



HAL
open science

Caractérisation d'un nouveau modèle murin de glycogénose de type 1a : du métabolisme glucidique à la thérapie génique

Élodie Mutel

► **To cite this version:**

Élodie Mutel. Caractérisation d'un nouveau modèle murin de glycogénose de type 1a : du métabolisme glucidique à la thérapie génique. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10005 . tel-00858006

HAL Id: tel-00858006

<https://theses.hal.science/tel-00858006>

Submitted on 4 Sep 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON
UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE BMIC

DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 18 janvier 2011

par

Melle Elodie MUTEL

Caractérisation d'un nouveau modèle murin de glycogénose de type 1a :
du métabolisme glucidique à la thérapie génique

Directeur de thèse : Mme Fabienne RAJAS

JURY : M. Fabrizio ANDREELLI, Président
M. Frank PILLEUL, Examineur
M. Philippe LABRUNE, Rapporteur
M. Nicolas FERRY, Rapporteur
M. Gilles MITHIEUX, Examineur
Mme Fabienne RAJAS, Directeur de thèse

Membre d'honneur invité : M. Peter SMIT

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. Collet

M. le Professeur J-F. Mornex

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation

Département de Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut de Science Financière et d'Assurance

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. le Professeur F. Gieres

Directeur : M. le Professeur C. Gautier

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Directeur : M. N. Siauve

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Directeur : Mme S. Fleck

Directeur : M. le Professeur P. Hantzpergue

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M R. Bernard

Remerciements

Je remercie le Pr Philippe Labrune et le Dr Nicolas Ferry pour avoir accepté de juger mon travail de thèse et pour leurs conseils avisés. Je remercie également le Pr Frank Pilleul pour avoir accepté d'être membre de mon jury et le Pr Fabrizio Andreelli pour avoir suivi mon travail au cours de ces trois années et pour avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Un grand merci à Gilles Mithieux pour avoir cru en moi et m'avoir incité à reprendre mes études. Je garderai en mémoire la passion que tu mets dans ton travail et que tu sais si bien nous transmettre.

Un grand merci à ma directrice de thèse, Fabienne Rajas pour avoir été là durant ces quatre années et pour m'avoir soutenue dans les bons moments comme dans les moins bons. Merci de la confiance que tu m'as accordé et du temps consacré au quotidien.

Merci à Amandine et Carine pour tout ce que j'ai pu apprendre à vos côtés. Toujours disponibles, je vous remercie pour votre soutien et pour nos nombreuses discussions tant professionnelles que personnelles.

Merci à Maud pour cette complicité qui est née entre nous et pour tous les très bons moments que nous passons ensemble que ce soit en France ou en Espagne. Malgré la distance, tu étais toujours là pour me soutenir dans les moments de doute et de découragement. J'ai trouvé en toi une très grande amie sur qui je peux m'appuyer sans compter.

Merci à Julien et à Marta avec qui j'ai pu partager de nombreux moments de franche rigolade au cours de ces trois années.

Je remercie tous les membres de l'unité 855 : Armelle, Aya, Sylvie, Isabelle, Anne, Adeline, Valérie, Céline et Anne D avec qui j'ai eu le plaisir de travailler au quotidien. Merci aux « anciens » Fabien et Bruno et aux « nouveaux » Filipe, Cécile, Daisy et Julie. Merci à Marie-Ange pour son incroyable efficacité, son franc-parler et pour sa joie de vivre. Je remercie également Angèle, Chrystelle et Mickaël pour les soins qu'ils ont porté à nos petites souris et pour leur gentillesse.

Merci à Tuan Nguyen, Luciano Pirola et Sara Frodjo pour les collaborations que nous avons pu réalisées ensemble.

Je remercie l'association francophone des glycogénoses et notamment son président Mr Philippe Maes avec qui j'ai pu partager d'agréables moments lors des assemblées générales et des différentes manifestations auxquelles j'ai participé comme le grand raid Dentelles-Ventoux.

Je remercie tous mes amis et particulièrement Adeline, Nelly et Lucie pour être là et pour toutes ces bonnes soirées que l'on passe ensemble.

Un grand merci à mes parents, mes sœurs, ma grand-mère et Nicolas ainsi qu'à toute ma famille pour m'avoir permis d'en arriver ici aujourd'hui et pour votre soutien sans faille. Merci d'être là.

Merci au Pr Peter Smit pour l'intérêt porté à mon travail et pour sa présence aujourd'hui. Merci de me donner l'opportunité de poursuivre ce travail « glycogénosique ».

ABREVIATIONS

AAV : Adeno-Associated Virus – Virus adéno- associés
AAVr : AAV recombinant
ACC : Acetyl Coenzyme A Carboxylase
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNdb : Acide désoxyribonucléique double brin
ADNg : Acide désoxyribonucléique génomique
ADNsb : Acide désoxyribonucléique simple brin
AG : Acide Gras
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
CBP : CREB Binding Protein
C/EBP : CAAT/ Enhancer binding protein
ChIP : Chromatine Immunoprecipitation
ChREBP : Carbohydre responsive element binding protein
CMV : Cytomégalovirus
CRE : cAMP response element
CREB : cAMP response element binding protein
CRP : Protéine C réactive
CRTC2 : CREB regulated transcription coactivator 2
CTS : Central termination site
ES : Embryonic Stem
FAS : Fatty acid synthase
FIV : Feline immunodeficiency virus
G1P : Glucose-1 phosphate
G6P : Glucose-6 phosphate
G6Pase : glucose-6 phosphatase
G6PC : Sous-unité catalytique de la G6Pase
G6PT : G6P translocase
GLUT2 : Glucose transporter 2
GR : Glucocorticoïd receptor
GRE : Glucocorticoïd response element
GRU : Glucocorticoïd response unit
GSD : Glycogen storage disease – Glycogénose
HCA : Hepatocellular adenoma - Adénome hépatocellulaire
HCC : Hepatocellular carcinoma – Carcinome hépatocellulaire
HF/HS : High Fat/ High Sucrose
HIV : Human Immunodeficiency virus
HMGCoA synthase : 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase
HNF1 α : Hepatocyte nuclear factor 1 alpha
HNF4 : Hepatocyte nuclear factor 4
IGRP : Islet G6Pase related protein
IL6 : Interleukine 6
IMC : Indice de masse corporelle
IRM : Imagerie par résonance magnétique
ITR : Inverted terminal repeat
LFABP : Liver fatty acid binding protein
LTR : Long terminal repeat
LXR : Liver X receptor
MDH : Malate déhydrogénase

MOI : Multiplicity of infection
mTTR : murine Tranthyréine
PBS : Primer binding site
PEG : Production endogène de glucose
PEP : Phosphoenol pyruvate
PEPCKc : Phosphoénol pyruvate carboxykinase cytosolique
PHG : Production hépatique de glucose
Pi : Phosphate inorganique
PI3K : Phosphatidyl-inositol-3-kinase
PIG : Production intestinale de glucose
PKA : Protéine kinase A
PKB : Protéine kinase B
PPT: Polypurine tract
PRG : Production rénale de glucose
ROS : Reactive oxygen species – Espèces réactives de l'oxygène
RRE : Rev response element
RT-PCR : Reverse transcriptase- polymerase chain reaction
SA : Sérum albumine
SAA : Sérum amyloïde
scAAV : self complementary AAV
SRC2 : Stéroïd récepteur coactivator 2
SREBP : Sterol regulatory element binding protein
STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3
TG : Triglycérides
TGF β : Transforming growth factor beta
Trs : Terminal resolution site
TU : Transduced Unit
UGRP : Ubiquitous G6Pase related protein
Vg : Viral genome
VSV-G : Vesicular stomatitis virus- G glycoprotein
WPRE : Woodchuck post-transcriptionnal response element

SOMMAIRE

Avant Propos	3
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	5
I. La production endogène de glucose	6
I.1 Deux voies métaboliques.....	6
I.2 Les trois tissus glucoformateurs.....	8
I.3 Rôles différentiels des productions hépatique et intestinale de glucose dans le maintien de l'homéostasie glucidique.....	9
II. Régulations de la production endogène de glucose	11
II.1 Régulations hormonales.....	11
II.2 Régulations nutritionnelles.....	15
III. Le système enzymatique glucose-6 phosphatase	16
III.1 Le complexe glucose-6 phosphatase	17
III.2 Expression tissulaire	18
III.3 La famille de gènes G6PC	19
IV. La glycogénose de type 1	20
IV.1 Les différents types de glycogénoses	20
IV.2 Découverte de la glycogénose de type 1.....	21
IV.3 Biologie moléculaire.....	23
IV.4 Physiopathologie des GSD 1.....	24
IV.5 Traitements actuels.....	32
IV.6 Modèles animaux de GSD I	34
DEMARCHE EXPERIMENTALE	40
RESULTATS ET DISCUSSION	43
1ère partie : Caractérisation du modèle de souris invalidées pour le gène <i>G6pc</i> spécifiquement au niveau du foie	44
I. Génération du modèle de souris L- <i>G6pc</i> ^{-/-}	46
I.2. Génération des souris <i>G6pc</i> ^{lox}	47
I.3. Génération des souris invalidées spécifiquement pour le gène <i>G6pc</i> au niveau du foie	48
I.4 Génotypage des souris	49
II. Caractérisation du modèle de souris L- <i>G6pc</i> ^{-/-} : un modèle de GSD 1a hépatique.....	51
III. Conclusions et perspectives	61
2ème partie : Test de l'efficacité de vecteurs viraux recombinants dans le traitement des glycogénoses de type 1a.....	63
I Introduction à la thérapie génique du foie	65
I.1 Les voies de transfert de gènes	65
I.2 Les vecteurs de transfert	66
II. Etude de l'efficacité d'un vecteur lentiviral HIV-mTTR-hG6PC chez les souris L- <i>G6pc</i> ^{-/-} .	72
II.1 Protocole expérimental	72
II.2 Validation de la construction lentivirale	74
II.3 Efficacité du vecteur à long-terme sur le contrôle de la glycémie	77
III. Etude de l'efficacité d'un vecteur scAAV mTTR-hG6PC chez les souris L- <i>G6pc</i> ^{-/-}	78
III.1 Protocole expérimental	78

III.2 Validation de l'efficacité du vecteur scAAV2/8-mTTR-hG6PC.....	79
III.3 Efficacité du vecteur scAAV2/8-mTTR-hG6PC à long-terme chez les souris L-G6pc ^{-/-}	81
IV. Conclusions-Perspectives.....	82
3ème partie : Etude de l'homéostasie glucidique en absence de production hépatique de glucose chez les souris L-G6pc ^{-/-}	87
I. Introduction.....	88
II. Matériels et méthodes	89
II.1 Animaux et prélèvements des tissus	89
II.2 Etudes des paramètres plasmatiques	89
II.3 Dosage du glycogène hépatique	89
II.3 Mesure de la production endogène de glucose.....	90
II.4 Mesure de l'expression des gènes	91
II.5 Expériences d'immunoprécipitation de la chromatine.....	93
III. Résultats	94
III.1. Contrôle de la glycémie au cours du jeûne prolongé chez les souris L-G6pc ^{-/-}	94
III.2. Induction de la néoglucogenèse extra-hépatique chez les souris L-G6pc ^{-/-}	94
III.3. Le glucagon active la néoglucogenèse extra-hépatique chez les souris L-g6pc ^{-/-}	96
III.4. L'expression de la PEPCCK rénale est régulée par l'acidose	98
IV. Discussion- Conclusions	99
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	103
TRAVAUX PERSONNELS	108
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	112

Avant Propos

La production endogène de glucose (PEG) est une fonction physiologique cruciale, permettant de maintenir une glycémie constante à 5mM en moyenne, en dehors des périodes d'assimilation du glucose alimentaire. Deux voies métaboliques participent à cette production de glucose : la glycogénolyse, permettant la dégradation du glycogène hépatique et la néoglucogenèse, synthétisant le glucose à partir de précurseurs non glucidiques, tels que le pyruvate ou les acides aminés glucoformateurs. Seuls, le foie, les reins et l'intestin sont capables de produire du glucose. C'est la présence d'une enzyme clé, la glucose-6 phosphatase (G6Pase), spécifiquement exprimée dans ces trois tissus, qui peut rendre compte de cette fonction. La G6Pase catalyse la dernière réaction avant la libération du glucose dans la circulation sanguine, c'est-à-dire, l'hydrolyse du glucose-6 phosphate (G6P) en glucose et phosphate inorganique (Pi). Cette dernière réaction est commune à la glycogénolyse et à la néoglucogenèse. Le système G6Pase est un complexe multi-protéique localisé dans le réticulum endoplasmique, composé de deux sous-unités : une unité catalytique G6PC et une protéine associée transportant le G6P (G6PT). La position stratégique de cette enzyme, au carrefour des deux voies métaboliques de production de glucose, est associée au développement de deux pathologies « miroir » du métabolisme du glucose : la glycogénose de type 1 et le diabète de type 2.

La glycogénose de type 1, aussi connue sous le nom de maladie de Von Gierke, est une maladie génétique rare liée à une déficience d'activité G6Pase. Le type 1a est dû à des mutations dans le gène *G6pc* et le type 1b, à des mutations dans le gène *Slc37a4* (ou *G6pt*). Sa prévalence est de 1/ 100 000 cas ; elle se caractérise par des hypoglycémies sévères dues à l'absence de PEG, qui apparaissent dès les premières semaines de vie.

A l'opposé, le diabète de type 2, caractérisé par une hyperglycémie à jeun, est souvent associé à l'obésité. Ces deux pathologies sont en pleine expansion au niveau mondial, notamment liées à notre mode de vie sédentaire et à une mauvaise alimentation, riche en gras et en sucres. Aux Etats-Unis, la prévalence de l'obésité a doublé en 20 ans et actuellement, 36% de la population américaine est en surpoids et 27% est obèse. La France compte désormais près de 15 millions de personnes en surpoids (Indice de masse corporelle (IMC) entre 25 et 30) et 6,4 millions d'obèses (IMC>30) (Enquête ObEpi 2009). En France, le nombre de personnes atteintes de diabète de type 2 traitées représente plus de 2 millions

soit 4% de la population générale. Près de 80% des diabétiques de type 2 présentent une surcharge pondérale. La prévalence du diabète de type 2 est 3 et 7 fois plus importante si les personnes sont en surpoids et obèse, respectivement. Le diabète de type 2 se manifeste généralement chez l'adulte après 45 ans mais atteint aujourd'hui de plus en plus d'enfants et d'adolescents. Contrairement à la glycosurie de type 1, le diabète de type 2 est associé à une augmentation de la PEG, caractérisée par une augmentation du flux à travers la G6Pase hépatique (Clare et al., 2000).

Depuis les premiers travaux de Claude Bernard au XIX^{ème} siècle, la PEG est considérée comme une fonction unique et globale et est encore assimilée à la production hépatique de glucose. Cependant, dans certaines situations nutritionnelles telles que le jeûne prolongé et les régimes enrichis en protéines, la production extra-hépatique de glucose peut représenter plus de 50% de la production totale de glucose. Il est donc important de reconsidérer la contribution de la production hépatique dans le maintien de la glycémie.

Pour étudier la contribution de chaque organe, le foie, les reins et l'intestin, à la régulation de la glycémie, nous avons développé au laboratoire, des modèles originaux de souris invalidées pour le gène *G6pc*, spécifiquement au niveau d'un des trois tissus néoglucogéniques, en utilisant une stratégie CRE-LOX inducible par le tamoxifène. Le modèle de souris totalement invalidée pour le gène *G6pc* n'étant pas viable après le sevrage, mon travail de thèse était basé sur l'hypothèse que le modèle d'invalidation de la G6PC au niveau hépatique serait viable, grâce à la production extra-hépatique de glucose. Ce modèle de souris devrait également représenter un nouveau modèle animal de glycosurie de type 1a permettant l'étude du développement de la pathologie hépatique à long terme.

Ce travail est introduit par des données bibliographiques décrivant, dans une première partie, **la production endogène de glucose et sa régulation**, puis dans une deuxième partie, **le système enzymatique G6Pase** et enfin, dans une troisième partie, **la glycosurie de type 1**, de la physiopathologie de la maladie jusqu'aux traitements.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I. La production endogène de glucose

La PEG est une fonction physiologique cruciale dans la régulation de la glycémie. Elle permet de maintenir cette dernière à un niveau suffisant en dehors des repas et peut être inhibée durant les périodes d'assimilation du glucose afin d'éviter une augmentation de la glycémie lors de l'apport du glucose alimentaire. La glycémie doit être maintenue constante afin de fournir le glucose nécessaire à l'ensemble des tissus. De plus, certains tissus tels que le cerveau, les globules rouges et le muscle en contraction rapide ont un besoin continu en glucose. Durant les périodes inter-prandiales et/ou en période de jeûne, l'homéostasie glucidique est maintenue par l'organisme grâce à la PEG au sein de trois tissus glucoformateurs. Prenant place en premier lieu dans le foie, cette production est assurée par la dégradation des stocks de glycogène puis par la néoglucogenèse dans le foie, les reins et l'intestin.

I.1 Deux voies métaboliques

I.1.1 La glycolyse hépatique

La glycolyse permet la production de glucose à partir des stocks de glycogène hépatique (figure 1). Les travaux de Claude Bernard au XIX^{ème} siècle ont permis de mettre en évidence une fabrication chimique de glucose par le foie et il désigna par « glycogène » la matière à l'origine de cette production de glucose (Bernard, 1850). Le foie a la capacité de capter le glucose issu de l'absorption intestinale et apporté par la veine porte, puis de le stocker sous forme de glycogène. Le glycogène constitue donc une source d'énergie rapidement mobilisable en l'absence de glucose alimentaire, sous l'action du glucagon, pour permettre la distribution de glucose aux autres tissus. En revanche, les stocks de glycogène sont rapidement dégradés (12 heures de jeûne chez la souris, 24-48h de jeûne chez l'homme). Ce processus est majoritairement hépatique car la quantité de glycogène dans les reins et l'intestin reste négligeable.

Le glycogène est un polymère de molécules de glucose reliées par des liaisons alpha(1-4). Tous les 8 à 12 résidus glucose se met en place un branchement où les 2 unités glucose sont alors reliés par des liaisons alpha(1-6). Deux enzymes participent à la dégradation du

glycogène : l'enzyme débranchante (ou alpha amylo-1,6-glucosidase) et la glycogène phosphorylase. Cette dernière constitue le point de régulation majeur de la glycogénolyse. La glycogène phosphorylase permet la dégradation des unités glucose linéaires en glucose-1-phosphate (G1P). L' α -amylo-1,6-glucosidase agit au niveau des dextrines limites, catalysant tout d'abord une réaction transférase de 3 résidus glucose du branchement sur la chaîne linéaire. Le dernier résidu glucose relié par la liaison alpha(1-6) est ensuite libéré sous l'action de l'amylo-1,6-glucosidase (figure 2).

La dégradation du glycogène libère essentiellement du G1P et une faible quantité de glucose. Le G1P est ensuite isomérisé en glucose-6-phosphate (G6P) par la phosphoglucomutase (figure 1). La dernière enzyme impliquée dans la production de glucose est la glucose-6 phosphatase (G6Pase) qui permet l'hydrolyse du G6P en glucose et phosphate inorganique (Pi) avant la libération du glucose dans la circulation sanguine.

I.1.2 La synthèse *de novo* de glucose: la néoglucogenèse

La néoglucogenèse permet la synthèse *de novo* de glucose à partir de précurseurs non glucidiques tels que le pyruvate, le lactate, les acides aminés glucoformateurs et le glycérol (figures 3 et 5). Cette voie de synthèse fonctionne à l'inverse de la glycolyse qui est la voie d'oxydation du glucose. Ainsi, la plupart des réactions sont catalysées par des enzymes communes aux deux voies (figure 3). Seules trois réactions irréversibles sont caractéristiques de la néoglucogenèse et constituent ainsi des points clefs de régulation de cette voie métabolique. Il s'agit de :

1. la transformation du pyruvate en phosphoénolpyruvate (PEP) qui fait intervenir successivement la pyruvate carboxylase dans la mitochondrie et la phosphoénolpyruvate carboxykinase dans le cytosol (PEPCK-c),

2. la transformation du fructose-1,6 bisphosphate en fructose-6-phosphate catalysée par la fructose-1,6-bisphosphatase.

3. La dernière réaction, commune à la voie de la glycogénolyse et de la néoglucogenèse est catalysée par la G6Pase. L'expression de la G6Pase est restreinte au foie, au cortex rénal et à l'intestin grêle, conférant ainsi la capacité à ces trois tissus de libérer du glucose dans la circulation sanguine.

