyria. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 1998, **14**, 52-57.
- (50) HAEGER-ARONSEN B. Erythropoietic Protoporphyria. *Am. J. Med.* 1963, **35**, 450-454.
- (51) HAFFTER P, GRANATO M, BRAND M, MULLINS MC, HAMMERSCHMIDT M, KANE DA, *et al.* The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio.* *Development* 1996, **123**.
- (52) HAFNER S, BOUNOUS D, KELLEY LC, CAMPAGNOLI R. Hepatic protoporphyrin accumulation in a broiler chicken. *Avian Diseases.* 1993, **37**, 900-904.
- (53) HAMILTON JW, BEMENT WJ, SINCLAIR PR, SINCLAIR JF, ALCEDO JA, WETTERHAHN KE. Heme Regulates Hepatic 5-Aminolevulinate Synthase Messenger-Rna Expression by Decreasing Messenger-Rna Half-Life and Not by Altering Its Rate of Transcription. *Arch. Biochem. Biophys.* 1991, **289**, 387-392.
- (54) HARBIN BM, DAILEY HA. Orientation of Ferrochelatase in Bovine Liver Mitochondria. *Biochemistry* 1985, **24**, 366-370.
- (55) HOULSTON RS, TOMLINSON IP. Modifier gene in human: strategies for identification. *Eur. J. Hum. Genet.* 1998, **6**, 80-88.
- (56) IKEDA I, ZHENG QY, ZUBERI AR, JOHNSON KR, NAGGERT JK, NISHINA PM. Microtubule-associated protein 1A is a modifier of tubby hearing (moth1). *Nat. Genet.* 2002, **30**, 401-405.
- (57) INGIER A. Ochronose bei Tieren. *Zieglers Beitrage zur Pathologischer Anatomie* 1911, **51**, 199-208.

- (58) JENKINS MM, LEBOEUF RD, RUTH GR, BLOOMER JR. A novel stop codon mutation (X417L) of the ferrochelatase gene in bovine protoporphyria, a natural animal model of the human disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1998, **1408**, 18-24.
- (59) JORGENSEN SK. Studies on congenital porphyria in cattle in Denmark. II. Clinical features, morbid anatomy and chemical pathology. *Br. Vet. J.* 1961, **117**, 61-73.
- (60) JORGENSEN SK. Congenital porphyria in pigs. *Br. Vet. J.* 1959, **115**, 160-175.
- (61) KAPPAS A, SASSA S, GALBRAIGHT RA: The porphyrias. *In: The metabolic and molecular basis of inherited diseases*. New York. Mac Graw-Hill Inc ed, 1995, 2103-2142.
- (62) KOMATSU H, SAJIMA Y, IMAMURA K, MASUDA H, YONEI Y, DOHMORI K, *et al.* An ultrastructural study of the liver in erythropoietic protoporphyria. *Medical Electron Microscopy* 2000, **33**, 32-38.
- (63) KOOLS AM, STRAKA JG, HILL HD, WHITMER DI, HOLMAN RT, BLOOMER JR. Modulation of Hepatic Ferrochelatase Activity by Dietary Manipulation of Mitochondrial Phospholipid Fatty Acyl Groups. *Hepatology* 1989, **9**, 557-561.
- (64) KORSTANJE R, PAIGEN B. From QTL to gene: the harvest begins. *Nat. Genet.* 2002, **31**, 235-236.
- (65) LAMORIL J, BOULECHFAR S, DEVERNEUIL H, GRANDCHAMP B, NORDMANN Y, DEYBACH JC. Human Erythropoietic Protoporphyria - 2-Point Mutations in the Ferrochelatase Gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991, **181**, 594-599.
- (66) LATHROP JT, TIMKO MP. Regulation by Heme of Mitochondrial Protein-Transport through a Conserved Amino-Acid Motif. *Science* 1993, **259**, 522-525.
- (67) LEVIN EY. Comparative aspects of porphyria in man and animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1974, **241**, 347-359.
- (68) LEVIN EY. Uroporphyrinogen III Cosynthetase in Bovine Erythropoietic Porphyria. *Science* 1968, **161**, 907-908.
- (69) LEVIN EY, FLYGER V. Uroporphyrinogen 3 cosynthetase activity in the fox squirrel (*Sciurus niger*). *Science*. 1971, **174**, 59-60.
- (70) LI FM, LIM CK, PETERS J. An HPLC assay for rat liver ferrochelatase activity. *Biomed. Chromatogr.* 1987, **2**, 164-168.