I.2 Les trois tissus glucoformateurs

I.2.1 Le foie

Le foie est généralement considéré comme étant le principal organe producteur de glucose. La production hépatique de glucose (PHG) mobilise les 2 voies métaboliques impliquées dans la PEG : la glycogénolyse et la néoglucogenèse (Nordlie et al., 1999). Sa contribution s'élève en effet à plus de 80% à l'état post-absorptif (12h chez l'homme et 6h chez le rat ou la souris après un repas), via la glycogénolyse. Si le jeûne se prolonge, le foie synthétise du glucose de novo à partir de 2 précurseurs majeurs : le lactate, produit par le métabolisme anaérobie et oxydé en pyruvate, et l'alanine issue de la protéolyse musculaire et constituant un des 2 acides aminés glucoformateurs majoritaires avec la glutamine. Si le jeûne perdure, le foie diminue sa production et est relayé par les reins et l'intestin grêle (figure 4) (Mithieux et al., 2006; Owen et al., 1969).

I.2.2 Les reins

La production rénale de glucose (PRG) représenterait 20 et 45% de la PEG chez des rats à l'état post-absorptif et après 24h de jeûne, respectivement (Kida et al., 1978). Si le jeûne se prolonge au-delà de 24 heures, cette proportion est maintenue (figure 4) (Mithieux et al., 2006; Pillot et al., 2009). Chez l'homme, à l'état post-absorptif, l'importance de la PRG reste sujette à controverse et serait comprise entre 5% (Ekberg et al., 1999) et 20% (Cersosimo et al., 1999). Cependant, une étude d'Owen et coll. a suggéré que le rein contribuerait à 45% de la PEG chez de jeunes obèses à jeun depuis 5 à 6 semaines (Owen et al., 1969). La PRG peut également contribuer pour la moitié de la PEG à l'état post-absorptif sous un régime riche en protéines (Pillot et al., 2009). En effet, sous l'effet des régimes riches en protéines, connus pour être bénéfique dans le cadre du diabète de type 2 (Gannon and Nuttall, 2004; Gannon et al., 2003; Nuttall and Gannon, 2004), une redistribution de la PEG au profit du rein et de l'intestin prend place, diminuant ainsi la PHG (Pillot et al., 2009). Le glucose néo-synthétisé par le rein est exclusivement d'origine néoglucogénique, principalement à partir de la glutamine et du lactate (Meyer et al., 2002; Stumvoll et al., 1998).

I.2.3 L'intestin grêle

Depuis de nombreuses années, les seuls organes connus pour avoir la capacité de produire du glucose étaient le foie et les reins puisque l'activité enzymatique G6Pase n'avait pu être mesurée de façon significative que dans ces organes. Grâce à l'identification du gène de la G6Pase (Shelly et al., 1993), de nouveaux outils moléculaires ont permis de mettre en évidence l'expression de cette enzyme, notamment au niveau de l'ARNm. C'est ainsi qu'en 1999, notre équipe a pu mettre en évidence la présence de cette enzyme dans l'intestin grêle chez le rat et chez l'homme (Rajas et al., 1999).

En situation post-absorptive, la contribution de l'intestin à la PEG est très faible, inférieure à 10% (Mithieux et al., 2006). Celle-ci devient très significative lors de jeûne prolongé et peut s'élever jusqu'à 20 et 35% de la PEG chez les rats à jeun pendant 48 et 72h, respectivement (figure 4) (Croset et al., 2001; Mithieux et al., 2004a). Les substrats néoglucogéniques majeurs utilisés par l'intestin sont la glutamine (80%) et le glycérol (20%) (figure 5) (Croset et al., 2001). En effet, l'intestin, qui exprime une isoforme de la glutaminase de haute affinité, est capable d'extraire la glutamine sanguine, en plus du glucose. L'oxydation incomplète de ces substrats permet aussi la production de lactate et d'alanine au niveau de la veine porte, qui sont les précurseurs néoglucogéniques majeurs du foie. Ainsi, le métabolisme de la glutamine, au niveau intestinal, peut contribuer à la fois, à la production de glucose par l'intestin et à la néoglucogénèse hépatique en lui fournissant ses substrats (figure 5) (Mithieux et al., 2004b).

De façon intéressante, tout comme le rein, la production intestinale de glucose (PIG) peut être fortement induite, dès l'état post-absorptif, chez le rat soumis à une alimentation riche en protéines. L'ingestion de protéines induit l'expression des enzymes clefs de la néoglucogénèse : PEPCk-c et G6Pase, se traduisant par une augmentation de la libération de glucose en veine porte à hauteur de 20% de la PEG totale (Mithieux et al., 2005).

I.3 Rôles différentiels des productions hépatique et intestinale de glucose dans le maintien de l'homéostasie glucidique

De nombreuses données récentes de la littérature ont permis de proposer un nouveau concept de la PEG dans le contrôle de l'homéostasie glucidique et énergétique. Selon ce concept, l'augmentation de la PHG serait « délétère », facteur d'élévation de la

glycémie et d'insulino-résistance. A l'inverse, l'augmentation de la PIG présenterait des effets bénéfiques dans le cadre de l'homéostasie glucidique et énergétique.

En effet, chez des patients diabétiques de type 2, Clore *et al.* ont mis en évidence une augmentation de l'activité G6Pase hépatique, associée à une diminution de la glucokinase hépatique, contribuant ainsi à une augmentation du flux de glucose, responsable de l'hyperglycémie des patients (Clore et al., 2000). Une étude très probante réalisée *in vivo*, par une technique adénovirale, a permis de mettre en évidence que la simple surexpression de la G6Pase au niveau hépatique, chez le rat, était suffisante à l'instauration d'anomalies métaboliques associées au pré-diabète (Trinh et al., 1998). De même, une surexpression de la PEPCK-c hépatique, chez la souris, entraîne une augmentation de la PHG conduisant au développement d'une sévère insulino-résistance et d'une intolérance au glucose (Sun et al., 2002b).

A l'opposé, des études récentes ont pu mettre en évidence le rôle bénéfique du glucose libéré en veine porte. En 2005, notre équipe a démontré que les régimes enrichis en protéines induisent spécifiquement la néoglucogenèse intestinale et rénale chez le rat. Cette étude a permis de démontrer le rôle majeur de la PIG dans l'effet anorexigène des protéines. Le glucose *per se* est une molécule « signal » clef, détectée en veine porte et capable de diminuer la prise alimentaire (Thorens and Larsen, 2004; Tordoff and Friedman, 1986). Ainsi, sous un régime hyperprotéique, le glucose libéré en veine porte à l'état post-absorptif est détecté via les capteurs hépatoporaux de glucose. Le signal « glucose portal » est transmis via des afférences nerveuses au niveau de l'hypothalamus, activant ainsi les noyaux hypothalamiques régulant la prise alimentaire (Mithieux et al., 2005). Une étude récente de notre équipe a pu mettre aussi en évidence une amélioration de la sensibilité hépatique à l'insuline, sous un régime riche en protéines, associée à une augmentation de la PIG (Pillot et al., 2009). Ceci est en accord avec le fait que l'augmentation de la PIG sous un régime riche en protéines n'entraîne pas de modification de la PEG totale et se traduit par une meilleure diminution de la PHG (Mithieux et al., 2005; Pillot et al., 2009).

L'effet bénéfique de la PIG a également été rapporté dans le cadre du by-pass gastrique, chirurgie de l'obésité. En effet, les patients obèses opérés par cette technique du by-pass gastrique (dérivation des nutriments directement dans le jéjunum distal avec exclusion du duodénum et du jéjunum proximal) présentent des sensations de faim diminuées, ainsi qu'une amélioration spectaculaire de leur paramètres glycémiques, bien avant une perte de

poids significative. Il a été rapporté, dans un modèle de souris obèses présentant ce type de chirurgie, une augmentation de l'expression de la G6Pase et de la PEPCK-c dans le jéjunum distal et l'iléon se traduisant par une augmentation de la libération de glucose en veine porte. Ces résultats expliquent la diminution de la prise alimentaire, également observées chez ces souris (Troy et al., 2008).

II. Régulations de la production endogène de glucose

L'organisme subit tout au long de la vie des alternances entre des périodes d'assimilation des repas et des périodes de jeûne. La régulation de la PEG est un facteur majeur dans le maintien de l'homéostasie glucidique, quelque soit l'état nutritionnel de l'organisme. De nombreux signaux hormonaux, nutritionnels et/ou nerveux existent afin de réguler finement cette production de glucose.

II.1 Régulations hormonales

II.1.1 L'insuline

Dans les situations physiologiques, l'insuline est une hormone sécrétée par les cellules beta du pancréas, au sein des îlots de Langerhans, sous le contrôle de la glycémie. En période d'absorption alimentaire, l'apport de glucose par l'intestin va instantanément stimuler la sécrétion d'insuline par les cellules β . L'insuline sécrétée induit une diminution de la glycémie en inhibant la PEG par deux mécanismes. Elle favorise l'utilisation du glucose par le foie en induisant la glycogénogenèse et, parallèlement, inhibe les enzymes de la néoglucogenèse.

➤ Régulations à court-terme

De façon très rapide, l'insuline est capable d'induire la synthèse de glycogène en régulant la phosphorylation des enzymes impliquées dans le métabolisme du glycogène. En activant la voie de signalisation PI3K/PKB, l'insuline induit la phosphorylation de la glycogène synthase kinase 3 (GSK3), inhibant ainsi son activité. Il en résulte une moindre phosphorylation de la glycogène synthase, qui passe sous sa forme activée permettant la synthèse du glycogène (Bollen et al., 1998).

L'insuline peut également réguler rapidement la glycolyse et la néoglucogenèse, notamment au niveau des enzymes phosphofructokinase et fructose-1,6-bisphosphatase. Il existe un activateur allostérique de la phosphofructokinase : le fructose-2,6-bisphosphate. Ce substrat est produit par l'enzyme bifonctionnelle phosphofructokinase II/Fructose-2,6-bisphosphatase. L'insuline augmente l'activité phosphofructokinase II de l'enzyme, permettant la synthèse de fructose-2,6-bisphosphate à partir de fructose-6-phosphate. Le fructose-2,6-bisphosphate produit va activer la phosphofructokinase, favorisant la voie de la glycolyse. Ainsi, sous l'effet de l'insuline, la voie de la glycolyse est activée, inhibant la voie de la néoglucogenèse.

➤ **Régulations à long-terme sur l'expression des gènes**

L'insuline peut également réguler l'expression des gènes de la néoglucogenèse au niveau de l'ARNm. En effet, le taux d'ARNm de la sous-unité catalytique de la G6Pase (G6PC), induit au cours du jeûne et du diabète insulino-prive, est normalisé par la réalimentation ou un traitement à l'insuline dans les trois tissus néoglucogéniques (Mithieux et al., 1996; Rajas et al., 1999). L'insuline inhibe la transcription des gènes clés de la néoglucogenèse : G6pase et PEPCK-c (*G6pc* et *Pck1*), à travers un élément de réponse à l'insuline IRE/IRS (Insulin Response Element/ Insulin Response Sequence) (figure 6). Le mécanisme moléculaire à l'origine de l'inhibition des gènes *G6pc* et *Pck1* implique le facteur de transcription Foxo-1 (Hall et al., 2000; Mounier and Posner, 2006). Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont démontré que Foxo-1 était lié au promoteur *G6pc*, *in situ*, et qu'un traitement à l'insuline entraînait la dissociation de Foxo-1 du promoteur (figure 6A) (Vander Kooi et al., 2003). La voie de la PI3K est impliquée dans ce mécanisme de régulation. En effet, Foxo-1 est phosphorylé par la PKB, entraînant sa translocation dans le cytoplasme et annulant ainsi son activité transcriptionnelle (Tang et al., 1999).

II.1.2 Le glucagon

Le glucagon est une hormone contre-régulatrice libérée lorsque la glycémie est basse et a pour rôle principal de stimuler la PHG. Il est synthétisé par les cellules alpha du pancréas. Une hyperglucagonémie est également retrouvée chez les patients diabétiques de type 2 et contribuerait au maintien de l'hyperglycémie (Jiang and Zhang, 2003). Ceci s'explique par le fait que l'insuline est un des facteurs permettant l'inhibition de la sécrétion

du glucagon. Dans les états diabétiques, la faible sécrétion d'insuline et/ou l'insulino-résistance serait responsable de l'absence d'inhibition de la libération du glucagon (Bansal and Wang, 2008). Le glucagon agit en se fixant à son récepteur transmembranaire couplé aux protéines G, ce qui active l'adénylate cyclase et entraîne l'augmentation intracellulaire de l'AMP cyclique (AMPC) (figure 7). La cible majeure de l'AMPC produit est la protéine kinase A (PKA). Le récepteur au glucagon a été identifié dans de nombreux tissus tels que le foie, le cerveau, l'intestin, le rein et le tissu adipeux (Burcelin et al., 1995), mais son rôle n'est aujourd'hui bien caractérisé que dans le foie.

L'effet du glucagon sur le rein est très controversé. En 1993, Mc Guinness et coll. ont démontré qu'une infusion chronique des hormones contre-régulatrices (glucagon, epinephrine, norepinephrine et cortisol) chez des chiens conscients entraînait une augmentation de trois fois de la libération de glucose par les reins. En revanche, en absence de glucagon dans la perfusion, aucune augmentation de la PRG n'a été observée, suggérant que la PRG peut être régulée par le glucagon (McGuinness et al., 1994; McGuinness et al., 1993). Cependant, une seconde étude n'a pas permis de démontrer une augmentation de la libération de glucose par le rein suite à une infusion de glucagon seul (Gustavson et al., 2004).

➤ **Régulations à court-terme**

A l'inverse de l'insuline, le glucagon peut, de façon très rapide, activer la glycogénolyse hépatique grâce à l'activation de la glycogène phosphorylase et à l'inhibition de la glycogène synthase, via la phosphorylation de ces enzymes par la PKA et la phosphorylase kinase (figures 1 & 5) (Bollen et al., 1998).

Le glucagon agit également au niveau de l'enzyme phosphofructokinase II/fructose-2,6-bisphosphatase, en activant l'activité fructose-2,6-bisphosphatase et donc en inhibant la synthèse de fructose-2,6-bisphosphate. Sous l'effet du glucagon, c'est la voie de la néoglucogénèse qui est activée et la glycolyse est inhibée.

➤ **Régulations à long-terme**

Au niveau transcriptionnel, le glucagon entraîne, via l'activation de la PKA, la phosphorylation de certains facteurs de transcription, tel que la protéine CREB (cAMP responsive Element Binding Protein), qui participent à la régulation de l'expression des

gènes impliqués dans la production de glucose. La protéine CREB phosphorylée peut se fixer sur les sites consensus CRE (cAMP response element), retrouvés sur les promoteurs *G6pc* et *Pck1* (figure 6). La réponse dépendante de la PKA peut être renforcée par d'autres facteurs de transcription, tels que HNF4 (hepatocyte nuclear factor 4) et C/EBP (CAAT/ enhancer binding protein) et de coactivateurs tels que CBP et CRTC2 pour induire la transcription des gènes de la G6PC et de la PEPCK dans le foie et l'intestin (Croniger et al., 1998; Gautier-Stein et al., 2005; Gautier-Stein et al., 2006; Wang et al., 2010; Yabaluri and Bashyam, 2010).

II.1.3 Les glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes sont des hormones stéroïdes naturelles et sont sécrétées par les cellules du cortex de la glande surrénale (Cortisol, corticostérone). Ils sont sécrétés à faibles doses mais celles-ci peuvent augmenter dans les situations de stress. Les glucocorticoïdes, tout comme le glucagon sont des hormones de contre-régulation. L'effet des glucocorticoïdes est majoritairement transcriptionnel sur les gènes de la néoglucogenèse, assuré par un récepteur nucléaire GR (Glucocorticoid Receptor). Les glucocorticoïdes peuvent diffuser au travers de la membrane plasmique puis se fixent sur leurs récepteurs cytoplasmiques permettant leur translocation dans le noyau. Les GR se lient sur le promoteur des gènes *G6pc* et *Pck1* via les unités de réponse aux glucocorticoïdes (GRU), composées de sites de liaison aux glucocorticoïdes (GRE) et de sites de liaisons à des facteurs accessoires tels que HNF1 et Foxo pour la G6PC et HNF3 β et HNF4 pour la PEPCK (figure 6) (Lin et al., 1998b; Stafford et al., 2001; Vander Kooi et al., 2005).

L'injection de glucocorticoïdes *in vivo* augmente l'activité G6Pase de 40% dans le foie de rats témoins et surrénalectomisés (Ashmore et al., 1956; Nordlie et al., 1965). La dexaméthasone, un glucocorticoïde de synthèse, augmente la transcription des gènes *G6pc* et *G6pt*, ainsi que l'activité du complexe G6Pase dans les cellules hépatomateuses (Garland, 1986; Kallwellis-Opara et al., 2003; Schmoll et al., 1996). De plus, l'association de la dexaméthasone et de l'AMPc potentialise l'induction de l'expression de la G6PC (Schmoll et al., 1999). L'inactivation du récepteur aux glucocorticoïdes, spécifiquement au niveau hépatique, entraîne un défaut d'induction des gènes *G6pc* et *Pck1* hépatiques en réponse à une injection de dexaméthasone. Au cours d'un jeûne prolongé, ces souris déficientes pour le GR hépatique sont également plus hypoglycémiques que les souris témoins dû à l'absence d'induction de la PEPCK (Opherk et al., 2004).

II.1.4 L'adrénaline et la noradrénaline

L'adrénaline est synthétisée par les cellules de la médullo-surrénale et sa sécrétion est sous la dépendance du système nerveux sympathique. Elle agit en tant que neurotransmetteur dans le système nerveux central et comme hormone dans la circulation sanguine. La noradrénaline est un neurotransmetteur libéré directement par les terminaisons nerveuses sympathiques. Leur sécrétion est significativement augmentée, tout comme celles du glucagon et des glucocorticoïdes, en situation de stress. Ces deux hormones exercent leur action de façon directe, suite à leur fixation sur les récepteurs α - et β -adrénergiques. La fixation à ces récepteurs induit l'activation de la voie AMPc dépendante (Nonogaki, 2000). L'adrénaline est responsable d'une augmentation de la glycolyse et de la néoglucogenèse dans le foie (Eigler et al., 1979; McGuinness et al., 1997; Nonogaki, 2000) et de la néoglucogenèse dans le rein (Cersosimo et al., 1999; Cersosimo et al., 1997). Elle permet également d'augmenter l'afflux de précurseurs néoglucogéniques au foie et au rein en agissant sur les tissus périphériques (McGuinness et al., 1997). La noradrénaline jouerait un rôle beaucoup moins important que l'adrénaline *in vivo* (McGuinness et al., 1997). L'adrénaline peut agir également de façon indirecte en stimulant la sécrétion de glucagon et en inhibant la sécrétion insulinaire, amplifiant ainsi la libération de glucose (Nonogaki, 2000). En 2001, une étude de notre laboratoire a démontré que l'infusion d'adrénaline augmentait de 80% la PEG, en association avec une augmentation de l'activité G6Pase hépatique, sans modification de la quantité de protéines G6PC. De plus, l'adrénaline est capable d'inverser les effets de l'insuline, en maintenant une PEG stable et en augmentant l'activité G6Pase hépatique dans une situation d'hypoglycémie induite par l'insuline (Bady et al., 2002).

II.2 Régulations nutritionnelles

II.2.1 Le glucose

Indépendamment de ses effets stimulateurs sur la sécrétion d'insuline, le glucose *per se* est capable d'inhiber sa production par le foie. Une étude, menée par Shulman et coll. chez des chiens à jeun depuis 36 heures, a démontré qu'une hyperglycémie induite, en présence de concentrations basales en insuline et glucagon, entraîne une diminution de plus de 50% de la PHG (Shulman et al., 1978). Ces résultats ont été confirmés chez des rats, en

situations post-absorptives, chez lesquels la PEG est diminuée de près de 60% par une hyperglycémie induite lors d'un clamp hyperglycémique (Rossetti et al., 1993). Une étude chez l'homme a également confirmé l'inhibition de la PHG suite à une hyperglycémie (Petersen et al., 1998). Les mécanismes d'auto-régulation supprimant la PHG impliquent une très forte diminution du flux à travers la glycogène phosphorylase (Petersen et al., 1998; Rossetti et al., 1993) et une augmentation du flux à travers la glucokinase (Rossetti et al., 1993).

II.2.2 Les acides gras

Les acides gras (AG) à longue chaîne induisent la néoglucogenèse hépatique *in vitro* et *in vivo*. En effet, l'oxydation des AG dans le foie conduit à la production de nombreux substrats clés tels que l'acétyl-CoA, le NADH et l'ATP. L'acétyl-CoA permet l'activation allostérique de la pyruvate carboxylase et le NADH est nécessaire à la formation de glycéraldéhyde-3P à partir de 1,3-bisphosphoglycérate dans la voie de la néoglucogenèse (Lam et al., 2003). Le rôle des AG dans la régulation de la PHG est controversé. Malgré l'induction de la néoglucogenèse, la PHG n'est pas nécessairement augmentée (Clore et al., 1991; Roden et al., 2000). Cependant, de nombreuses données suggèrent qu'une infusion d'« intralipides » et d'héparine augmente la PEG au cours d'un clamp euglycémique hyperinsulinémique (Lam et al., 2002; Rebrin et al., 1996). Une étude récente a également montré qu'une infusion de « Liposyn » (permettant une augmentation des AG plasmatiques) diminue de 50% l'effet inhibiteur de l'hyperglycémie sur la PEG (Kehlenbrink et al., 2009). De plus, les AG induisent des effets opposés selon leur degré de saturation. Ainsi, les AG saturés induisent une accumulation de l'ARNm *G6pc* *in vitro* ou *in vivo* (Chatelain et al., 1998; Massillon et al., 1997) alors que les AG polyinsaturés inhibent la transcription du gène (Rajas et al., 2002).

III. Le système enzymatique glucose-6 phosphatase

La glucose-6 phosphatase (G6Pase) est l'enzyme clé de la PEG et se trouve au carrefour des deux voies de synthèse : la glycogénolyse et la néoglucogenèse. Elle catalyse la dernière étape d'hydrolyse du G6P en glucose, permettant la libération de glucose dans la circulation sanguine.

III.1 Le complexe glucose-6 phosphatase

III.1.1 L'unité catalytique G6PC

Le gène *G6pc* codant la sous-unité catalytique de la G6Pase a été cloné en 1993, chez la souris (Shelly et al., 1993) puis chez l'homme (Lei et al., 1993). L'ADNc de la G6PC a également été identifié chez le rat (Lange et al., 1994), le chien (Kishnani et al., 1997) et le poisson (Nagl et al., 1999). Le gène est composé de 5 exons de longueurs semblables entre les espèces excepté pour le 5^{ème} contenant la région 3' non transcrite (figure 8A). Chez l'homme, il est localisé dans la région q21 du chromosome 17.

Le gène *G6pc* code pour une protéine de 357 acides aminés présentant une homologie de 92 à 95% entre les espèces (Lange et al., 1994). La protéine possède un signal de rétention dans le réticulum endoplasmique à son extrémité C-terminale (deux résidus lysine en -3 et -4). Sa masse prédictive est de 40kDa. Ceci est en accord avec l'étude de la migration de la [³²P]G6Pase par autoradiographie, qui a montré que sa masse moléculaire apparente était de 37kDa environ (Countaway et al., 1988; Mithieux et al., 1995).

L'étude de la séquence protéique de la G6PC a permis de suggérer fortement qu'il s'agirait d'une protéine composée de 9 hélices transmembranaires, dont le site catalytique est localisé dans la lumière du réticulum endoplasmique et consiste en 5 acides aminés hautement conservés : Lys⁷⁶, Arg⁸³, His¹¹⁹, Arg¹⁷⁰ et His¹⁷⁶ (figure 8B) (Ghosh et al., 2002; Hemrika and Wever, 1997; Pan et al., 1998).

III.1.2 Le transporteur de G6P : G6PT

Le gène *Slc37a4* codant la G6PT (G6P translocase) a été isolé et caractérisé en 1997, chez l'homme (Gerin et al., 1997), puis chez la souris et le rat (Lin et al., 1998a). Chez l'homme, il est localisé dans la région q23 du chromosome 11. Le gène est composé de 9 exons et code pour une protéine de 429 acides aminés, possédant un signal de rétention dans la membrane du réticulum endoplasmique à son extrémité C-terminale (figure 9A). Sa masse moléculaire est de 46kDa (Gerin et al., 1997). La structure prédite de cette protéine est composée de 10 domaines transmembranaires (figure 9B) (Pan et al., 1999).

III.1.3 Un complexe multiprotéique

Le complexe enzymatique G6Pase est situé au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, avec son site catalytique orienté vers la lumière du réticulum. Plusieurs modèles d'organisation structurale ont été proposés et ont longtemps été des sujets de controverse (Arion et al., 1975; Mithieux, 1997).

L'identification des ADNc de la G6PC et de la G6PT (dans les années 1990) a permis de proposer un modèle protéique impliquant uniquement ces 2 sous-unités (Gerin et al., 1997; Shelly et al., 1993). Une mutation dans l'une de ces 2 sous-unités permet d'expliquer les différents types de glycoséoses de type 1 décrits (voir paragraphe IV.2 et IV.3).

De plus, l'étude du transport microsomal de G6P dans le foie et les reins des souris déficientes pour la G6PC a montré que ce transport était très réduit en absence d'activité catalytique G6Pase. Ceci démontre que les activités de transport du G6P et l'hydrolyse du G6P requièrent une coopération très étroite entre les deux sous-unités (Lei et al., 1996).

III.2 Expression tissulaire

Alors que l'expression de la sous-unité G6PT est ubiquitaire, celle de la sous-unité catalytique G6PC est tissu-spécifique ([Figure 10A](#)) (van Schaftingen and Gerin, 2002). L'ARNm de la G6PC est présent uniquement dans les trois tissus néoglucogéniques : le foie, les reins et l'intestin grêle (Minassian et al., 1996; Portha et al., 2001; Rajas et al., 1999). Il existe un gradient d'expression dans l'intestin depuis le duodénum jusqu'au jéjunum chez le rat et du duodénum à l'iléon chez l'homme (Rajas et al., 1999). De plus, une étude par immunohistochimie du laboratoire a permis de préciser la localisation cellulaire de la G6Pase. Confirmant leurs rôles néoglucogéniques, la G6Pase est co-exprimée avec la PEPCK-c dans les cellules du parenchyme hépatique (notamment dans les hépatocytes périportaux), dans les tubules proximaux du cortex rénal et le sommet des villosités intestinales ([Figure 10B](#)). Cependant, la G6Pase est également exprimée dans les canaux biliaires intra-hépatiques, les cryptes des villosités intestinales, l'épithélium urinaire des tubules collecteurs et les calices rénaux (Rajas et al., 2007). Dans ces sites, notre équipe a proposé que la G6Pase pourrait être impliquée dans le transport transépithélial du glucose. En effet, une voie alternative d'absorption du glucose impliquant la G6Pase a été suggérée dans un modèle de souris invalidées pour le transporteur de glucose GLUT2 (Stumpel et al., 2001).

III.3 La famille de gènes G6PC

Des études ont également rapportées de faibles activités G6Pase présentes dans le muscle, le cerveau et les îlots pancréatiques (Forsyth et al., 1993; Gamberucci et al., 1996; Khan et al., 1995). Cependant, les propriétés cinétiques de l'enzyme responsable de cette activité sont différentes de celles du foie et résultent de l'expression de protéines apparentes à la G6PC1. Ces nouveaux gènes présentent une homologie de 58,8% et 55% avec le gène *G6pc* et codent pour l'Islet-specific G6Pase related protein (IGRP) et l'Ubiquitously expressed G6Pase catalytic subunit related protein (UGRP).

III.3.1 IGRP ou G6PC2

L'isoforme IGRP/G6PC2 a été identifiée par homologie avec la G6Pase à partir d'une banque d'ADN issue d'un insulinome de souris (Arden et al., 1999). Cette protéine présente 50% d'homologie de séquence avec la G6PC et est exprimée uniquement dans les îlots pancréatiques (figure 11). Cependant, aucune activité phosphatase n'a pu être mise en évidence par surexpression de la protéine (Arden et al., 1999; Martin et al., 2001). Ainsi, la G6PC2 ne participe pas, de façon significative, à la PEG.

Le gène *G6pc2* a été impliqué dans la physiopathologie du diabète de type 1 et est une cible importante de l'auto-immunité chez les souris comme chez l'homme (Jarchum et al., 2008; Takaki et al., 2006). De nombreuses études ont également reliées des polymorphismes du gène *G6pc2* à des variations de la glycémie à jeun chez l'homme (Bouatia-Naji et al., 2008; Tam et al., 2010). Néanmoins, son rôle exact dans le métabolisme glucidique reste à être déterminé.

III.3.2 UGRP ou G6PC3

La protéine UGRP/G6PC3 est homologue à 36% avec la G6PC (figure 11) (Martin et al., 2002; Shieh et al., 2003). Son expression est ubiquitaire avec une expression maximale dans les muscles squelettiques (Martin et al., 2002). De la même manière que pour la G6PC2, l'activité phosphohydrolase de la G6PC3 n'est pas détectée ou est très faible par rapport à celle de la G6Pase (Martin et al., 2002; Shieh et al., 2003). La génération d'un modèle de souris invalidées pour le gène de la *G6pc3* a confirmé l'absence de la participation de la G6PC3 à la PEG, puisque les souris *G6pc3^{-/-}* sont normoglycémiques (Cheung et al., 2007; Wang et al., 2006). Cependant, ces souris présentent une neutropénie associée à un

dysfonctionnement des neutrophiles, symptômes également retrouvée dans la glycogénose de type 1b (voir paragraphe IV.4.5) (Cheung et al., 2007). En accord avec ce résultat, des mutations dans le gène *G6pc3* ont été rapportées dans les cas de syndrome congénital de neutropénie (Boztug et al., 2009; McDermott et al., 2010). Il a été proposé que le complexe G6PC3-G6PT puisse être impliqué dans le recyclage du glucose du réticulum endoplasmique vers le cytoplasme dans les neutrophiles. Ce recyclage serait nécessaire au maintien de l'homéostasie énergétique de ces cellules et à leur bon fonctionnement (Jun et al., 2010). Toutefois, la fonction de la G6PC3 reste à être déterminée dans les autres tissus.

IV. La glycogénose de type 1

IV.1 Les différents types de glycogénoses

Les glycogénoses (Glycogen Storage Disease- GSD) sont des maladies métaboliques héréditaires rares liées à un défaut dans le métabolisme du glycogène, qui résulte en un stockage anormal de glycogène. Il existe 9 formes principales de GSD affectant les enzymes impliquées dans la synthèse ou la dégradation du glycogène (Figure 12) (Ozen, 2007). Les symptômes sont majoritairement hépatiques et/ou musculaires. Le nombre de naissances concernées par une glycogénose est d'environ 1 pour 20000 à 25000.

Les formes musculaires de GSD sont caractérisées par un manque d'approvisionnement en glucose aux muscles, nuisant à leur bon fonctionnement au cours d'un effort. L'accumulation de glycogène au sein des myocytes et des cardiomyocytes peut également entraîner le développement de myopathies et de cardiopathies. Elles rassemblent :

- la maladie de Pompe ou GSD 2. Elle résulte d'une déficience en maltase acide (ou alpha-1,4- glucosidase) qui permet la dégradation du glycogène au sein des lysosomes. La GSD 2 est également classée comme maladie de surcharge lysosomale. C'est la forme musculaire la plus sévère présentant plusieurs formes (infantile ou adulte).
- la maladie de McArdle ou GSD 5 liée à un déficit en phosphorylase musculaire.
- la maladie de Tarui ou GSD 7 causée par une déficience en phosphofructokinase musculaire.

Les formes hépatiques sont généralement associées à une hypoglycémie puisque les stocks de glycogène hépatique ne peuvent pas être mobilisés pour produire du glucose. En s'accumulant le glycogène entraîne le développement d'une hépatomégalie (Wolfsdorf and Weinstein, 2003). Ces formes hépatiques rassemblent :

- la maladie de Von Gierke ou GSD 1 due à un déficit en G6Pase. C'est la forme hépatique la plus fréquente avec 80% GSD de type 1a et 20% GSD de type 1b. Des atteintes rénale et intestinale sont également retrouvées dans ce type de glycogénose, en raison de l'expression de la G6Pase au niveau du rein et de l'intestin.

- la maladie de Cori ou GSD 3 liée à un déficit en enzyme débranchante. Dans 80% des cas, une atteinte musculaire existe également.

- la maladie d'Anderson ou GSD 4 due à un déficit de l'enzyme branchante. Il en résulte l'accumulation d'un glycogène anormal, nocif pour les cellules. La GSD 4 est associée au développement d'une cirrhose hépatique dès l'âge de 18 mois. La forme classique est hépatique mais la déficience peut également être détectée au niveau musculaire dans certains cas avec une myopathie associée ou non à une cardiomyopathie.

- la maladie de Hers ou GSD 6 liée à un déficit de la phosphorylase hépatique. Cette glycogénose reste cependant bénigne, avec une rémission des symptômes lorsque l'enfant grandit.

- La GSD de type 9 lié à une déficience en phosphorylase kinase, système permettant l'activation de la glycogène phosphorylase. La phosphorylase kinase est constituée de 4 sous-unités impliquant plusieurs gènes. Les 4 principales formes affectent soit le foie, soit les muscles ou le cœur, soit le foie et les muscles.

- La GSD de type 0 par déficit en glycogène synthase. Les réserves glycogéniques ne peuvent pas se constituer. Cette déficience a été classée comme GSD car l'hypoglycémie à jeun est le symptôme principal.

Les types les plus fréquents sont représentés par le type 1 (24,6%), le type 2 (15,3%), le type 3 (24,2%) et le type 6 (30%) ([figure 13](#)).

IV.2 Découverte de la glycogénose de type 1

Le premier cas de GSD1 fut décrit par Edgar Von Gierke en 1929 sous le terme d' « hépatonéphromégalie glycogénique ». En 1949, Christian de Duve démontre l'existence d'une activité glucose-6 phosphatase spécifique au niveau du foie et qu'elle est liée au

réticulum endoplasmique. C'est en 1952 que les époux Cori relient l'absence d'activité G6Pase et les GSD de type 1 (Cori and Cori, 1952). En 1978, Tada et coll. proposent qu'un défaut dans le transport microsomal de G6P existe chez certains patients GSD 1. La GSD 1 est alors divisée en deux sous-types : le type 1a dû au défaut d'activité G6Pase et le type 1b dû au défaut de transport microsomal du G6P. En effet, ils rapportent le cas d'une patiente présentant une activité G6Pase faible dans les microsomes intacts, mais cette activité est normale dans les microsomes désintégrés après congélation. A l'opposé, deux patients diagnostiqués GSD 1a présentent une absence totale d'activité dans les deux conditions (figure 14) (Igarashi et al., 1979; Narisawa et al., 1978).

Les GSD de type 1 sont transmises selon le mode autosomique récessif, leur fréquence est faible et touche 1/100 000 naissances.

Le clonage des gènes *G6pc* et *Slc37a4* a permis de confirmer au niveau génique ces deux formes de GSD de type 1 (Gerin et al., 1997; Lei et al., 1993; Shelly et al., 1993). D'autres sous-types ont également été proposés : le type 1c lié à un défaut dans le transport de Pi (Translocase T2) et le type 1d lié à un défaut dans le transport du glucose (Translocase T3). Cependant, après clonage du gène *Slc37a4*, tous les cas de GSD 1c s'explique aussi par une mutation du gène *Slc37a4* (Gerin et al., 1997; Lei et al., 1993; Shelly et al., 1993; Veiga-da-Cunha et al., 1998; Veiga-da-Cunha et al., 1999). Récemment, une étude a démontré que le transporteur de G6P, la G6PT, permettait aussi bien le transport du G6P du cytoplasme vers la lumière du réticulum que le transport du Pi du réticulum vers le cytoplasme. Ceci confirme que les patients GSD 1b et 1c sont déficients pour le même gène *Slc37a4* (Chen et al., 2008). L'existence du sous-type GSD 1d n'a jamais été démontrée et reste à prouver sur le plan moléculaire.

Il existe encore aujourd'hui quelques rares cas ne présentant aucune mutation sur les gènes *G6pc* et *Slc37a4*. Une étude récente réalisée à l'aide de souris transgéniques a montré que l'inactivation du coactivateur SRC-2 résulte en un phénotype de GSD 1 (Chopra et al., 2008). En l'absence de SRC-2, l'activité G6Pase est diminuée de 60% au niveau hépatique et l'expression de la *G6pc* rénale est diminuée de moitié. Il en résulte une accumulation de glycogène et de triglycérides (TG) au niveau du foie et on retrouve une hypertriglycéridémie, hypercholestérolémie et une hypoinsulinémie, symptômes caractéristiques de la GSD 1. Ainsi, les quelques cas de GSD 1, où aucune mutation n'a été retrouvée au niveau des gènes

G6pc et *Slc37a4*, pourront peut être s'expliquer par des mutations dans des protéines partenaires régulant spécifiquement l'expression de la G6Pase.

IV.3 Biologie moléculaire

Aujourd'hui, grâce au clonage des gènes *G6pc* et *Slc37a4*, la confirmation du type de GSD 1 peut être réalisée par séquençage des gènes à partir d'ADN génomique des patients. Ainsi, les biopsies hépatiques peuvent être évitées pour confirmer le diagnostic et limiter les techniques trop envahissantes pour les patients.

IV.3.1 Glycogénose de type 1a

Les mutations de la sous-unité catalytique G6PC, identifiées chez les patients GSD1a, se traduisent par une déficience en activité enzymatique G6Pase totale ou partielle. A ce jour, 84 mutations ont été identifiées sur le gène *G6pc* chez environ 550 patients atteints de GSD 1a (Bruni et al., 1999; Chevalier-Porst et al., 1996; Chou and Mansfield, 2008; Lei et al., 1995; Lei et al., 1993; Seydewitz and Matern, 2000). Ces mutations ont été classées en 3 catégories : mutations affectant soit le site catalytique, soit les hélices transmembranaires soit les boucles cytoplasmiques ou situées dans la lumière du réticulum endoplasmique (figure 8B).

Les mutations touchant les résidus du site catalytique abolissent totalement l'activité enzymatique mais n'entraîne pas de déstabilisation de la protéine. Les mutations présentes au niveau des hélices transmembranaires abolissent totalement l'activité G6Pase dans plus de 70% des cas. Ceci est relié à une mauvaise intégrité structurale de la protéine. Enfin, les mutations touchant les boucles entraînent la conservation d'une activité G6Pase résiduelle dans plus de 50% des cas suggérant que ces boucles sont moins critiques pour la stabilité et l'activité de la protéine (Chou and Mansfield, 2008).

IV.3.2 Glycogénose de type 1b

Les mutations de la sous-unité G6PT résultent dans un défaut de transport du G6P vers la lumière du réticulum endoplasmique entraînant une perte d'activité G6Pase (Ihara et al., 1998; Janecke et al., 1999; Veiga-da-Cunha et al., 1998; Veiga-da-Cunha et al., 1999). Cependant, dans des conditions détergées, *in vitro*, l'activité G6Pase est restaurée. A ce jour, 79 mutations ont été répertoriées sur le gène *Slc37a4* des patients atteints de GSD 1b et se

traduisent par une perte du transport du G6P vers la lumière du réticulum endoplasmique et, dans certains cas, une déstabilisation de la structure de la protéine (Chou et al., 2010; Chou et al., 2002; Pan et al., 1999) (figure 9B).

IV.4 Physiopathologie des GSD 1

D'après une étude européenne des GSD de type 1, l'âge moyen de découverte de la maladie est de 6 mois pour les GSD 1a et de 4 mois pour les GSD 1b (Rake et al., 2002).

Les symptômes principaux révélant les GSD de type 1 sont l'hypoglycémie survenant au cours d'un jeûne court, associée à une hyperlactacidémie et une distension abdominale liée au développement d'une hépatomégalie, dûe au stockage de glycogène. Associés à l'hypoglycémie, d'autres paramètres métaboliques sont perturbés, avec en particulier une hypertriglycéridémie, une hypercholestérolémie et une hyperuricémie.

Un test de réponse au glucagon ou à l'épinéphrine est également réalisé pour établir le diagnostic. Aucune augmentation de glycémie n'est visible en réponse au glucagon ou à l'épinéphrine et parallèlement, une augmentation très forte de l'acide lactique plasmatique est détectée (Bali and Chen, 2008).

Les patients atteints de GSD 1 présentent également un retard de croissance dû à un hypoinsulinisme chronique.

IV.4.1 Complications métaboliques

L'absence d'activité G6Pase entraîne une absence de libération de glucose dans le sang. Au niveau du foie, le blocage de la réaction d'hydrolyse du G6P en glucose se traduit par l'activation d'autres voies métaboliques : la synthèse de glycogène, la glycolyse, la voie des pentoses phosphates et la synthèse d'acides gras (figure 15). L'activation de ces voies est responsable de l'hypertriglycéridémie, l'hypercholestérolémie, l'hyperlactacidémie et l'hyperuricémie retrouvées chez les patients atteints de GSD 1. L'hyperlactacidémie est la conséquence de l'activation de la voie glycolytique dûe à l'accumulation de G6P au sein de l'hépatocyte. L'augmentation du lactate plasmatique peut être responsable d'une acidose métabolique. L'activation de la voie glycolytique entraîne également une production importante d'acétyl-CoA, qui entre dans la voie de synthèse des acides gras, ensuite estérifiés en triglycérides (TG) et dans la voie de synthèse du cholestérol, conduisant ainsi à une hypertriglycéridémie et une hypercholestérolémie. Le cofacteur NADPH, nécessaire à la

synthèse d'acides gras et de cholestérol, est produit par la voie des pentoses phosphates qui permet la réduction du NADP^+ en NADPH.