- (71) LIM HW. Pathophysiology of Cutaneous Lesions in Porphyrrias. *Semin. Hematol.* 1989, **26**, 114-119.
- (72) LINDBERG RL, MARTINI R, BAUMGARTNER M, ERNE B, BORG J, ZIELASEK J, *et al.* Motor neuropathy in porphobilinogen deaminase-deficient mice imitates the peripheral neuropathy of human acute porphyria. *J. Clin. Invest.* 1999, **103**, 1127-1134.
- (73) LINDBERG RL, PORCHER C, GRANDCHAMP B, LEDERMANN B, BURKI K, BRANDNER SA, A., *et al.* Porphobilinogen deaminase deficiency in mice causes a neuropathy resembling that of human hepatic porphyria. *Nat. Genet.* 1996, **12**, 195-199.
- (74) LUONGO C, GOULD KA, SU LK, KINZLER KW, VOGELSTEIN B, DIETRICH WF, *et al.* Mapping of multiple intestinal neoplasia (Min) to proximal chromosome 18 of the mouse. *Genomics* 1993, **15**, 3-8.
- (75) MACPHEE M, CHEPENIK KP, LIDDELL RA, NELSON KK, SIRACUSA LD, BUCHBERG AM. The Secretory Phospholipase A2 Gene Is a Candidate for the *Mom1* Locus, a Major Modifier of *Apc^{Min}*-Induced Intestinal Neoplasia. *Cell* 1995, **81**, 957-966.
- (76) MAGNESS ST, MAEDA N, BRENNER DA. An exon 10 deletion in the mouse ferrochelatase gene has a dominant-negative effect and causes mild protoporphyria. *Blood* 2002, **100**, 1470-1477.
- (77) MAGNESS ST, BRENNER DA. Targeted disruption of the mouse ferrochelatase gene producing an exon 10 deletion. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis.* 1999, **1453**, 161-174.
- (78) MAGNUS IA, JARRETT A, PRANKERD TAJ, RIMINGTON C. Erythropoietic Protoporphyria. A New Poprphyria Syndrome with Solar Urticaria due to Protoporphyrinaemia. *Lancet* 1961, **26**, 448-451.
- (79) MAINES MD. The heme oxygenase system: A regulator of second messenger gases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1997, **37**, 517-554.
- (80) MEDLOCK AE, MEISSNER PN, DAVIDSON BP, CORRIGALL AV, DAILEY HA. A mouse model for South African (R59W) variegate porphyria: Construction and initial characterization. *Cell. Mol. Biol.* 2002, **48**, 71-78.
- (81) MEERMAN L, KOOPEN NR, BLOKS V, VAN GOOR H, HAVINGA R, WOLTHERS BG, *et al.* Biliary fibrosis associated with altered bile composition in a mouse model of erythropoietic protoporphyria. *Gastroenterology* 1999, **117**, 696-705.

- (82) MEYER UA, SCHMID R. The porphyrias. *In: STANBURRY JB, WYNGAARDEN B, FREDERICKSON DS, editors. The metabolic basis of inherited diseases.* New York: Academic Press; 1978, 1166-1221.
- (83) MOORE WE. Metabolic acidosis in bovine erythropoietic porphyria during the neonatal period. *Am. J. Vet. Res.* 1970, **31**, 1561-1567.
- (84) MOSER AR, PITOT HC, DOVE WF. A dominant mutation that predispose to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* 1990, **247**, 322-324.
- (85) NORDMANN Y: Porphyrines et Porphyrinuries. *In: Encycl. Med. Chir. Endocrinologie et Nutrition* Edited by TECHNIQUES E. pp. 14. Paris-France; 1994: 14.
- (86) OWEN LN, STEVENSON DE, KEILIN J. Abnormal Pigmentation and Fluorescence in Canine Teeth. *Res. Vet. Sci.* 1962, **3**, 139-146.
- (87) PAWLIUK R, BACHELOT T, WISE RJ, MATHEWS-ROTH MM, LEBOULCH P. Long-term cure of the photosensitivity of murine erythropoietic protoporphyria by preselective gene therapy. *Nat. Med.* 1999, **5**, 768-773.
- (88) PENCE ME, LIGGETT AD. Congenital erythropoietic protoporphyria in a Limousin calf. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2002, **221**, 277.
- (89) PHILLIPS JD, JACKSON LK, BUNTING M, FRANKLIN MR, THOMAS KR, LEVY JE, *et al.* A mouse model of familial porphyria cutanea tarda. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001, **98**, 259-264.
- (90) PIMSTONE NR, SAICHEUR T, HESS E, SCHUERMAN T, LARKIN E, DESNICK RJ, *et al.* A mouse model for human congenital erythropoietic porphyria. *Hepatology* 1996, **23**, I-93.
- (91) PONKA P. Tissue-Specific Regulation of Iron Metabolism and Heme Synthesis: Distinct Control Mechanisms in Erythroid Cells. *Blood* 1997, **89**, 1-25.
- (92) POULOS V, LOCKWOOD WH. A rapid method for estimating red blood cell porphyrin. *J. Biochem. (Tokyo).* 1980, **12**, 1049-1050.
- (93) RANSOM DG, HAFFTER P, ODENTHAL J, BROWNLIE A, VOGELSANG E, KELSH RN, *et al.* Characterization of zebrafish mutants with defects in embryonic hematopoiesis. *Development* 1996, **123**, 311-319.

- (94) RELYEA MJ, MILLER J, SUNDBERG JP, BOGGESS D. Necropsy Methods for Laboratory Mice: Biological Characterization of a New Mutation. *In*: SUNDBERG JP, BOGGESS D, editors. *Systematic Approach to Evaluation of Mouse Mutations*. Boca Raton: CRC Press, 2000, 57-89.
- (95) RICHARD E, MENDEZ M, MAZURIER F, MOREL C, COSTET P, XIA P, *et al.* Gene therapy of a mouse model of protoporphyria with a self- inactivating erythroid-specific lentiviral vector without preselection. *Mol. Ther.* 2001, **4**, 331-338.
- (96) ROELS S, HASSOUN A, HOORENS J. Accumulation of protoporphyrin isomers I and III, and multiple decarboxylation products of uroporphyrin in a case of porphyria in a slaughtered pig. *Zentralbl. Veterinarmed. A* 1995, **42**, 145-151.
- (97) ROMEO G, GLENN BL, LEVIN EY. Uroporphyrinogen 3 cosynthetase in asymptomatic carriers of congenital erythropoietic porphyria. *Biochem. Genet.* 1970, **4**, 719-726.
- (98) RUTH GR, SCHWARTZ S, STEPHENSON B. Bovine protoporphyria: the first nonhuman model of this hereditary photosensitizing disease. *Science* 1977, **198**, 199-201.
- (99) SAMMAN S, FUSSEL SH, ROSE CI. Porphyria in a New Zealand White rabbit. *Can. Vet. J.* 1991, **32**, 622-623.
- (100) SARKANY RPE, ALEXANDER GJM, COX TM. Recessive Inheritance of Erythropoietic Protoporphyria with Liver-Failure. *Lancet* 1994, **344**, 958-959.
- (101) SCHELCHER F, DELVERDIER M, BEZILLE P, CABANIE P, ESPINASSE J. Observation on bovine congenital erythrocytic protoporphyria in the blonde d'Aquitaine breed. *Vet. Rec.* 1991, **129**, 403-407.
- (102) SCHMEY M. Über Ochronose bei Mensch und Tier. *Frankf. Z. Pathol.* 1913, **12**, 218-238.
- (103) SCRIVER CR, WATERS PJ. Monogenic traits are not simple - lessons from phenylketonuria. *Trends Genet.* 1999, **15**, 267-272.
- (104) SELLERS VM, WANG KF, JOHNSON MK, DAILEY HA. Evidence that the fourth ligand to the [2Fe-2S] cluster in animal ferrochelatase is a cysteine - Characterization of the enzyme from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 1998, **273**, 22311-22316.
- (105) SHEMIN D, RITTENBERG D. The biological utilization of glycine for the synthesis of the protoporphyrin of hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 1946, **166**, 621-636.