L'hyperuricémie est due à une augmentation de la synthèse d'acide urique dans le foie. L'acide urique est produit à partir de la dégradation des bases puriques mais aussi, à partir des stocks importants de ribose-5 phosphate produit par la voie des pentoses phosphates. Cette hyperuricémie est responsable de crises de goutte et de lithiases rénales.

IV.4.2 Pathologie hépatique

La pathologie hépatique se manifeste initialement par le développement de l'hépatomégalie, due à une accumulation importante de glycogène. Les patients présentent également une stéatose hépatique, c'est-à-dire une accumulation intra-hépatique de TG (McAdams et al., 1974). Le développement de la stéatose peut s'expliquer par une augmentation de la lipogenèse *de novo*. En effet, deux études réalisées chez des patients atteints de GSD 1 ont démontré une très forte augmentation de la lipogenèse ainsi que de la synthèse de cholestérol (Bandsma et al., 2008; Bandsma et al., 2002). Les auteurs concluent que cette augmentation est responsable de l'hyperlipidémie mais le degré de stéatose hépatique n'a pas été évalué au cours de ces études. Cependant, une étude antérieure, réalisée chez le rat, a démontré que le blocage du système enzymatique G6Pase par un inhibiteur chimique de la G6PT (le S4048), conduit au développement très rapide d'une stéatose hépatique associée à une augmentation de la lipogenèse *de novo* sans modification de l'export des particules Very Low Density Lipoprotein (Bandsma et al., 2001). Ainsi, l'augmentation de la lipogenèse chez les patients GSD 1a peut expliquer l'hyperlipidémie et la stéatose hépatique. De plus, l'expression de la protéine Fatty Acid Synthase (Fas), enzyme clé de la lipogenèse, est augmentée d'environ cinq fois chez les souris GSD 1a (Sun et al., 2009). Les gènes codant les enzymes de la lipogenèse Acétyl-CoA-carboxylase (Acc) et Fas sont régulés par de nombreux facteurs de transcription tels que LXR α (Liver X Receptor α), SREBP-1c (Sterol regulatory element binding protein 1c) ou ChREBP (Carbohydrate responsive element binding protein) (Postic and Girard, 2008). Seuls les deux facteurs LXR α et ChREBP peuvent être activés par le G6P (Dentin et al., 2005; Mitro et al., 2007). Pour étudier leur rôle dans l'induction de la lipogenèse des foies GSD 1a, des souris invalidées soit pour LXR α , soit pour ChREBP ont été traitées avec l'inhibiteur pharmacologique de la G6PT (Grefhorst et al., 2010). En réponse à l'administration de S4048, qui reproduit la pathologie

hépatique GSD1, la lipogenèse est induite uniquement chez les souris $LXR\alpha^{-/-}$, mais pas chez les souris $ChREBP^{-/-}$. Ces résultats démontrent que l'induction des gènes *Fas* et *Acc* dans les foies GSD 1a est dépendante de ChREBP (Grefhorst et al., 2010).

Le risque principal de complication hépatique est la survenue d'adénomes hépatocellulaires (HCA). D'après l'étude européenne sur les GSD 1, l'âge moyen de découverte de HCA est de 15 ans et près de 70% à 80% des patients âgés de 25 ans environ présentent au moins un adénome (Rake et al., 2002; Reddy et al., 2007; Talente et al., 1994). De plus, dans 50% des cas, une progression est visible par augmentation de la taille ou du nombre de ces HCA (Rake et al., 2002). La progression des HCA peut aussi être observée chez les patients ayant subi une première résection antérieure de ces tumeurs (Reddy et al., 2007).

En grossissant, les HCA présentent des risques d'hémorragie intra-tumorale, de compression des structures voisines mais surtout, ces tumeurs peuvent se transformer, dans de rares cas, en hépatocarcinomes. Quelques publications rapportent les cas de détection d'hépatocarcinomes se développant à partir des HCA chez les patients GSD 1 (Cassiman et al., 2010; Conti and Kemeny, 1992; Franco et al., 2005; Limmer et al., 1988; Reddy et al., 2007).

La pathophysiologie de ces HCA est encore mal connue. Il a été suggéré qu'un mauvais contrôle métabolique pourrait être responsable de la survenue des HCA. En effet, une étude réalisée chez 9 patients atteints de GSD 1a a démontré qu'une thérapie diététique prévenant les hypoglycémies a permis la disparition des HCA chez 2 patients et une régression chez un troisième patient (Parker et al., 1981). Cependant, des études plus récentes ont montré que ce contrôle métabolique ne prévenait pas le développement et/ou la progression des HCA chez les patients GSD 1a (Di Rocco et al., 2008; Rake et al., 2002; Reddy et al., 2007). Plusieurs hypothèses ont été avancées pour déterminer les causes d'apparition des HCA dans la GSD 1, mais à ce jour, aucune n'a été prouvée (Bianchi, 1993; Lee, 2002; Ockner et al., 1993; Ozen, 2007).

Une classification des HCA a été établie grâce aux études françaises de Jessica Zucman-Rossi et Paulette Bioulac-Sage portant sur un grand nombre d'HCA, notamment des HCA issus de patientes sous contraception orale. Cette classification repose sur la corrélation

entre le phénotype et le génotype des HCA. Ainsi, 4 groupes d'HCA ont pu être définis (Bioulac-Sage et al., 2010).

Le premier groupe est représenté par des HCA présentant des mutations inactivatrices dans le gène codant le facteur de transcription hépatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF1 α). Les mutations de HNF1 α sont retrouvées dans 35 à 40% des HCA. Ces mutations ont permis d'identifier HNF1 α comme un gène suppresseur de tumeurs impliqué dans la tumorigenèse du foie. Au niveau histologique, les HCA présentant ce type de mutations sont généralement caractérisés par une stéatose, sans anomalies cytologiques et sans infiltrations inflammatoires. Par des études immunohistochimiques, il a été montré que cette inactivation d'HNF1 α est associée à une perte d'expression de la protéine LFABP (Liver Fatty Acid Binding Protein), dont le gène est régulé positivement par HNF1 α (Bioulac-Sage et al., 2007b).

Le second groupe est caractérisé par des mutations activatrices du gène β -caténine. Ce groupe représente 10 à 15% des HCA et est plus fréquemment associé avec le risque de développer un carcinome hépatocellulaire (HCC) (Zucman-Rossi et al., 2006). Ces HCA présentent des anomalies cytologiques et des formations pseudo-glandulaires dans 70% des cas (Zucman-Rossi et al., 2006). La glutamine synthétase, gène cible de la β -caténine est également retrouvée augmentée, au niveau des ARNm et protéique, dans les HCA mutés pour la β -caténine (Bioulac-Sage et al., 2007b).

Le troisième groupe est représenté par les HCA inflammatoires. Il représente environ 50% des HCA et est associé à un contexte d'obésité et à la consommation d'alcool. Ils sont caractérisés par des infiltrats inflammatoires, une dilatation sinusoidale et des vaisseaux artériels à paroi épaisse (Zucman-Rossi et al., 2006). Il regroupe également les tumeurs classées auparavant comme « hyperplasies nodulaires focales télangiectasiques ». Ces HCA expriment les protéines de la phase aiguë de l'inflammation, notamment la serum amyloïde A (SAA) et la C-réactive protéine (CRP) au niveau ARNm et protéique (Bioulac-Sage et al., 2007b). Une étude récente a démontré que les HCA inflammatoires présentent une induction constitutive de la voie de signalisation de l'interleukine 6, se traduisant par une augmentation de STAT3 (signal transducer and activator transcription 3) au niveau ARNm et protéique, associée à une induction de SAA et CRP. Cette induction de la voie de l'IL6 résulte de mutations gain de fonction de la protéine gp130 codant un co-récepteur de l'IL6. Ainsi, la

protéine gp130 est activée de façon constitutionnelle sans liaison de l'IL6 à son récepteur. Cependant, ce type de mutation n'est retrouvé que dans 60% des cas d'HCA inflammatoires alors que la majorité des tumeurs surexprime la protéine gp130. Le mécanisme d'activation de la protéine STAT3 dans les cas d'HCA inflammatoires non mutés pour gp130 reste à être défini (Rebouissou et al., 2009). De plus, environ 10% des HCA inflammatoires sont également mutés pour la β -caténine et présentent des risques d'évolution en HCC (Bioulac-Sage et al., 2010; Bioulac-Sage et al., 2007a; Rebouissou et al., 2008).

Le dernier groupe est caractérisé par l'absence des marqueurs précédents. Il représente moins de 5-10% des cas. Les HCA n'ont pas de mutation au niveau des gènes HNF1 α et β -caténine et n'expriment pas les protéines de l'inflammation.

Parmi ces études, un très faible nombre d'HCA issus de patients atteints de GSD 1a a pu être analysé. Parmi ces HCA, 2 étaient non mutés et non inflammatoires, 2 étaient mutés pour la β -caténine et le dernier patient présentait un HCC associé à de nombreux HCA mutés pour la β -caténine (Bioulac-Sage et al., 2009; Zucman-Rossi et al., 2006). Au niveau chromosomique, une étude américaine portant sur 10 patients GSD 1a a montré que dans 60% des cas, des aberrations chromosomiques sont retrouvées au niveau des HCA. Ceci est représentatif des altérations chromosomiques pouvant être retrouvées dans les HCA issus de la population générale (Kishnani et al., 2009). Parmi ces aberrations chromosomiques, 30% sont représentées par un gain de chromosome 6p associé à une perte de chromosome 6q, simultanément. Ces altérations au niveau du chromosome 6 n'ont d'ailleurs été retrouvées que dans les HCA provenant de patients GSD 1, suggérant que ces altérations pourraient être un événement précoce dans la tumorigenèse chez ces patients (Kishnani et al., 2009). Dans cette même étude, un HCA a également été retrouvé muté au niveau du gène codant la β -caténine (Kishnani et al., 2009).

IV.4.3 Pathologie rénale

La néphromégalie (augmentation de 10 à 20% de la taille des reins), liée à un stockage excessif de glycogène au niveau rénal, était inclus dans la description initiale de la glycogénose par Von Gierke. Cependant, ce n'est qu'à la fin des années 1980 que la pathologie rénale a été considérée comme une complication majeure de la maladie (Chen et al., 1988). Au niveau histologique, les biopsies rénales de patients GSD 1a révèlent une

glomérulosclérose segmentaire focale et une fibrose interstitielle (Chen, 1991). Ces lésions de type glomérulosclérose sont également retrouvées dans les reins des chiens atteints de GSD 1a (Kishnani et al., 2001). Le premier signe de l'apparition de l'atteinte rénale est l'hyperfiltration glomérulaire silencieuse qui, au cours des années, se transforme en une microalbuminurie puis protéinurie (Moses, 2002; Ozen, 2007). D'après l'étude européenne des GSD 1, plus de 50% des patients âgés de 25 ans développent une protéinurie et le reste des patients présentent une microalbuminurie (Rake et al., 2002). Une même proportion se retrouve dans la population américaine : 67% des adultes atteints de GSD 1 présentent une protéinurie ou une microalbuminurie (Talente et al., 1994). L'hyperfiltration glomérulaire serait un facteur critique dans le développement de la glomérulosclérose (Chen, 1991). Cette détérioration peut conduire à une insuffisance rénale nécessitant une transplantation. Les patients présentent également un dysfonctionnement au niveau des tubules rénaux qui résulte en une acidose tubulaire distale (Restaino et al., 1993; Weinstein et al., 2001).

Les patients présentent une forte incidence de néphrocalcinoses et de lithiases rénales. Ces symptômes sont liés à une hypercalciurie associée à une hypocitraturie. En effet, le citrate urinaire est un chélateur du calcium libre évitant la formation de calculs rénaux (Weinstein et al., 2001). L'hyperuricémie est aussi un facteur conduisant au développement de calcifications rénales. L'étude européenne rapporte que 14% des patients développent des complications liées à l'hyperuricémie et notamment les calcifications rénales et les calculs rénaux. D'après une étude américaine sur les glycogénoses, des calcifications rénales sont retrouvées dans 65% des patients GSD 1a (Talente et al., 1994).

Une conséquence de la progression de la pathologie rénale est l'apparition d'une hypertension, retrouvée dans 7% des cas dans l'étude européenne (Rake et al., 2002).

Les mécanismes d'apparition de la pathologie rénale sont encore mal connus. Des études réalisées dans le modèle murin de GSD 1a ont permis de mettre en évidence les rôles du système angiotensine et de la voie du « transforming growth factor $\beta 1$ » (TGF- $\beta 1$) dans le développement de la fibrose interstitielle au niveau du rein (Yiu et al., 2008). L'angiotensine II est connue pour agir comme facteur pro-fibrogénique (Mezzano et al., 2001; Wolf, 2006). Le précurseur de l'angiotensine II, c'est-à-dire l'angiotensinogène et son récepteur AT1, ont une expression protéique augmentée au niveau du rein chez les souris *g6pc*^{-/-}. En parallèle, l'expression de la cytokine TGF- $\beta 1$ est également augmentée dans le rein. Il en résulte une augmentation de la synthèse des protéines de la matrice extra-cellulaire telle que la

fibronectine et les collagènes qui se déposent au niveau du cortex rénal responsable de la fibrose (Yiu et al., 2008). Ainsi, le système angiotensine peut expliquer une partie de la néphropathie des GSD 1a. Une seconde étude a montré que le stress oxydatif pourrait également être un facteur intervenant dans la néphropathie. Les souris *g6pc*^{-/-} ont une augmentation de l'expression des NADPH oxydases et une diminution de l'expression des enzymes antioxydantes, superoxide dismutase et catalase, entraînant donc une augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Un traitement avec un antioxydant (mimétique de la superoxide dismutase) permet l'amélioration de la pathologie rénale avec une apparition retardée de la fibrose (Yiu et al., 2010b).

Ces résultats démontrent que plusieurs mécanismes sont probablement en cause dans le développement de la pathologie rénale et notamment l'augmentation du système angiotensine II/ TGF- β 1 et le stress oxydant.

IV.4.4 Pathologie intestinale

Actuellement, la pathologie intestinale est très mal connue et sous-estimée. Des études des années 1960-1970 rapportent des cas de patients présentant des problèmes intestinaux, notamment des épisodes de diarrhées (Fine et al., 1969; Milla et al., 1978). Il a également été rapporté que les stocks de glycogène sont augmentés dans la partie jéjunale des patients (Field et al., 1965). Cependant, ce n'est que depuis une dizaine d'année que la preuve moléculaire de la présence de la G6Pase dans l'intestin (ARNm) a été apportée par notre équipe, aussi bien chez le rat que chez l'homme (Rajas et al., 1999) (Figure 10A).

L'étude européenne rapporte que 35% des patients GSD 1a et 55% des GSD 1b souffrent de diarrhées (Rake et al., 2002). Les mécanismes physiopathologiques conduisant à l'apparition des diarrhées sont encore inconnus dans les cas de GSD 1a et ne sont pas liés à un problème de malabsorption ou de barrière de la muqueuse intestinale (Visser et al., 2002b).

Très souvent, la pathologie intestinale est plus visible chez les patients GSD 1b souffrant également de neutropénie. Ces patients présentent une augmentation de l'excrétion fécale d' α 1-antitrypsine révélant une mauvaise intégrité de la muqueuse intestinale, associée à une inflammation au niveau du colon (Ozen, 2007; Visser et al., 2002b). Une étude a montré que les patients atteints de GSD 1b souffrent de maladies inflammatoires de l'intestin ressemblant à la maladie de Crohn mais touchant tout le tractus gastro-intestinal (Visser et al., 2000).

D'autres pathologies peuvent être diagnostiquées chez les patients atteints de GSD I telles que des anémies ou des problèmes de minéralisation osseuse. Elles sont plus une conséquence des problèmes métaboliques engendrés par le déficit en G6Pase que le déficit lui-même et ne seront pas décrites (Moses, 2002; Ozen, 2007).

IV.4.5 Pathologies associées spécifiquement aux GSD 1b

Le gène *Slc327a4* est exprimé de façon ubiquitaire et cette protéine aurait un rôle important dans l'activité des neutrophiles. En effet, les patients atteints de GSD 1b présentent, en plus des symptômes décrits précédemment, des infections récurrentes, des neutropénies et un dysfonctionnement des neutrophiles (Beaudet et al., 1980). De plus, les patients souffrent de maladies intestinales inflammatoires (Ozen, 2007). Les dysfonctionnements des neutrophiles sont caractérisés par des défauts de production de ROS, un défaut d'explosion respiratoire au sein des phagosomes (reflété par l'activité NADPH oxydase) et des défauts de migration des neutrophiles (chimiotaxie) (Beaudet et al., 1980; Kuijpers et al., 2003). Une étude portant sur des patients GSD 1b a montré une augmentation de l'apoptose des neutrophiles. L'apoptose serait due à une augmentation de l'activité caspase et à la translocation de la protéine Bax, protéine pro-apoptotique, dans la mitochondrie (Kuijpers et al., 2003). Ces résultats ont été retrouvés chez des souris invalidées pour le gène *Slc37a4*. Chez ces souris, les neutrophiles développent un stress du réticulum endoplasmique, caractérisé par une augmentation des protéines chaperonnes GPR78 et GPR170 et une augmentation de l'apoptose, révélée par une augmentation des neutrophiles positifs pour l'annexin V (marqueurs des cellules apoptotiques) (Kim et al., 2008). Or, il a été montré que le stress du réticulum endoplasmique pouvait induire la mort cellulaire par apoptose via l'accumulation de ROS (Haynes et al., 2004). Ainsi, la neutropénie est due à une apoptose des neutrophiles, consécutive à un stress du réticulum endoplasmique et un stress oxydant (Chou et al., 2010; Kim et al., 2008).

Les souris *G6pc3^{-/-}* présentent également une neutropénie causée par une apoptose des neutrophiles similaire à celle observée chez les souris *G6pt^{-/-}*. Ces données suggèrent que l'apoptose des neutrophiles proviendrait d'un défaut de production de glucose au sein du réticulum endoplasmique des neutrophiles par le complexe G6PC3-G6PT (Chou et al., 2010; Jun et al., 2010).

IV.5 Traitements actuels

IV.5.1 Traitement diététique

Les mesures diététiques appliquées aujourd'hui ont débuté au début des années 1980. Avant cette date, aucun traitement n'existait pour les patients GSD 1 et ces patients avaient une espérance de vie inférieure à 20 ans, en raison des complications hépatiques et rénales et des hypoglycémies sévères.

Aujourd'hui, la base du traitement est diététique afin d'éviter les hypoglycémies et de supprimer les désordres métaboliques secondaires associés, notamment l'acidose lactique. Afin de maintenir la glycémie, les patients atteints de GSD 1 bénéficient de repas fréquents, riches en sucres lents (toutes les 3 à 4 heures chez l'enfant), d'administration de Maïzena[®] crue et de nutrition entérale à débit continu nocturne.

En 1976, la nutrition entérale à débit continu est la première mesure diététique à être mise en place afin de maintenir une normoglycémie tout au long de la nuit et supprimer la production de lactate (Greene et al., 1976). Le débit d'infusion des polymères de glucose a été déterminé en fonction des taux normaux de production endogène de glucose de patients sains et les recommandations varient de 7 à 9 mg/kg/min chez les enfants de moins de 6 ans, 5 à 6 mg/kg/min pour les adolescents et 3 à 4 mg/kg/min pour les adultes.

Dans les années 1980, l'utilisation de Maïzena[®] crue en complément des repas fréquents a été mise en place durant la journée et la nuit (Chen et al., 1984). Cette farine de maïs est digérée par l'amylase pancréatique et permet une libération lente de glucose. Cependant, il est recommandé de ne pas introduire la Maïzena avant l'âge de un an car l'activité amylase peut encore être immature (Hayde and Widhalm, 1990; Rake et al., 2002). D'après l'étude européenne sur les GSD 1, 70% des patients utilisent la Maïzena[®] en complément de leur repas (Rake et al., 2002). En l'absence de nutrition entérale, la Maïzena[®] crue peut également être utilisée la nuit mais nécessite plusieurs prises nocturne, notamment chez les enfants afin d'éviter les hypoglycémies. D'après cette même étude, un nombre équivalent de patients utilisent la nutrition entérale et la Maïzena[®] crue, comme mesure diététique nocturne (Rake et al., 2002).