- (106) SHIBUYA H, NONNEMAN D, TAMASSIA M, ALLPHIN OL, JOHNSON GS. The coding sequence of the bovine ferrochelatase gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1995, **1231**, 117-120.
- (107) SHIOZAWA M, MIYAZAWA T, KOEDA T, TAKAHASHI M, FUJIWARA H. Protoporphyrinic disorder in livers of broiler chickens. *J. Vet. Med. Sci.* 1995, **57**, 549-551.
- (108) SILVER LM. *Mouse Genetics*. Oxford: Oxford University Press, 1995.
- (109) SRIVASTAVA G, BORTHWICK IA, MAGUIRE DJ, ELFERINK CJ, BAWDEN MJ, MERCER JFB, *et al.* Regulation of 5-Aminolevulinate Synthase Messenger-Rna in Different Rat-Tissues. *J. Biol. Chem.* 1988, **263**, 5202-5209.
- (110) SRIVASTAVA G, BORTHWICK IA, BROOKER JD, WALLACE JC, MAY BK, ELLIOTT WH. Hemin inhibits transfer of pre-delta-aminolevulinate synthase into chick embryo liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983, **117**, 344-349.
- (111) STEINBERG MH, HEBBEL RP. Clinical Diversity of Sickle Cell Anemia. Genetic and Cellular Modulation of Disease Severity. *Am. J. Hematol.* 1983, **14**, 405-416.
- (112) STRAKA JG, HILL HD, KRIKAVA JM, KOOLS AM, BLOOMER JR. Immunochemical studies of ferrochelatase protein: characterization of the normal and mutant protein in bovine and human protoporphyria. *Am. J. Hum. Genet.* 1991, **48**, 72-78.
- (113) SU LK, KINZLER KW, VOGELSTEIN B, PREISINGER AC, MOSER AR, LUONGO C, *et al.* Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* 1992, **256**, 668-670.
- (114) TAKETANI S, MOHRI T, HIOKI K, TOKUNAGA R, KOHNO H. Structure and transcriptional regulation of the mouse ferrochelatase gene. *Gene* 1999, **227**, 117-124.
- (115) TAKETANI S, NAKAHASHI Y, OSUMI T, TOKUNAGA R. Molecular-Cloning, Sequencing, and Expression of Mouse Ferrochelatase. *J. Biol. Chem.* 1990, **265**, 19377-19380.
- (116) TAKETANI S, TANAKA-YOSHIOKA A, MASAKI R, TASHIRO Y, TOKUNAGA R. Association of ferrochelatase with complex I in bovine heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1986, **883**, 277-283.
- (117) TENNANT BC. Lessons from the porphyrias of animals. *Clin. Dermatol.* 1998, **16**, 307-315.
- (118) TOBIAS G. Congenital Porphyria in a Cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1964, **145**, 462-463.

- (119) TURNER WJ. Studies on porphyria. I. Observations on the fox squirrel, *Sciurus niger*. *J. Biol. Chem.* 1937, **118**, 519-530.
- (120) TUTOIS S, MONTAGUTELLI X, DASILVA V, JOUAULT H, ROUYERFESSARD P, LEROYVIARD K, *et al.* Erythropoietic Protoporphyrin in the House Mouse - a Recessive Inherited Ferrochelatase Deficiency with Anemia, Photosensitivity, and Liver-Disease. *J. Clin. Invest.* 1991, **88**, 1730-1736.
- (121) TUTOIS S. *L'induction de mutations chez la souris. Production de modèles animaux. Intérêt pour l'étude du développement.* Thèse de Doctorat. Université de Clermont Ferrand II, Clermont Ferrand, 1990.
- (122) WANG H, LONG Q, MARTY SD, SASSA S, LIN S. A zebrafish model for hepatoerythropoietic porphyria. *Nat. Genet.* 1998, **20**, 239-243.
- (123) WEINSTEIN BM, SCHIER AF, ABDELILAH S, MALICKI J, SOLNICA-KREZEL L, STEMPLER DL, *et al.* Hematopoietic mutations in the zebrafish. *Development* 1996, **123**, 303-309.
- (124) WITH TK. On porphyrins in the feathers of owls and bustards. *Int. J. Biochem.* 1978, **9**, 893-895.
- (125) WU CK, DAILEY HA, ROSE JP, BURDEN A, SELLERS VM, WANG BC. The 2.0 angstrom structure of human ferrochelatase, the terminal enzyme of heme biosynthesis. *Nat. Struct. Biol.* 2001, **8**, 156-160.
- (126) YAMAMOTO M, HAYASHI N, KIKUCHI G. Translational inhibition by heme of the synthesis of hepatic delta-aminolevulinic synthase in a cell-free system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983, **115**, 225-231.
- (127) YAMASHITA C, SHIMAZAKI H, MIYAKE T, SAITOH M, SAHEKI Y, ISHITANI R. Congenital porphyria in swine. *Jpn. J. Vet. Res.* 1980, **42**, 353-359.