Les aliments contenant du lactose, du fructose et du galactose doivent être évités car ils sont convertis au niveau du foie en glycogène et lactate et contribuent au développement de l'hépatomégalie et de l'acidose lactique (Heller et al., 2008).

Ces mesures diététiques permettent un meilleur contrôle métabolique mais l'utilisation de médicaments peut être nécessaire notamment pour lutter contre l'hyperuricémie et l'hypertriglycéridémie (Heller et al., 2008).

Le retard de croissance, les paramètres métaboliques plasmatiques, l'hépatomégalie, et la pathologie rénale peuvent être contrôlés grâce aux traitements nutritionnels mais les complications à long-terme hépatique et rénale finissent par apparaître avec le vieillissement des patients. Récemment, la description d'un patient, se présentant pour des douleurs abdominales, a révélé la présence de multiples HCA et un HCC mutés pour la β -caténine (Cassiman et al., 2010). L'hépatomégalie, l'analyse histologique du foie non tumoral et les épisodes hypoglycémiques durant son enfance ont permis de suspecter une glycogénose. Ce patient, âgé de 42 ans, était atteint de GSD 1a mais avec un phénotype peu marqué sans hypoglycémie. Ainsi, ce patient n'a jamais suivi de traitement nutritionnel et malgré l'absence d'hypoglycémie et de perturbations des paramètres plasmatiques, des HCA et une transformation en HCC se sont développés chez ce patient (Cassiman et al., 2010). De la même façon, des souris $g6pt^{-/-}$ traitées, par thérapie génique, avec un adeno associated virus (AAV) contenant l'ADNc de la G6PT humaine, permet de corriger l'hypoglycémie et les paramètres métaboliques mais ne prévient pas la survenue d'HCA et même d'un HCC chez ces souris (Yiu et al., 2009).

IV.5.2 Traitement spécifique des GSD 1b

L'utilisation de Granulocyte colony-stimulating factor est nécessaire chez les patients atteints de GSD 1b pour lutter contre la neutropénie et les infections (Heller et al., 2008; Visser et al., 2002a).

IV.5.3 Transplantations hépatiques et rénales

Malgré l'amélioration des paramètres métaboliques des patients grâce aux mesures diététiques, les complications hépatiques et rénales se développent à long-terme. La transplantation hépatique est donc proposée aux patients présentant de multiples adénomes hépatiques, non résecables et avec un risque de transformation en carcinomes. Elle peut aussi être proposée aux patients ne répondant pas au traitement nutritionnel et aux patients avec des retards de croissance importants (Labrune, 2002; Matern et al., 1999). La transplantation hépatique va corriger le défaut enzymatique au niveau du foie et

permettre la correction des paramètres métaboliques et la qualité de vie des patients. Cependant, elle présente une mortalité et une morbidité non négligeable (Labrune, 2002). En cas d'insuffisance rénale isolée, la transplantation rénale peut être indiquée (Chen, 1991; Labrune, 2002). Cependant, cette opération ne corrige pas l'hypoglycémie (Labrune, 2002). La transplantation hépatique peut être associée à une transplantation rénale si la fonction rénale est déjà fortement dégradée (Belingheri et al., 2007; Labrune, 2002).

IV.6 Modèles animaux de GSD I

Deux modèles animaux de GSD 1a ont été développés dans le but de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de cette maladie. Ces modèles ont été aussi utilisés pour tester l'efficacité et l'innocuité de thérapies géniques.

IV.6.1 Le modèle murin de GSD 1a

Le premier modèle animal de GSD 1a est un modèle murin, développé en 1996 par transgénèse. La construction utilisée cible l'exon 3 du gène *G6pc*, qui a été remplacé par une cassette néomycine. Les souris invalidées pour le gène *G6pc* (*G6pc*^{-/-}) développent un phénotype de GSD 1a, à l'exception de l'acidose lactique, avec une activité G6Pase hépatique et rénale indétectable (Lei et al., 1996). Au niveau hépatique, l'accumulation de lipides et de glycogène est responsable de l'architecture anormale du foie, par compression des sinusoides, et de l'hépatomégalie. Au niveau rénal, on retrouve une très forte accumulation de glycogène dans les cellules épithéliales des tubules proximaux, responsable de leur dilatation, des glomérules atrophiés ainsi qu'une fibrose interstitielle. Le phénotype est beaucoup plus critique chez ces souris que chez l'homme, puisqu'elles meurent très rapidement après le sevrage. A l'âge de 5 semaines, moins de 12% des souris GSD 1a survivent (Lei et al., 1996). Afin de maintenir ces souris en vie, une thérapie est administrée aux souris GSD 1a, par injection intra-péritonéale de glucose toutes les 6-8 heures. Ceci permet un taux de survie de 56% à 42 jours. Cependant, malgré ce traitement, toutes les souris meurent assez rapidement puisque seulement deux souris ont survécu jusqu'à 70 jours (Zingone et al., 2000). Une étude récente a cependant démontré que ces souris *G6pc*^{-/-} pouvaient survivre au-delà du sevrage et jusqu'à l'âge de 6 mois, uniquement en complétant leur alimentation avec du glucose (Salganik et al., 2009). Dans cette étude, dès l'âge de 14 jours, les souris ont accès à une nourriture standard et une nourriture

supplémentaire, riche en calorie : le Nutra-gel[®] (52% de l'énergie est apportée sous forme de glucides). Après le sevrage, elles reçoivent, en supplément, du glucose dans l'eau de boisson (5%). Les souris présentant une hypoglycémie inférieure à 70mg/dL reçoivent une injection sous-cutanée de glucose. Grâce à ces soins, le taux de survie au moment du sevrage est de 60%. Les souris ayant survécu à cette période sont capables de normaliser de nombreux paramètres caractéristiques de la maladie, notamment le retard de croissance et les paramètres plasmatiques. La glycémie est également corrigée (70-200 mg/dL) avec uniquement des hypoglycémies transitoires. Cependant, la pathologie au niveau hépatique et rénal n'est pas améliorée suggérant la possibilité de l'apparition des complications à long-terme (Salganik et al., 2009).

La disponibilité d'un modèle animal pour la GSD 1a a permis d'évaluer la faisabilité d'un traitement par thérapie génique. Dans une première étude, les auteurs ont utilisé un adénovirus recombinant contenant l'ADNc murin de la G6PC (Zingone et al., 2000). L'administration des ces adénovirus recombinants a permis la survie de 90% des souris jusqu'à l'âge de 84 jours comparé à la mort précoce des souris non traitées. Ces souris présentent une amélioration transitoire des paramètres métaboliques et une normalisation de leur glycémie à l'état nourri. La mesure de l'activité G6Pase au niveau hépatique a montré que la restauration est transitoire, avec une activité maximale obtenue entre 7 et 14 jours après l'infusion des adénovirus puis une perte rapide du transgène (Zingone et al., 2000). Ainsi, cette étude a démontré que la thérapie génique pourrait être un traitement efficace dans les cas de GSD 1a si l'expression de la protéine thérapeutique pouvait être maintenue.

Dès le début des années 2000, les vecteurs recombinants dérivés des virus adéno-associés (Adeno Associated Virus - AAV) ont été alors utilisés. En effet, ils sont capables de transduire efficacement des cellules quiescentes, conduisant à une expression à long-terme du transgène. L'utilisation des AAV de différents sérotypes permet la survie à long-terme des souris et l'amélioration des paramètres métaboliques avec une restauration variable de l'activité G6Pase hépatique et rénale. Une première étude a été réalisée à l'aide d'un AAV2 recombinant contenant l'ADNc murin de la *G6pc* sous le contrôle du promoteur de la β -actine de poulet associé à l'enhancer du cytomégalovirus (CMV). L'AAV2-mG6PC seul ne permet pas de normaliser la glycémie et de prolonger la survie à cause du délai d'expression du transgène. Cependant, la co-infusion de l'AAV2 et d'un adénovirus recombinant permet

une restauration d'environ 30% de l'activité G6Pase aussi bien au niveau du foie que du rein. Cette correction est transitoire avec une diminution des activités G6Pase après 12 mois (Sun et al., 2002a). L'utilisation d'un AAV2/8 (particule mixte composé d'une partie du génome de l'AAV2 et des protéines de capsid de l'AAV8) permet la survie des souris mais ne permet pas de corriger l'activité G6Pase rénale et ceci même après une double administration du vecteur (0,3% de l'activité G6Pase rénale basale) (Ghosh et al., 2006). Une double administration d'un AAV2/1 recombinant permet de maintenir une faible activité G6Pase, aussi bien au niveau hépatique (10%) qu'au niveau rénal (6%) durant les 57 semaines de l'étude. Ce traitement a permis 100% de survie à 57 semaines, une correction des anomalies plasmatiques à l'état nourri mais la pathologie rénale se développe chez les souris traitées (Ghosh et al., 2006). L'amélioration de la construction intégrée dans un AAV2/8 recombinant, exprimant l'ADNc humain de la G6PC sous le contrôle de la partie proximale de son propre promoteur a permis d'obtenir de meilleurs résultats sur le phénotype des souris GSD 1a (Koeberl et al., 2008). Cette étude a démontré une normalisation de l'activité G6Pase hépatique ainsi qu'une diminution de l'hépatomégalie, associée à une diminution du glycogène et des TG hépatiques. Les souris traitées présentent une glycémie à l'état nourri similaire à celle des souris témoins mais une hypoglycémie sévère apparaît au cours du jeûne (Koeberl et al., 2008). Récemment, une normalisation totale de la pathologie a été obtenue au niveau de l'activité G6Pase hépatique, de l'hépatomégalie mais aussi de la glycémie au cours du jeûne après 6 mois de traitement (Yiu et al., 2010a). Dans cette étude, le transgène cloné dans un AAV8 correspond à l'ADNc de la G6PC humaine, sous le contrôle de la région promotrice complète de la G6PC.

Un nouveau vecteur viral dérivé d'un lentivirus FIV (feline immunodeficiency virus) non primate a été évalué pour le traitement des souris GSD 1a (Grinshpun et al., 2010). L'avantage de ces lentivirus est l'intégration du transgène dans le génome cellulaire, permettant ainsi une expression à long-terme même lors de divisions cellulaires. Une injection unique de ce lentivecteur contenant l'ADNc humain de la G6PC, à l'âge de un jour ne permet pas de corriger la pathologie et les souris continuent à souffrir d'hypoglycémie et d'anomalies métaboliques plasmatiques et hépatiques. Cependant, si une deuxième injection est réalisée à l'âge de sept jours, la survie est maintenue durant les 6 mois de l'étude. De nombreux paramètres sont améliorés et notamment les paramètres plasmatiques et l'activité G6Pase hépatique qui représente 56% de l'activité basale.

Cependant, l'hépatomégalie est toujours présente avec une accumulation moyenne de glycogène et de TG (Grinshpun et al., 2010).

IV.6.2 Le modèle canin de GSD 1a

En 1995, deux cas de GSD 1a ont été diagnostiqués dans une portée de chiots. Ces chiots présentaient un retard de croissance et une mauvaise condition physique. L'analyse de l'activité G6Pase hépatique et rénale a révélé des niveaux très réduits d'activité dans les deux organes, suggérant une GSD 1a (Brix et al., 1995). Le diagnostic a été confirmé après le clonage du gène *G6pc* canin qui a révélé une mutation au niveau du nucléotide 450 entraînant, sur la séquence protéique, la substitution d'une méthionine par une isoleucine au codon 121 (M121I) (Kishnani et al., 1997). Un modèle canin de GSD 1a a été généré par croisement entre des beagles et des maltais porteurs de cette mutation. Les chiots atteints de GSD 1a présentent toutes les caractéristiques de la pathologie humaine (Kishnani et al., 2001). Sans traitement, les chiots meurent à la naissance et malgré un traitement nutritionnel, les chiots meurent avant l'âge de six mois (Kishnani et al., 2001; Koeberl et al., 2007; Weinstein et al., 2010). Lorsque ces chiots sont traités, à l'âge de 3 jours, par thérapie génique en utilisant le même vecteur AAV2/8 que chez la souris, contenant l'ADNc humain de la G6PC sous le contrôle de la région proximale du promoteur humain de la G6PC, leur survie est prolongée au-delà de 11 mois (Koeberl et al., 2008). Ces chiens présentent une normalisation de leurs paramètres métaboliques plasmatiques, de leur activité G6Pase hépatique et de leur stock de TG hépatiques. L'hypoglycémie caractéristique n'est pas retrouvée, même après un jeûne court de 2 heures (Koeberl et al., 2008). Une étude récente a montré qu'un traitement néonatal, le premier jour de vie, par des vecteurs AAV2/8 contenant l'ADNc *G6pc* murin sous le contrôle du promoteur de la β -actine de poulet associée à l'enhancer du CMV, permet une amélioration transitoire de la glycémie et des paramètres hépatiques. En effet, 8 semaines après le traitement, le chien est de nouveau hypoglycémique après une heure de jeûne (Weinstein et al., 2010). Cependant, une nouvelle administration d'un vecteur AAV2/1, à l'âge de 20 semaines, permet la survie du chien avec une normalisation des paramètres plasmatiques. Leur glycémie reste néanmoins plus faible au cours du jeûne. L'activité G6Pase mesurée sur une biopsie hépatique, 6 mois après la seconde injection, représente uniquement 6,3% de l'activité basale. Une amélioration de l'architecture du foie est observée bien qu'une accumulation anormale de glycogène soit

toujours visible, 3 mois après la seconde injection (Weinstein et al., 2010). Ces deux études chez le chien suggèrent que le promoteur *G6pc* permet une meilleure restauration de la pathologie à long-terme car les chiens n'ont pas reçu d'injection supplémentaire de vecteurs au cours des 11 mois de l'étude.

Les études réalisées chez la souris et le chien GSD 1a ont permis de démontrer qu'une thérapie génique réalisée à l'aide de vecteurs AAV résulte en une amélioration de la pathologie, notamment au niveau des paramètres plasmatiques et hépatiques. Cependant, les résultats sont obtenus, dans la majorité des études, uniquement à l'état nourri. Seule une étude a montré que la glycémie pouvait être maintenue au cours d'un jeûne de 6 heures (Yiu et al., 2010a). Ainsi, des améliorations des vecteurs doivent encore être apportées avant d'envisager des essais cliniques afin d'assurer un maintien de la glycémie pendant les périodes de jeûne. Ces améliorations dépendent notamment du vecteur viral utilisé, du sérotype du virus, du promoteur contrôlant l'expression du transgène mais également de l'âge où le traitement est effectué.

IV.6.3 Le modèle murin de GSD 1b

Un modèle murin de GSD 1b a été développé en 2003 par transgénèse. Pour cette construction, l'exon 1 et l'intron associé ont été ciblés et remplacés par une cassette néomycine. Les souris *G6pt*^{-/-} développent les symptômes caractéristiques de la GSD 1b, incluant les problèmes immunitaires (Chen et al., 2003). Ainsi, ces souris développent une hépatomégalie et une néphromégalie, avec un stockage excessif de glycogène. Elles développent également un retard de croissance et des hypoglycémies sévères (0,58 g/L versus 1,56 g/L chez les *G6pt*^{+/+}), nécessitant un apport de glucose supplémentaire comme pour les souris GSD 1a (Chen et al., 2003). Comme chez l'homme, les souris *G6pt*^{-/-} développent aussi des problèmes de neutropénies persistantes durant les premières semaines de vie. Cette neutropénie s'améliore avec l'âge laissant apparaître des neutropénies intermittentes. Les dysfonctionnements connus des neutrophiles des patients sont également retrouvés chez les souris *G6pt*^{-/-} comme les problèmes de migration et les défauts de production de ROS (Chen et al., 2003).

Une étude récente de 2009 a testé l'efficacité d'une thérapie génique utilisant un AAV2/8 contenant l'ADNc humain du gène *Slc37a4* sous le contrôle du promoteur de la β -actine de

poulet associée à l'enhancer du CMV dans le modèle de souris GSD 1b (Yiu et al., 2009). Après 6 semaines de traitement, l'activité de transport du G6P est très faible au niveau du foie et représente seulement 3% de l'activité basale. Néanmoins, cette restauration permet la correction de l'hypoglycémie et des paramètres plasmatiques. L'hépatomégalie est toujours présente avec une accumulation importante de glycogène et de TG, après 50 semaines de traitement. Deux souris traitées développent également des adénomes hépatocellulaires, dont un ayant subi une transformation en carcinome (Yiu et al., 2009). Cette étude démontre bien que la seule correction de l'hypoglycémie et des paramètres plasmatiques n'empêche pas le développement des complications à long-terme caractéristiques de la GSD 1. La pathologie hépatique doit également être corrigée pour que le traitement par thérapie génique puisse être curatif.

DEMARCHE EXPERIMENTALE

Les données de la littérature rapportées dans l'introduction de ce travail démontrent que la PEG est une fonction physiologique cruciale au développement et à la survie d'un organisme. La compréhension de sa régulation est donc importante. De nombreuses données démontrent que cette fonction de produire du glucose est restreinte à trois tissus : le foie, les reins et l'intestin, grâce à l'expression spécifique du complexe G6Pase dans ces organes. L'absence d'activité G6Pase rend compte des cas de GSD 1. Cette maladie rare, autrefois mortelle, est caractérisée principalement par des hypoglycémies sévères dues à l'absence de PEG. Actuellement, le traitement de cette maladie repose sur un contrôle nutritionnel strict, limitant les hypoglycémies mais qui n'est pas curatif. En effet, à long-terme, le risque de développer des complications hépatiques, rénales et intestinales existe toujours, mais leur étude reste difficile car les modèles animaux disponibles ne sont pas viables. Au niveau de la régulation de l'homéostasie glucidique, la communauté scientifique continue à considérer la PEG comme une fonction unique et principalement hépatique. Un objectif principal du laboratoire est de déterminer le rôle spécifique de chaque tissu néoglucogénique dans la régulation de l'homéostasie glucidique et énergétique.

Sur la base de ces données, nous avons développé, au laboratoire, des modèles originaux de souris invalidées pour le gène *G6pc*, spécifiquement au niveau d'un des trois tissus néoglucogéniques, en utilisant une stratégie CRE-LOX inducible par le tamoxifène. Notre hypothèse était que l'absence de production de glucose par un tissu pourrait être compensée par les deux autres tissus. Afin d'obtenir un modèle de souris invalidées spécifiquement pour la G6Pase dans le foie, des souris dont le gène *G6pc* a été loxé, au niveau de l'exon 3, ont été croisées avec des souris exprimant la recombinaise Cre^{ERT2}, sous le contrôle du promoteur de la sérum albumine, conférant ainsi une spécificité hépatique d'expression de la recombinaise. Cette recombinaise Cre^{ERT2} est inducible après traitement au tamoxifène. Cette stratégie CRE-LOX inducible nous permet de choisir l'âge des souris au moment de l'invalidation. Pour cette étude, nous avons choisi d'induire la déficience uniquement à l'âge adulte, afin d'éviter la période critique du sevrage, période à laquelle les souris totalement déficientes pour la *G6pc* meurent d'hypoglycémie.

Malgré l'absence de PHG, les souris dont le gène *G6pc* a été invalidé dans le foie à l'âge adulte (*L-G6pc*^{-/-}) sont parfaitement viables et régulent leur glycémie au cours du jeûne prolongé. Ce résultat confirme notre hypothèse principale suggérant que l'absence de production de glucose par le foie pourrait être compensée par les reins et l'intestin.

Ce modèle a donc été utilisé d'une part, pour l'étude de la physiopathologie de la GSD 1a et son traitement par thérapie génique et d'autre part pour la caractérisation des mécanismes de régulation de l'homéostasie glucidique en absence de PHG.

La première partie de ce travail présente la **caractérisation de ce nouveau modèle original de GSD 1a**. Ces souris ont été suivies au niveau de leurs paramètres plasmatiques et hépatiques sur une période de 18 mois afin d'évaluer le développement de la pathologie. Nous avons également suivi l'apparition éventuelle d'adénomes par un suivi du foie *in vivo*, par imagerie par résonance magnétique (IRM). Ces premiers résultats nous ont permis de conclure que les souris L-G6pc^{-/-} représentaient un très bon modèle de glycogénose de type 1 hépatique. Ce modèle animal nous permettra d'étudier l'efficacité et l'innocuité de différents virus recombinants utilisés en biothérapie hépatique.