LA MUTATION *FERROCHELATASE DEFICIENCY* DE LA SOURIS DE LABORATOIRE : UN MODELE DE PROTOPORPHYRIE ERYTHROPOÏËTIQUE

NOM et Prénom : ABITBOL Marie

Résumé :

La mutation « *ferrochelatase deficiency* » de la Souris, apparue dans une lignée proche de BALB/c suite à une expérience de mutagenèse à l'ENU, est un bon modèle de la protoporphyrie érythropoïétique de l'Homme, maladie génétique se traduisant par une photosensibilité et des complications hépatiques majeures dans certains cas. Les souris mutantes présentent une photosensibilité, un ictère, une dilatation abdominale due à une hépato-splénomégalie et une anémie. Elles accumulent des quantités considérables de protoporphyrine, principalement dans le foie qui présente des lésions graves décelables par des examens cliniques et histologiques. A la suite de croisements entre différentes lignées consanguines de souris (BALB/c, C57BL/6, SJL/J), il a été observé que la sévérité du phénotype induit par la mutation est fortement influencée par le fonds génétique. Nous avons produit des lignées congéniques en introduisant la mutation « *ferrochelatase deficiency* » dans les deux fonds génétiques C57BL/6 et SJL/J. Nous avons analysé le phénotype de souris mutantes de différentes classes d'âge provenant des trois fonds génétiques BALB/c, C57BL/6 et SJL/J afin de caractériser les particularités de chaque lignée.

Nous avons observé des différences d'ordre clinique, hématologique, biochimique et histologique entre les souris des trois fonds génétiques.

A partir d'un modèle de protoporphyrie érythropoïétique transposé sur trois fonds génétiques distincts, nous avons développé trois modèles de protoporphyrie bien décrits qui permettent de mieux refléter la diversité des phénotypes observée chez l'Homme. Ces trois modèles vont nous permettre d'entreprendre une étude génétique en vue d'identifier, par une approche QTL, des régions du génome contrôlant ces différences.

Mots clés : souris, génétique, QTL, gène modificateur, porphyrie, ferrochélatase

Jury :

Président : Pr.
Directeur : Pr. Philippe BOSSE
Assesseur : Dr. Laurent TIRET
Invités : Dr. Xavier MONTAGUTELLI
Dr. Florence BERNEX

Adresse de l'auteur :

Mlle Marie ABITBOL
10 Avenue des Fauvettes
93360 Neuilly Plaisance

THE *FERROCHELATASE DEFICIENCY* MUTATION , A MOUSE MODEL FOR HUMAN ERYTHROPOIETIC PROTOPORPHYRIA

SURNAME : ABITBOL

Given name : Marie

Summary:

The *ferrochelatase deficiency* mutation of the mouse, which arose in a genetic background very close from the BALB/cJ inbred strain, after mutagenic treatment with ethylnitrosourea, is a good model for human erythropoietic protoporphyria. Mutant mice exhibit photo-sensibility, icterus, enlarged abdomen (due to hepato and splenomegaly) and anemia. While transferring the mutation into several inbred backgrounds (BALB/c, C57BL/6, SJL/J) it became rapidly obvious that the severity of the phenotype is strongly modified. We established a series of congenic strains by introducing the *ferrochelatase deficiency* mutation into C57BL/6J and SJL/J genetic backgrounds and analyzed the phenotype of mutant mice of various classes of age, to characterize the peculiarities associated with each strain. We observed clinical, hematological, biochemical and histological differences among the mice from the three congenic strains.

From this model of erythropoietic protoporphyria studied in three backgrounds we have developed three models of protoporphyria which allow to better reflect the variety of phenotypes observed in man.

These models will help to undertake a genetic study with the aim of identifying, by a QTL approach, genomic regions controlling these differences.

Keywords: mice, genetic, QTL, modifier gene, porphyria, ferrochelatase

Jury :

Président : Pr.
Director : Pr. Philippe BOSSE
Assesor : Dr. Laurent TIRET
Guest: Dr. Xavier MONTAGUTELLI
Dr. Florence BERNEX

Author's address:

Ms Marie ABITBOL
10 Avenue des Fauvettes
93360 Neuilly Plaisance