La deuxième partie de ce travail présente les résultats des premiers tests de thérapie génique. Grâce à une collaboration avec Nicolas Ferry et Tuan Nguyen de l'équipe de biothérapies hépatiques de Nantes (Inserm U948), nous avons évalué **l'efficacité de nouveaux vecteurs de thérapie génique**. Dans ce travail, deux protocoles ont été développés. Le premier est un protocole de prévention puisque le traitement par un vecteur lentiviral recombinant a été réalisé en période néonatale, avant l'induction de la déficience. Nous avons ainsi pu évaluer l'effet protecteur contre le développement de la pathologie hépatique du vecteur lentiviral. Le second protocole a été réalisé à l'aide d'un vecteur adeno-associated virus (AAV) recombinant. Le traitement des souris L-G6pc^{-/-}, invalidées juste avant le sevrage, a été effectué à l'âge adulte et son efficacité a été évaluée pendant 8 mois.

La troisième partie de ce travail présente nos résultats concernant **les mécanismes de régulation de l'homéostasie glucidique au cours du jeûne, en absence de PHG**. Afin d'étudier ces mécanismes, la PEG a été déterminée après 6h et 24h de jeûne et la néoglucogénèse extra-hépatique a été évaluée par l'analyse de l'expression des enzymes G6Pase, PEPCk-c et glutaminase. Les résultats montrent que la glycémie est maintenue chez les souris L-G6pc^{-/-} grâce à une induction de la néoglucogénèse dans les reins et l'intestin. L'analyse des différentes hormones régulatrices de la glycémie et des métabolites issus du métabolisme du glucose nous a permis de tester différentes hypothèses à l'origine de cette induction. Nos résultats nous ont ainsi permis de caractériser les mécanismes d'induction de la néoglucogénèse extra-hépatique chez les souris L-G6pc^{-/-}.

RESULTATS ET DISCUSSION

1ère partie : Caractérisation du modèle de
souris invalidées pour le gène *G6pc*
spécifiquement au niveau du foie

Le modèle de souris totalement invalidées pour le gène *G6pc* survit rarement au-delà de 3 mois d'âge et nécessite une injection de glucose toutes les 6-8 heures dès le sevrage (Lei et al., 1996; Zingone et al., 2000). Il ne permet donc pas d'étudier les mécanismes physiopathologiques du développement des adénomes hépatocellulaires et des complications rénales de la glycogénose de type 1.

Le projet du laboratoire a été de développer un modèle de souris invalidée pour le gène *G6pc*, spécifiquement au niveau de chaque tissu producteur de glucose, grâce à une stratégie CRE-LOX inducible. L'originalité de cette approche réside dans le fait que nous pouvons reproduire, organe par organe, la pathologie GSD 1a. De plus, en utilisant une recombinase Cre inducible (Cre-ERT2), la délétion du gène *G6pc* peut être induite à un moment précis (au moment du sevrage, chez l'adulte, *in utero*).

Nous avons choisi de cibler, dans un premier temps, **le foie**, en faisant l'hypothèse que ce modèle serait viable grâce à la production extra-hépatique de glucose. Du fait que la PHG a un rôle prédominant lors de la période néonatale (Chatelain et al., 1998), nous avons induit la délétion hépatique du gène *G6pc* **à l'âge adulte**, en utilisant une souris exprimant la Cre-ERT2 sous le promoteur de la sérum albumine (Schuler et al., 2004).

Comme attendu, les souris L-*G6pc*^{-/-} sont parfaitement viables et développent les symptômes hépatiques de la glycogénose de type 1. C'est le premier modèle animal de GSD 1a viable sans traitement complémentaire en glucose.

Après une description de la méthode de génération des souris L-*G6pc*^{-/-} et du système de recombinaison CRE-LOX, les résultats seront présentés sous forme de l'article, récemment publié dans *Journal of Hepatology*. Les souris L-*G6pc*^{-/-} ont été caractérisées pendant 18 mois; elles sont normoglycémiques à l'état nourri et présentent des taux plasmatiques élevés de triglycérides, de cholestérol, d'acide urique et de lactate. En plus du développement d'une hépatomégalie et d'une stéatose hépatique, les souris L-*G6pc*^{-/-} développent des adénomes hépatocellulaires, dès 9 mois après la délétion. Ces souris présentent donc toutes les caractéristiques de la pathologie hépatique des patients GSD 1a.

I. Génération du modèle de souris L-G6pc^{-/-}

Les souris ont été produites par une stratégie CRE-LOX, à l'institut clinique de la souris (ICS) à Strasbourg, grâce à un soutien financier AFM/GIS obtenu en 2004-2005.

I.1. Le système CRE-LOX (figure 16)

Le système CRE-LOX permet de réaliser une recombinaison à un site spécifique sur l'ADN (Babinet and Cohen-Tannoudji, 2000; Nagy, 2000). Il est utilisé comme un outil génétique afin de réaliser, *in vivo*, des mutations ou des invalidations au niveau d'un gène d'intérêt. Ce système, identifié chez le bactériophage P1, est composé d'une recombinaison bactérienne Cre, capable de reconnaître une séquence spécifique sur l'ADN de 34 paires de bases appelée site LoxP (figure 16A). Cette séquence est constituée de deux séquences palindromiques de 13pb, séparées par une séquence de 8pb. Après une reconnaissance et une fixation sur les sites LoxP, la recombinaison Cre provoque une coupure de l'ADN et la recombinaison a lieu entre deux sites LoxP. Lorsque les deux sites LoxP ont la même orientation, la région d'ADN située entre ces deux sites est éliminée sous forme circulaire (figure 16B).

In vivo, les sites LoxP sont introduits, dans la même orientation, de part et d'autre d'un gène d'intérêt, par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires (cellules ES), à l'aide d'un vecteur de ciblage. Un allèle portant les sites LoxP est dit « floxé ».

➤ **Tissu-spécificité**

L'avantage majeur de ce système est la possibilité de contrôler la spécificité tissulaire d'excision de la séquence génique floxée. L'utilisation d'une Cre exprimée sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire permet l'excision dans l'ensemble du génome de l'embryon. En revanche, si l'expression de la recombinaison Cre est placée sous le contrôle d'un promoteur tissu-spécifique, la délétion sera tissu-spécifique. Ainsi, le gène d'intérêt sera floxé dans tout l'organisme mais la restriction de l'expression de la recombinaison dans un tissu spécifique permettra l'excision uniquement au sein de ce tissu.

Actuellement, un grand nombre de souris transgéniques exprimant la Cre spécifiquement dans un tissu ou dans un type cellulaire sont disponibles (Jax mice database, The Laboratory Jackson).

➤ *Cre inducible par le tamoxifène*

La délétion de certains gènes est létale lors de la période néonatale. Pour s'affranchir de ce problème, l'induction de la délétion peut être contrôlée dans le temps, grâce à l'utilisation d'une recombinaise Cre inducible. La recombinaise Cre a été modifiée et est exprimée sous la forme d'une protéine de fusion entre la recombinaise et le domaine de fixation au ligand du récepteur aux œstrogènes (Feil et al., 1996). Cette recombinaise Cre-ERT2 est active uniquement après l'injection d'un ligand (figure 17). Le domaine de liaison au ligand du récepteur aux œstrogènes a été modifié afin qu'il présente une affinité plus forte pour un œstrogène de synthèse, le tamoxifène, que pour les œstrogènes naturels. En absence de tamoxifène, la Cre-ERT2 est exprimée mais reste localisée au niveau cytoplasmique. Après injection de tamoxifène, la cre-ERT2 est activée et est transloquée au niveau du noyau, où elle va pouvoir reconnaître les sites loxP du gène floxé et induire l'excision de ce gène.

L'ICS propose à la communauté scientifique différentes lignées de souris transgéniques exprimant la Cre-ERT2 de façon tissu-spécifique (ICS, « The CreERT2 Zoo mouse resource »). Ces souris permettent d'obtenir le contrôle spatiotemporel de l'excision du gène ciblé.

I.2. Génération des souris $G6pc^{lox}$.

Le vecteur de ciblage, utilisé pour créer un allèle $G6pc$ floxé, contient, dans la région 5', un bras d'homologie de 4,5kb du gène $G6pc$ et dans la région 3', une cassette de sélection contenant le gène néomycine, flanquée de site Frt et un bras d'homologie de 3kb du gène $G6pc$ (Figure 1a, J. Hepatol). Les sites loxP ont été introduits dans les introns entourant l'exon 3 du gène. L'exon 3 du gène a été choisi car il contient un acide aminé essentiel du site catalytique de l'enzyme (cf Figure 8B) (Pan et al., 1998). En plus des bras d'homologie, le vecteur contient un gène de résistance à la néomycine et le gène codant la thymidine kinase. Le gène néomycine apporte une résistance à la drogue G418 et permet une sélection positive pour l'intégration du vecteur par recombinaison homologue. Le gène de la

thymidine kinase permettra une sélection négative des clones dans lesquels le vecteur se sera intégré de façon aléatoire, en présence de ganciclovir.

Le vecteur a été introduit par électroporation dans des cellules ES de souris 129SV. Une double sélection par le G418 et le ganciclovir a été réalisée sur les cellules ES. Seuls, les clones ayant intégré par recombinaison homologue le vecteur sont résistants aux deux drogues et se multiplient. L'intégration est confirmée par Southern Blot. Deux clones positifs ont ensuite été injectés dans des blastocystes de souris C57Bl6J. La colonisation des cellules germinales par ces cellules ES génétiquement modifiées donnera naissance à des souris chimères. Les mâles chimères sont ensuite croisés avec des femelles exprimant la recombinase FLP afin d'éliminer la cassette de sélection Neo. Le système Frt-FLP est également un système de recombinaison site spécifique, identifié chez la levure. Les souris G6pc « floxées » ont été ensuite « backcrossées » sur un fonds génétique C57Bl/6J pendant 10 générations.

I.3. Génération des souris invalidées spécifiquement pour le gène *G6pc* au niveau du foie

Les souris hétérozygotes pour le gène *G6pc* floxé ($B6.G6pc^{lox/+}$) ont été croisées avec des souris exprimant la recombinase CreERT2 sous le contrôle du promoteur de la sérum albumine ($B6.SA^{creERT2/+}$), conférant ainsi la spécificité hépatique d'expression de la recombinase (figure 3A) (Schuler et al., 2004).

Les souris hétérozygotes $B6.G6pc^{lox/+}/SA^{creERT2/+}$ sont ensuite croisées entre elles pour obtenir des souris homozygotes $B6.G6pc^{lox/lox}/SA^{creERT2/+}$ (figure 18A).

Afin d'induire l'excision de l'exon 3, les descendants $B6.G6pc^{lox/lox}/SA^{creERT2/+}$ et $B6.G6pc^{lox/+}/SA^{creERT2/+}$, âgés de 6 à 8 semaines, ont reçu une injection quotidienne de tamoxifène (Sigma) (1mg dilué dans de l'huile de colza) durant 5 jours, pour obtenir les souris L- $G6pc^{-/-}$ et L- $G6pc^{+/-}$, respectivement (figure 18B).

Dans l'ensemble de nos études, les souris témoins C57Bl/6J proviennent de Charles River (L'Arbresle, France) à l'âge de 3-6 semaines et reçoivent le même traitement au tamoxifène.

Les différentes lignées sont hébergées à l'animalerie conventionnelle ALECS (Lyon) dans des conditions d'élevage contrôlées (température de 21°C, Cycle jour/nuit 12h/12h), avec un accès libre à l'eau et à la nourriture (A04, Safe).

I.4 Génotypage des souris

Le génotypage des souris est réalisé à partir d'un morceau de queue, prélevée à l'âge de 10 jours. La vérification de l'excision de l'exon 3, spécifiquement au niveau du foie est réalisée, à partir d'ADN génomique (ADNg) de foie, lors de l'euthanasie des animaux.

➤ **Purification de l'ADN génomique**

L'ADNg est extrait à partir d'un morceau de queue ou de foie de souris, digéré à 55°C toute une nuit par 3µL de protéinase K (10mg/ml) dans 400µL de tampon de lyse (100mM Tris-HCl pH 8,5, 5mM EDTA, 0,2% SDS, 200mM NaCl). Après une centrifugation de 10 min à 10 000g, le surnageant est prélevé et l'ADN est précipité par 800µL d'éthanol 100%. La pelote d'ADN est reprise dans un tampon Tris 10mM, EDTA 0,5mM pH 8,0.

➤ **Génotypage par PCR**

Afin de déterminer le génotype des souris, des PCR sont réalisées, à partir de l'ADNg extrait de la queue, pour vérifier d'une part, la présence du gène *G6pc* floxé et, d'autre part, la présence de la recombinase Cre-ERT2.

La première PCR est réalisée en utilisant le couple d'amorce p2-p3 (figure 1A, tableau 1, J. Hepatol) et permet l'amplification d'un fragment de 385pb sur un allèle *G6pc* sauvage ou de 486pb sur un allèle *G6pc* floxé (figure 1B, J. Hepatol). La deuxième PCR utilise le couple d'amorce CreS-CreAS (tableau 1, J. Hepatol) et permet l'amplification d'un fragment de 320pb chez les souris transgéniques SA^{+creERT2} (figure 1B, J. Hepatol).

L'action de la Cre au niveau du foie est vérifiée par PCR en utilisant le couple d'amorce p1-p3 (figure 1A, tableau 1, J. Hepatol), à partir d'ADNg extrait à partir du foie et permet l'amplification d'un fragment de 1029 pb sur un allèle *G6pc* sauvage et 595 pb sur un allèle *G6pc* dont l'exon 3 a été excisé (figure 1C, J. Hepatol).

Les PCR sont réalisées à partir de 500ng d'ADNg et le milieu réactionnel est composé des amorces sens et anti-sens (1µM), de dNTPs (0,2mM), de MgCl₂ (1,5mM), de 1U de Taq Polymérase (QBiogen). L'amplification est effectuée selon le programme suivant : pré-dénaturation (1min à 94°C), puis 35 cycles [dénaturation (30sec à 94°C), hybridation (45sec à 62°C), élongation (30sec à 72°C ou 1min30 pour la PCR p1-p3)] et une étape finale

d'élongation de 10 min à 72°C. Les produits PCR sont analysés sur un gel d'agarose 2% et visualisés sous lampe UV, en présence de bromure d'éthidium.

II. Caractérisation du modèle de souris L-G6pc^{-/-} : un modèle de GSD 1a hépatique

Article :

Targeted deletion of liver glucose-6 phosphatase mimics glycogen storage disease type 1a including development of multiple adenomas.

Targeted deletion of liver glucose-6 phosphatase mimics glycogen storage disease type 1a including development of multiple adenomas

Elodie Mutel^{1,2,3}, Aya Abdul-Wahed^{1,2,3}, Nirilanto Ramamonjisoa^{2,3,4}, Anne Stefanutti^{1,2,3}, Isabelle Houberton^{1,2,3}, Sophie Cavassila^{2,3,4}, Frank Pilleul^{2,3,4}, Olivier Beuf^{2,3,4}, Amandine Gautier-Stein^{1,2,3}, Armelle Penhoat^{1,2,3}, Gilles Mithieux^{1,2,3}, Fabienne Rajas^{1,2,3,*}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U855, Lyon F-69008, France; ²Université de Lyon, Lyon F-69008, France; ³Université Lyon1, Villeurbanne F-69622, France; ⁴Creatis-LRMN, CNRS UMR 5220, Inserm U630, INSA-Lyon, Villeurbanne F-69622, France

Background and Aims: Glycogen storage disease type 1a (GSD1a) is an inherited disease caused by a deficiency in the catalytic subunit of the glucose-6 phosphatase enzyme (G6Pase). GSD1a is characterized by hypoglycaemia, hyperlipidemia, and lactic acidosis with associated hepatic (including hepatocellular adenomas), renal, and intestinal disorders. A total *G6pc* (catalytic subunit of G6Pase) knock-out mouse model has been generated that mimics the human pathology. However, these mice rarely live longer than 3 months and long-term liver pathogenesis cannot be evaluated. Herein, we report the long-term characterization of a liver-specific *G6pc* knock-out mouse model (*L-G6pc*^{-/-}). **Methods:** We generated *L-G6pc*^{-/-} mice using an inducible CRE-lox strategy and followed up the development of hepatic tumours using magnetic resonance imaging.

Results: *L-G6pc*^{-/-} mice are viable and exhibit normoglycemia in the fed state. They develop hyperlipidemia, lactic acidosis, and uricemia during the first month after gene deletion. However, these plasmatic parameters improved after 6 months. *L-G6pc*^{-/-} mice develop hepatomegaly with glycogen accumulation and hepatic steatosis. Using an MRI approach, we could detect hepatic nodules with diameters of less than 1 mm, 9 months after induction of deficiency. Hepatic nodules (1 mm) were detected in 30–40% of *L-G6pc*^{-/-} mice at 12 months. After 18 months, all *L-G6pc*^{-/-} mice developed multiple hepatocellular adenomas of 1–10 mm diameter.

Conclusions: This is the first report of a viable animal model of the hepatic pathology of GSD1a, including the late development of hepatocellular adenomas.

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

Keywords: Glycogen storage disease; Glucose-6 phosphatase; Endogenous glucose production; Hepatic steatosis; Hepatic adenomas.

Received 28 May 2010; received in revised form 28 July 2010; accepted 31 August 2010; available online 1 October 2010

*Corresponding author. Address: Faculté de Médecine Laennec, 7 Rue Guillaume Paradin, 69372 Lyon cedex 08, France. Tel.: +33 478 77 10 28; fax: +33 478 77 87 62.

E-mail address: fabienne.rajas@univ-lyon1.fr (F. Rajas).

Abbreviations: G6Pase, glucose-6 phosphatase; G6PC, catalytic subunit of G6Pase; GSD1a, glycogen storage disease type 1a; wt, wild type; NEFA, non esterified fatty acid; HCA, hepatocellular adenomas; MRI, magnetic resonance imaging.

Introduction

Glycogen storage disease type I (GSD1) is a metabolic disorder characterized by severe hypoglycaemia associated with hepatic, renal, and intestinal disorders [1]. This inborn disease is due to a deficiency in glucose-6 phosphatase (G6Pase) activity. G6Pase is an essential enzyme for endogenous glucose production. Patients affected with GSD1 are therefore unable to maintain blood glucose concentration outside the time of meals and suffer from severe hypoglycaemic episodes if they are not managed by continuous feeding [2–4]. GSD type 1a and type 1b, respectively correspond to inherited mutations in the genes that encode the catalytic subunit (G6PC) and the transporter unit (G6PT) of the G6Pase system [1,2,5,6]. The *G6pc* gene is expressed in the liver, kidney, and intestine, and these are the only organs that release glucose into the blood circulation [7–10]. G6Pase deficiency leads to the accumulation of glucose-6 phosphate (G6P), glycogen, and triglycerides in the liver and kidneys of patients. This results in marked hepatomegaly and nephromegaly. In the liver, the long-term complications of G6Pase deficiency include focal nodular hyperplasia and more often hepatocellular adenomas (HCA) with risk of malignant transformation [11,12]. These tumours are often bleeding, multiple, and non-encapsulated. The current treatments to prevent hypoglycaemia are based on nocturnal nutrition [13]. When HCA or liver failure occurs, the management strategies are resection of the tumour and/or liver transplantation [14,15].

To gain further insights into the long-term mechanisms of the disease and to evaluate potential treatment strategies, an animal model with sufficient life expectancy is required. Identification of the *G6pc* gene in 1993 has enabled a *G6pc*-knock-out mouse model to be developed [16,17], as well as the evaluation of gene therapy approaches to correct *G6pc* deficiency ([18,19], see [20] for review). However, long-term complications cannot be evaluated because, even with continuous glucose therapy, the total *G6pc* knock-out mice rarely live to be over 3 months of age [16]. To investigate the long-term biology and pathogenesis of GSD-1a, we generated liver-specific *G6pc*^{-/-} mice by an inducible CRE (CRE^{ERT2}) strategy. We give a detailed characterization of this novel GSD1a mouse model over 18 months following inactivation of the *G6pc* gene in the liver.



Research Article

Materials and methods

Generation of B6.g6pc^{lox} mice

The targeting vector used for the homologous recombination strategy is shown in Fig. 1A and contained a 4.5 kb 5' homologous *g6pc* arm, a 3 kb 3' homologous *g6pc* arm, and a neomycin resistance (*Neo^R*) cassette. Two *loxP* sites flank *G6pc* exon 3 and two *Frt* sites flank *Neo^R*. We electroporated 129S2/SvPas mouse embryonic stem (ES) cells with the linearized construct. After selection, targeted clones were identified by PCR with external primers, and confirmed by Southern blotting with 5' and 3' external probes. Two positive ES clones were injected into C57Bl/6j blastocysts. The male chimeras were mated with transgenic females expressing Flp recombinase to delete the *Neo^R* cassette. Then, the B6; *g6pc^{lox/w}* mice were backcrossed with the C57Bl/6j strain for 10 generations (Charles Rivers Laboratories).

Generation of liver-specific *G6pc*-null mice

The B6.g6pc^{lox/w} mice were crossed with transgenic mice expressing the inducible CRE^{ERT2} recombinase under the control of the serum albumin promoter to confer its liver-specific expression (B6.SA^{creERT2/w}) [21]. B6.SA^{creERT2/w} mice expressed, only in the liver, a recombinant Cre recombinase fused to a mutated ligand-binding domain of the estrogen receptor resulting in a tamoxifen-depend-

ent Cre-recombinase [22,23]. To induce the excision of *G6pc* exon 3, male adult (6–8 weeks old) B6.g6pc^{lox/w}.SA^{creERT2/w} and B6.g6pc^{lox/w}.SA^{creERT2/w} mice were injected intraperitoneally once daily with 100 µl of tamoxifen (10 mg/ml, Sigma–Aldrich) on five consecutive days, to obtain L-*g6pc^{-/-}* and L-*g6pc^{+/-}* mice, respectively. Control C57Bl/6j mice were treated with similar tamoxifen injections. All mice were housed in the animal facility of Lyon 1 University (*Animaleries Lyon Est Conventiennelle et SPF*) in controlled temperature (22 °C) conditions, with a 12-h light-12-h dark cycle. Mice had free access to water and standard rodent chow (Safe). Fasted mice were provided with continual free access to water. All the procedures were performed in accordance with the principles and guidelines established by the European Convention for the Protection of Laboratory Animals. The regional animal care committee (CREEA, CNRS, Rhône-Alpes Auvergne, France) approved all experiments. Mouse genotypes were determined from genomic DNA by PCR, with specific primers (Table 1, see Fig. 1). Genomic DNA was extracted from tissues in PCR Direct Lysis buffer (Euromedex).

Magnetic resonance imaging

As previously described [24,25], we performed MRI scans on mice anesthetized by isoflurane inhalation. This was done using a horizontal Biospec-7T Bruker system (Bruker, Ettlingen, Germany) with a cylindrical volumetric coil of 32 mm internal diameter (Rapid Biomedical, Würzburg, Germany). The body temperature of the mice was maintained at 37 °C by warm water circulation. A pressure

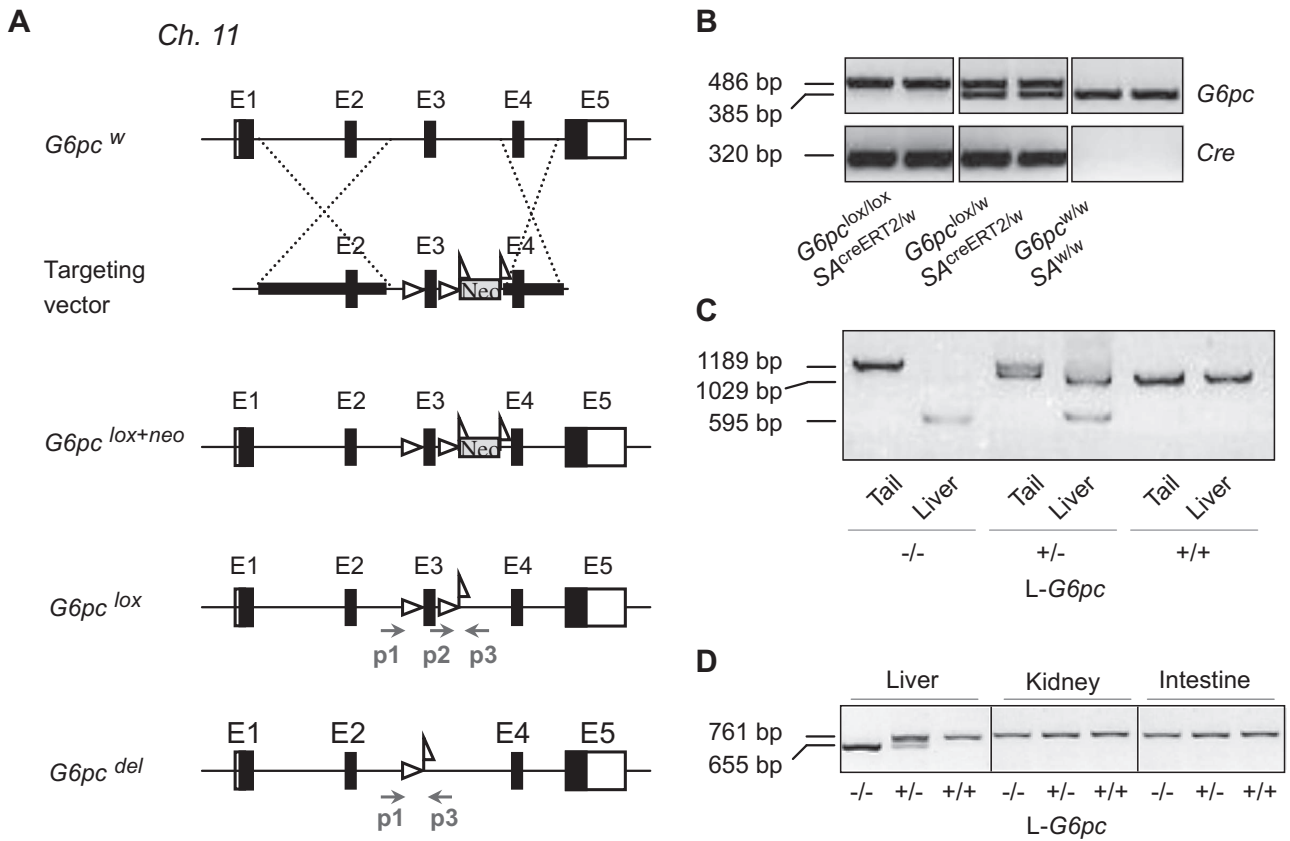


Fig. 1. Targeting strategy used to generate liver-specific *g6pc* null mice (L-*g6pc^{-/-}*). (A) Scheme of the wild-type *G6pc* allele (*G6pc^w*), located on chromosome 11, and the targeting vector. Black rectangles represent exons and the 5' and 3' untranslated sequences are indicated by white rectangles. In the targeting vector map, *LoxP* sequences are represented as triangles and flags indicate *frt* sequences. *Neo^R*: neomycin resistance gene cassette. Bold line segments: arms of homology. After homologous recombination between the *G6pc^w* locus and the targeting vector in ES cells, *Neo^R* was removed to obtain the *G6pc^{lox}* allele through FLP recombination. Exon 3 of *G6pc* was specifically excised by CRE recombination (*G6pc^{del}*). Specific primers (Table 1) for genotyping were identified (p1, p2 and p3). (B) PCR genotype analysis on the basis of tail DNA, using the p2 and p3 primers, which yielded products of 385 and 486 bp for the wild-type and floxed *G6pc* alleles, respectively. Specific primers were used to amplify a 320 bp *Cre* fragment. The expected sizes are shown on the left of the panel. (C) PCR genotype analysis on the basis of tail and liver DNA, using p1 and p3 primers. Fragments of 1189, 1029, and 595 bp correspond to the *G6pc^{lox}*, *G6pc^w*, and *G6pc^{del}* alleles, respectively. (D) Liver-specific excision of *G6pc* exon 3. RT-PCR analysis on liver, kidney or intestine mRNA, from L-*g6pc^{-/-}*, L-*g6pc^{+/-}* and L-*g6pc^{+/+}* (C57Bl/6j) mice, using *G6pc* exon 2 and exon 5 primers. A 761 bp DNA fragment is obtained from the wt allele and the deletion of exon 3 yields a 655 bp DNA fragment. Comparable data were obtained at 10 days or 18 months after tamoxifen treatment.

sensor was placed on the abdomen to monitor the respiratory cycle and to synchronize image acquisition with respiratory motion using a Trigger Unit HR V2.0 (Rapid Biomedical, Würzburg, Germany). Scout scans were performed to identify regions of interest and graphical prescriptions for the following scan. Then, T2-weighted contrast images were acquired and analyzed in the axial plane based on a fat suppressed (FS) rapid acquisition with relaxation enhanced (RARE) sequence with the following parameters: echo time (TE) 40.4 ms, field of view (FOV) 30 × 30 mm², matrix 256 × 192, 36 or 48 slices, slice thickness 0.5 mm, RARE factor = 8. As previously described [24], the sequence was synchronized with respiration using balanced acquisitions over several respiratory periods with an effective repetition time (TR) of about 6 s. Reading of MR images to detect adenomas was performed by a trained radiologist who had over fifteen years of experience.

Metabolic studies

Blood was withdrawn from the tail vein and collected into EDTA or sodium fluoride/oxalate (anticoagulant). Plasma glucose, triglycerides, total cholesterol, uric acid, and lactate concentrations were determined with Biomérieux colorimetric kits. Glucose-6 phosphate and glycogen determinations were carried out on frozen tissue homogenates as previously described [26,27].

Gene expression analysis

Mice were killed by cervical dislocation 6 h after food removal. The frozen tissues were sampled, and G6Pase and PEPCK activities determined as previously described [10,28–30]. Immunoblotting was carried out using purified anti-rat G6PC (use at 1:1500) or anti-PEPCK (use at 1:5000; Santa Cruz Biotechnology) antibodies [31]. Total RNAs were isolated from tissues with TRIzol reagent (Invitrogen). Reverse transcription and real-time PCR were performed as previously described [32], using sequence-specific primers (Table 1). The mouse ribosomal protein mL19 transcript (*Rpl19*) was used as a reference.

Table 1. Oligodeoxyribonucleotide primer sequences for PCR (top) and qPCR (bottom). S = sense and AS = antisense sequences.

Name	Sequence
p1S	5' AGGGAGTTGACCAGAGGAACCTTGG 3'
p2S	5' GCTCATTCTCACACCTACAGTTGG 3'
p3AS	5' TGTTCCCTAACTACTGAGCCATTGCTCC 3'
CreS	5' TTCCCGCAGAAC CTGAAGATGTTTCG 3'
CreAS	5' GGGTGTATAAGCAATCCCCAGAAATGC 3'
Exon 2 mG6pc S	5' TCCCTGTACCTGTGAG 3'
Exon 5 mG6pcAS	5' CACAAGAAGTCTTTGTAA 3'
Exon1 mG6pc S	5' TTACCAAGACTCCCAGGACTG 3'
Exon2 mG6pc AS	5' GAGCTGTTGCTGTAGTAGTCG 3'
mL19S	5' AGAAGATTGACCGCCATAT 3'
mL19AS	5' TTCGTGCTTCCTTGGTCTTAGA 3'
G6pc3S	5' GCACATTTCCCTCACCAAGT 3'
G6pc3AS	5' GGTGATGGACCAGGAAAGA 3'
G6ptS	5' TGGTTGGTCTGGTCAACGTA 3'
G6ptAS	5' TGCCAAGATAGGTCCCAAAC 3'
Pck1S	5' AGCCTTTGGTCAACAACTGG 3'
Pck1AS	5' TGCCTTCGGGTTAGTTATG 3'

Histological analysis

Tissues were fixed with 10% formalin and embedded in paraffin. Cross-sections (5 μm thick) were cut and stained with hematoxylin and eosin (H&E), periodic Acid Schiff (PAS), and picrosirius red staining. The slides were examined under a Coolscope microscope (Nikon, Tokyo, Japan).

Statistical analyses

Results are reported as means ± SEM. The various groups were compared by Mann–Whitney tests. Differences were considered statistically significant if *p* < 0.05.

Results

Generation of a time-dependent and liver-specific deficiency of G6Pase in mice

We disrupted G6Pase activity in the liver, by time dependent (conditional) and tissue-specific invalidation of the *G6pc* gene, based on a CRE-lox strategy. As endogenous glucose production, especially from the liver, is critical during the neonatal period (because of the low content of glucose in milk) [33,34], we have induced gene deletion in adult mice. Male B6.g6pc^{lox/w}.SA^{creERT2/w} and B6.g6pc^{lox/lox}.SA^{creERT2/w} mice (see genotyping in Fig. 1B) were therefore treated with tamoxifen at 7–8 weeks of age. This resulted in the specific excision of exon 3 from both *G6pc* alleles in the liver (Fig. 1C). The liver-specific deletion of exon 3 in *G6pc* was confirmed at the mRNA level by RT-PCR on mRNA from the liver, kidney, and intestine of L-*G6pc*^{-/-} and L-*G6pc*^{+/-} mice. Truncated *G6pc* mRNA was only amplified in the liver from L-*G6pc*^{-/-} and L-*G6pc*^{+/-} mice (Fig. 1D). Hepatic G6Pase activity was undetectable after one month of gene deletion (0.31 ± 0.13 U/g of protein in L-*G6pc*^{-/-} versus 68.0 ± 2.1 U/g of protein in control mice) (Fig. 2A). Liver G6Pase activity remained undetectable in L-*G6pc*^{-/-} mice (0.30 ± 0.08 U/g of protein in L-*G6pc*^{-/-}) after 18 months, confirming the persistence of the *G6pc* inactivation. Western-blot analyses confirmed the absence of the G6PC protein from livers of L-*G6pc*^{-/-} mice (Fig. 2A). In heterozygous mice (L-*G6pc*^{+/-}), G6Pase activity was only half of that in control mice (39.2 ± 2.9 U/g of protein in L-*G6pc*^{+/-}) and was correlated with the amount of G6PC protein detected on western blots (Fig. 2A). Transcription of truncated *G6pc* mRNA appeared to be up regulated, with three times more *G6pc* mRNA in the liver of L-*G6pc*^{-/-} mice than in controls (Fig. 2B). This implies that there is a compensatory increase in gene expression in response to the absence of G6PC protein. The expression of cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-c, *Pck1*) was unaltered (Fig. 2C and D). The expression of the genes encoding glucose-6-phosphate translocase (*G6PT*, *Slc37a4*) and the transporter subunit of G6Pase remained unchanged (Fig. 2E). The expression of the ubiquitous (non gluconeogenic) glucose-6-phosphatase-related protein (*G6PC3* or *UGRP*) was also unaffected (Fig. 2F).

Metabolic effects of hepatic *G6pc* deficiency in mice

The male and female L-*G6pc*^{-/-} mice showed similar survival rates to C57Bl/6J control (WT) and L-*G6pc*^{+/-} heterozygous mice (data not shown). However, in contrast to total *G6pc*^{-/-} mice, which are reported to have growth retardation [16], the loss of G6Pase, specifically in the liver during adulthood, had only mar-

Research Article

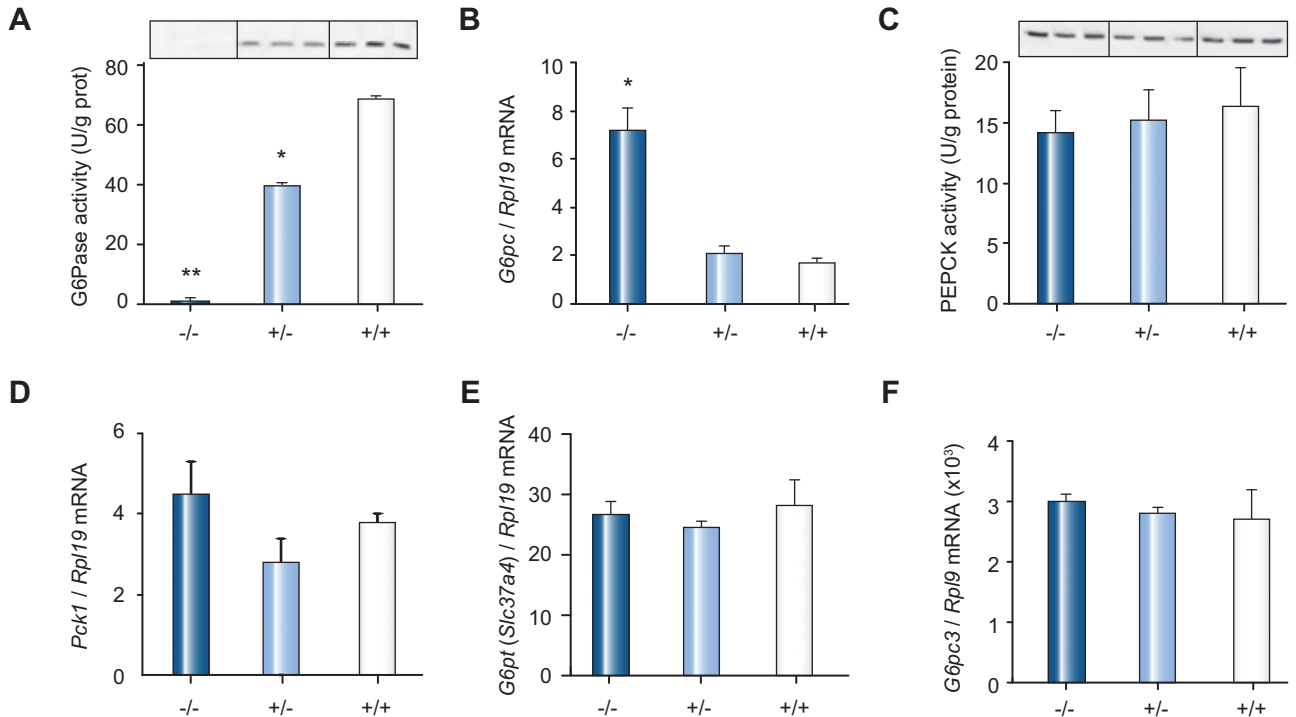


Fig. 2. Glucose-6-phosphatase is absent in the liver of liver-specific *G6pc*-null mice (*L-G6pc*^{-/-}). (A and C) G6Pase and PEPCK-c activities were assayed in the liver of homozygous *L-G6pc*^{-/-} (dark blue bar), heterozygous *L-G6pc*^{+/-} (light blue bar) and WT (white bar) mice. Top of panels, western-blot analyses of liver tissues for G6PC and PEPCK-c proteins. (B, D, E and F) *G6pc*, *Pck1*, *G6pt* (*Slc37a4*) and *G6pc3* mRNA levels were determined by RT-qPCR in the liver of *L-G6pc*^{-/-} (dark blue bar), *L-G6pc*^{+/-} (light blue bar) and WT (white bar) mice. The results are expressed as a ratio relative to *Rpl19* expression. Data were obtained five weeks after tamoxifen injections from mice fasting for 6 h and are expressed as means \pm SEM ($n = 6$ mice per group). Values which are significantly different from WT ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$) are indicated.

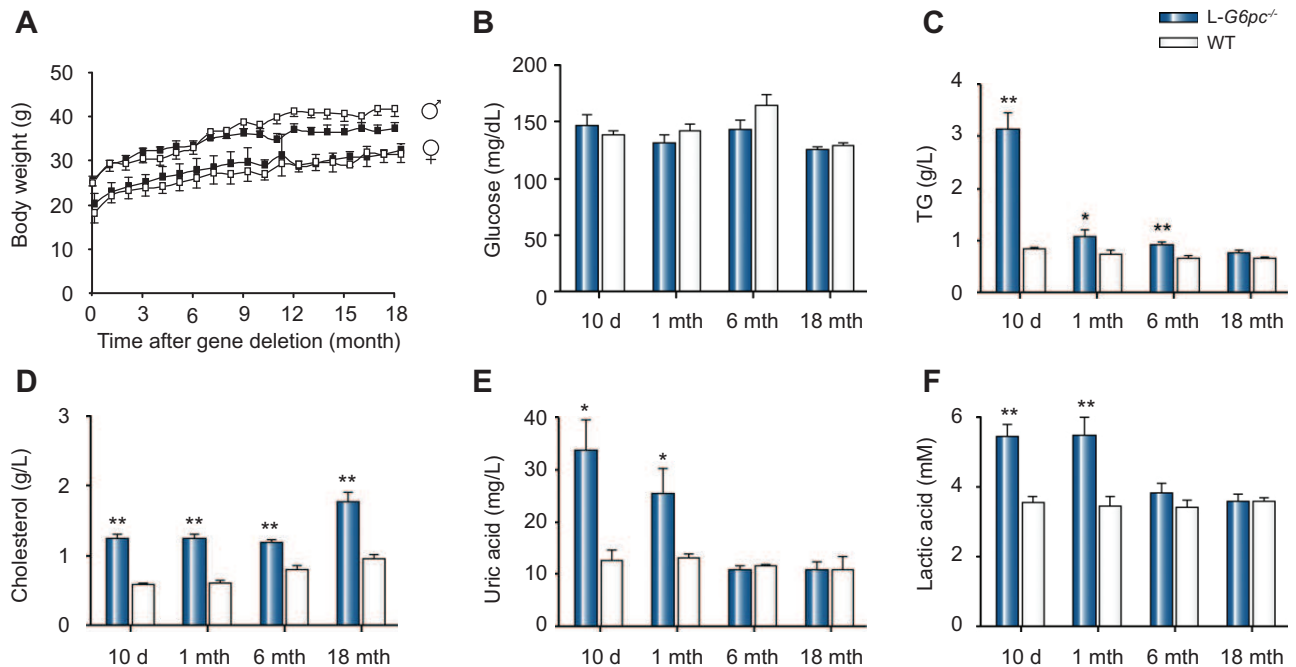


Fig. 3. Body weight and plasmatic parameters of *L-G6pc*^{-/-} mice. (A) Growth rates of *L-G6pc*^{-/-} (black symbols) and WT (white symbols) male and female mice. Body weight was followed once a month after gene deletion. Blood glucose (B), triglycerides (C), total cholesterol (D), uric acid (E), and lactic acid (F) were analyzed at 10 days, 1 month, 6 months, and 18 months after gene deletion in *L-G6pc*^{-/-} (dark blue bars) and control *L-G6pc*^{+/-} (white bars) mice upon 6 h of fasting, except for glucose, which was determined in the fed state. Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 6-8$ per group). Values significantly different from WT ($p < 0.05^*$ and $p < 0.01^{**}$) are indicated.

ginal effect, if any, on weight gain (Fig. 3A). Therefore, L-G6pc^{-/-} mice are fully viable and do not require glucose therapy to survive [16]. After some hours of fasting, the blood glucose concentration in L-G6pc^{-/-} mice could be lowered to about 3 mM (data not shown). This is consistent with the crucial role of hepatic glycogenolysis in endogenous glucose production during the early post-absorptive state. However, in the fed state, mean blood glucose concentration in L-G6pc^{-/-} mice was similar to L-G6pc^{+/-} and control mice (Fig. 3B). The blood glucose concentrations in L-G6pc^{+/-} mice were similar to those of control mice (around 150 mg/dl), even after 6 h of fasting (data not shown). This is consistent with the absence of blood glucose problems and any pathological phenotype in heterozygous human patients [3].

Biochemical analyses revealed highly disturbed plasma parameters just after deletion of G6pc in the liver. After ten days, L-G6pc^{-/-} mice had plasma triglyceride and uric acid concentrations that were three times as high as those in control mice as well as plasma cholesterol concentrations that were twice as high (Fig. 3C–E). L-G6pc^{-/-} mice also had a plasma lactic acid concentration that had increased by 50% compared with control mice (Fig. 3F). These concentrations remained high one month after gene deletion, but they then normalized with time; all metabolic plasma parameters except for cholesterol were normalized after 18 months (Fig. 3C–F).

L-G6pc^{-/-} mice develop hepatomegaly and steatosis

As in GSD-1a patients and total G6pc knock-out mice, loss of hepatic G6PC led to the accumulation of hepatic glucose-6 phosphate (G6P), glycogen, and triglycerides, which resulted in hepa-

tomegaly and steatosis (Fig. 4). Livers of L-G6pc^{-/-} mice were enlarged and pale (Fig. 4A) and accounted for about 8% of total body mass, versus only 4% in control mice (Fig. 4C). The deposition of glycogen increased between 10 days and one month after deletion, to reach about 50 mg of glycogen/g in the L-G6pc^{-/-} liver at 18 months (Fig. 4E). Accumulation of triglycerides in L-G6pc^{-/-} livers also increased with time (Fig. 4F). Histological observations of L-G6pc^{-/-} livers confirmed marked steatosis, with large hepatocytes containing large lipid vacuoles, mainly in the periportal area (Fig. 5F and G). As a result, the portal space was small and distorted (Fig. 5G). Marked glycogen accumulation was also observed by periodic acid-Schiff staining (Fig. 5H). Picrosirius red staining of L-G6pc^{-/-} livers did not reveal any areas of fibrosis (Fig. 5I). In contrast to total G6pc knock-out [16], the kidneys, and intestine of L-G6pc^{-/-} mice did not accumulate any glycogen. After 18 months, the weight (0.16 ± 0.01 g for L-G6pc^{-/-} versus 0.15 ± 0.1 g for controls) and histological features of L-G6pc^{-/-} kidneys were also completely normal (Fig. 5J).

Late appearance of hepatocellular adenomas in L-G6pc^{-/-} mice

Because of the short lifespan of total G6pc^{-/-} mice in the absence of glucose or gene therapy treatment, there was no possibility of detecting HCA. However, in the present study, using MRI, we were able to evaluate the development of nodules in the liver of L-G6pc^{-/-} mice. MRI was performed every three months, from 3 to 18 months after gene deletion. In less than 15% (3 out of 26) of L-G6pc^{-/-} livers, small lesions could be detected as early as 9 months (data not shown). In about 30% (8 out of 26) of L-G6pc^{-/-} mice, small liver nodules of about 1 mm in diameter

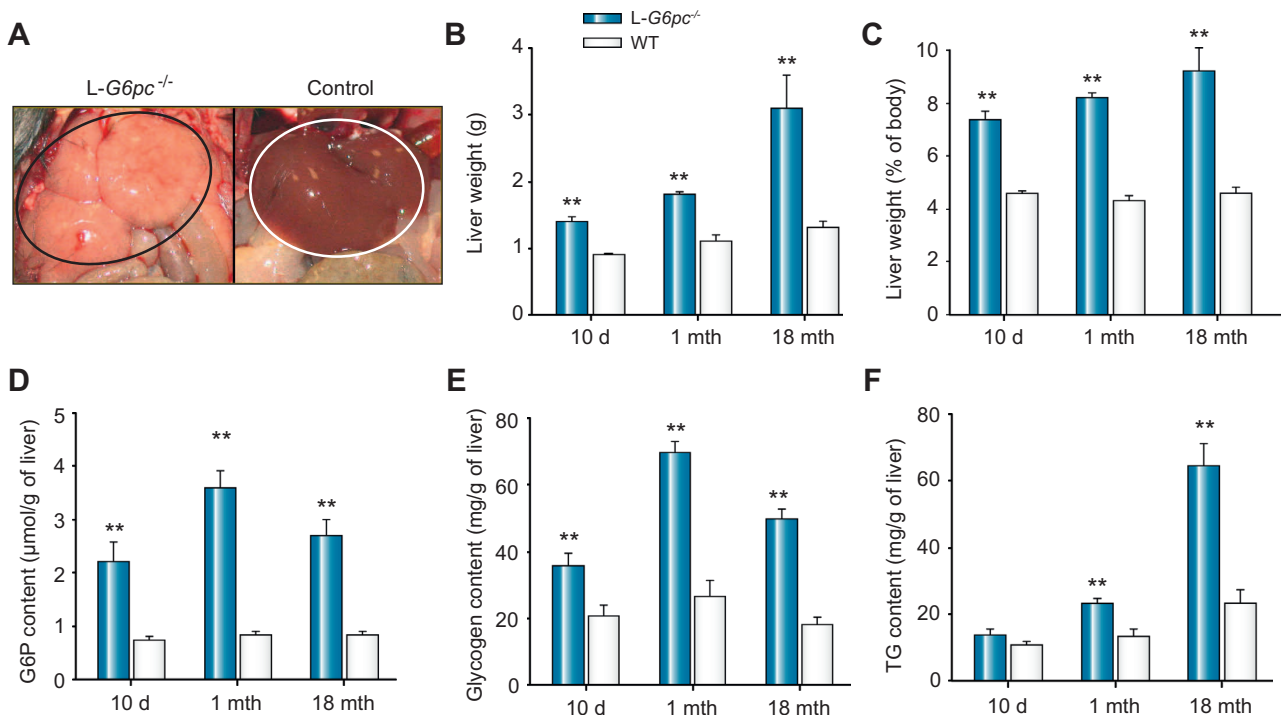


Fig. 4. Liver-specific G6pc null mice develop liver hepatomegaly and steatosis. (A) Livers of L-G6pc^{-/-} and WT mice. (B) Liver weight, (C) liver weight compared to the body weight, (D) liver glucose-6 phosphate content, (E) liver glycogen content (F), liver triglyceride content of L-G6pc^{-/-} (dark blue bar) and WT (white bar) mice. Data were obtained 10 days, 1 month, and 18 months after tamoxifen injections, from mice fasted for 6 h and are expressed as means ± SEM (n = 6 mice per group). Values which significantly different from WT (p < 0.05, p < 0.01**) are indicated.

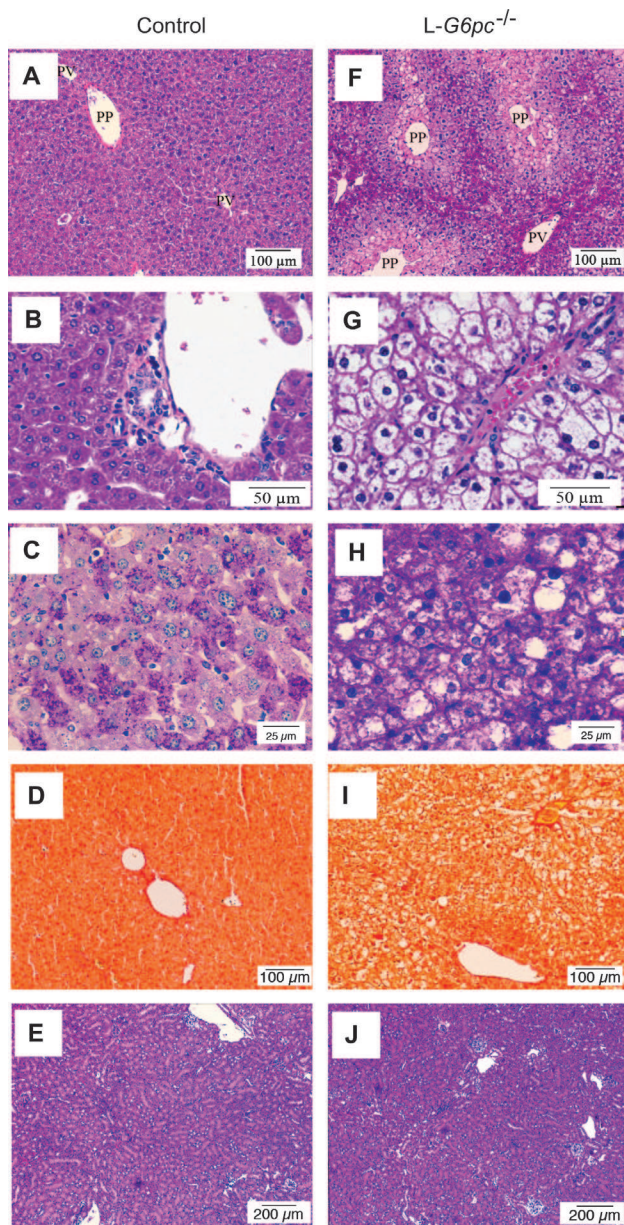


Fig. 5. Histology and glycogen storage analyses of the liver and the kidneys of *L-G6pc*^{-/-} and control mice, one month after tamoxifen treatment. H&E stained sections from the control liver (A and B) and kidneys (E) and from *L-G6pc*^{-/-} livers (F–G) and kidneys (J). PAS-stained liver from control (C) and *L-G6pc*^{-/-} (H) mice. Picosirius red staining of control (D) and from *L-G6pc*^{-/-} (I) mice.

were first detected after one year (Fig. 6A). At 15–16 months, 40–50% of *L-G6pc*^{-/-} mice had liver nodules between 1 and 3 mm diameter. At 18 months, all (*n* = 17) *L-G6pc*^{-/-} mice had developed liver nodules between 1 and 10 mm in diameter (Fig. 6B and C). There was at least one, and up to 5 large nodules (>4–5 mm) in each liver at this time (Fig. 6E and F). Panels 6 A and B show the development of one nodule on MRI from 12 months (6A) through to 18 months (6B) following gene deletion. No obvious necrosis or significant haemorrhage was seen.

Nodules were well demarcated from the surrounding liver, without a fibrous capsule (Fig. 6G and H). More than 20 biopsies of GSD1a livers (*n* = 17 mice) were analyzed by immunohistochemistry (H&S staining). No portal spaces were seen within the nodules. In most cases (80%), the hepatocytes within the nodule were large and swollen, with pale cytoplasm (Fig. 6G and I). Areas of necrosis and inflammation were seen within nodules (Fig. 6I). The tumour shown in Fig. 6G was proved to be an adenoma. In a few cases (about 20%), the hepatocytes within nodules were small, suggesting the development of a “precarcinoma” lesion (Fig. 6H and J). Areas of necrosis and numerous foci of inflammation were also present within these nodules (data not shown). In no case, pericellular fibrosis was observed around hepatic nodules. Moreover, no atypia was noted in any of the nodules. No mice developed hepatocellular carcinoma in the course of this study.

Discussion

The maintenance of blood glucose levels within a narrow range (about 1 g/L) is a critical physiological function. Endogenous glucose production is wholly responsible for maintaining plasma glucose levels when not eating and during fasting. Glucose can be produced only in the liver, kidneys, and intestine, because these are the only organs known to express G6Pase, the key enzyme for endogenous glucose production (for review see [9]). Among these organs, the liver has a special role because it is able to rapidly mobilize glucose stored under the form of glycogen. Although the liver is the main glucose-producing organ under post-absorptive conditions, we hypothesized that the inactivation of *G6pc* in the liver only would not be lethal, because of the compensatory glucose production by the kidneys and intestine. This type of compensation has already been reported during the anhepatic phase of liver transplantation in humans [35], and has been suggested in mice with inactivation of *Pck1* in the liver [36]. In line with our hypothesis, *L-G6pc*^{-/-} mice are normoglycemic in the fed state. This strongly suggests that glucose release by the kidneys and intestine is sufficient to exquisitely regulate blood glucose concentration in *L-G6pc*^{-/-} mice when unrestrained food is available. Furthermore, *L-G6pc*^{-/-} mice had a normal survival rate, which allowed us, for the first time, to evaluate the development of GSD1a pathology in the liver of mice, up to 18 months of age.

As expected, the liver of *L-G6pc*^{-/-} mice is rapidly enlarged, due to the accumulation of glucose-6 phosphate, glycogen, and triglycerides. In parallel, there is a rapid increase in plasma triglycerides, cholesterol, lactic and uric acids, as also observed in human GSD1a patients, and in total *G6pc* knock-out mice [3,4]. Together with the absence of kidney and gut deficiency and phenotype in *L-G6pc*^{-/-} mice, this strongly suggests that the liver deficiency may be fully responsible for the deregulation of plasma parameters in GSD1a. Whereas some liver parameters tended to worsen with time (e.g. liver TG content), others (blood parameters) progressively decreased towards control values (e.g. uricemia and lactatemia). This suggests that there are some compensatory mechanisms taking place over time to correct the primary defaults initiated by the liver deficiency. Interestingly, a comparable improvement of blood biochemical profile was also observed after some months in the total *G6pc* knock-out mice surviving thanks to pre-weaning management with glucose injection and post-weaning management with Nutragel and glucose added to the drinking water [37]. However, as in

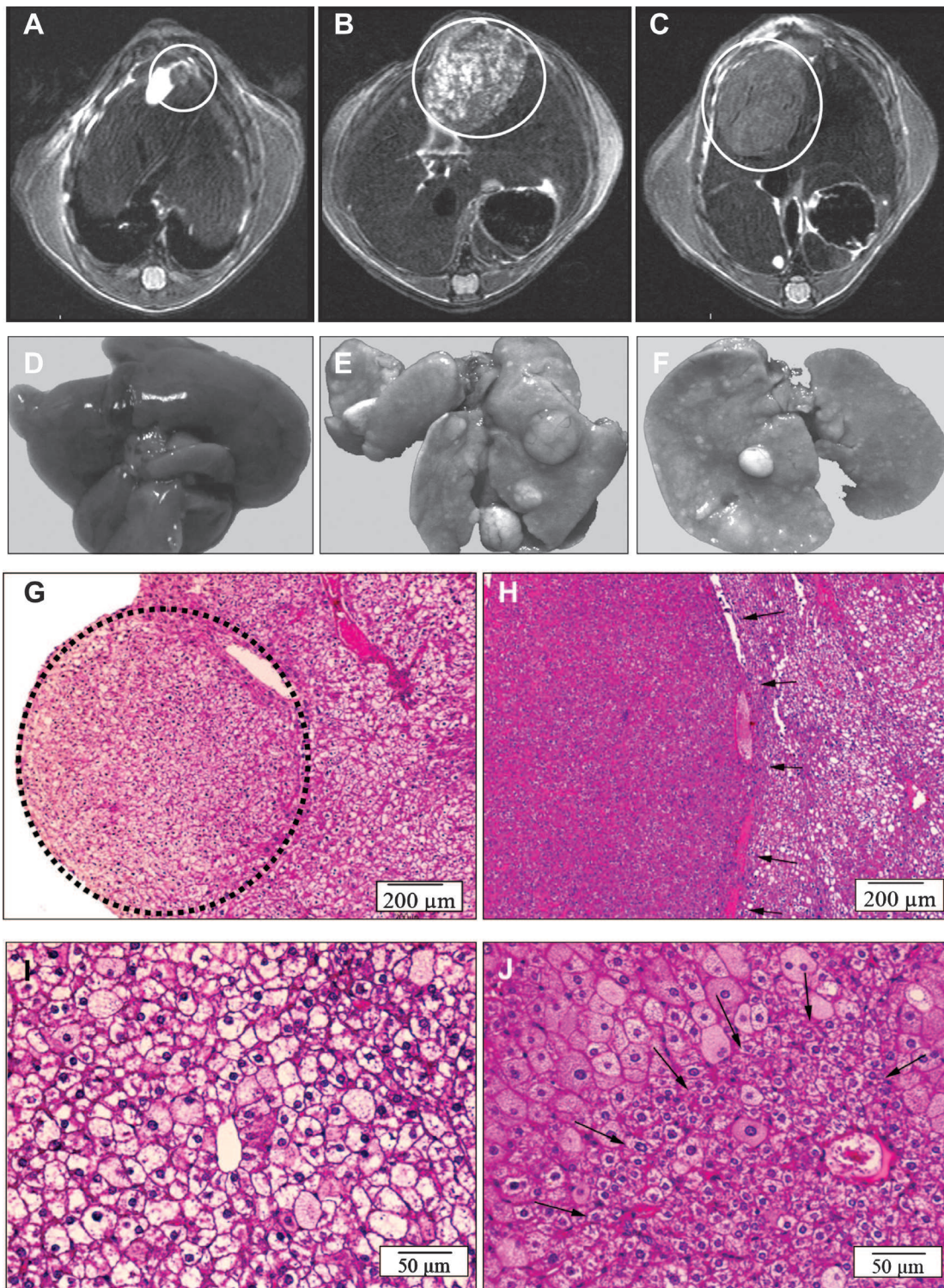


Fig. 6. Development of liver nodules in *L-G6pc*^{-/-} mice after one year of gene deletion. T2-weighted axial MR images showing the evolution of liver lesions at 12 months (A) and 18 months (B and C) after *G6pc* deletion. Liver resection after 18 months of tamoxifen treatment in control mice (D) or in *L-G6pc*^{-/-} mice (E and F) with multiple tumour nodules. (G–J) Histological analysis of two different tumours from the *L-G6pc*^{-/-} liver stained with H&S. Panel I corresponds to a higher magnification of the adenoma showed in panel G and panel J corresponds to the tumour of panel H. Arrows in panels H and J point the edge of the tumour, revealing the absence of fibrous encapsulation.

Research Article

LG6pc^{-/-} mice, liver histology and glycogen accumulation did not improve with aging [37]. Therefore, it is probable that a satisfying control of blood glucose could explain this amelioration (dependent either on exogenous supply or on compensation by extrahepatic endogenous sources). This is also in line with the observation that GSD1a pathology is better tolerated with patient aging, and that some of the metabolic plasma parameters have been reported to be at least partially corrected with time [3].

To detect, as soon as possible, the putative appearance of hepatic adenomas while preserving the living animal, we used MRI, a powerful imaging technique, which allowed us to identify hepatic nodules about 1 mm in diameter. First nodules were detected at 9 months of age, and after 18 months all livers in *L-G6pc*^{-/-} mice showed at least one large-sized lesion. As in human GSD1a, adenomas were multiple, non-encapsulated, and in about 20% of cases, showed features of pre-carcinomas. It should be noted that adenomas were first detected at 9 months, a time when several plasma parameters had been normalized. However, this late detection cannot exclude that the development of adenomas may have started much earlier but that they were not large enough to be detected by MRI. However, it is important to note that the development of adenoma appeared rather lately, whilst liver steatosis tended to worsen (see Fig. 4). In the same time, several plasma parameters were markedly corrected, suggesting that the development of HCA was dependent on the alteration of the liver metabolism and not on the deregulation of the plasma parameters. Moreover, intrahepatic metabolic disturbances induced by G6Pase deficiency had the capacity to initiate adenoma formation in all the studied livers. Furthermore, even if hepatocellular carcinoma was not observed, a substantial proportion of adenomas could be prone to develop into carcinomas.

In conclusion, we report the characterization of a novel animal model of GSD1a, which is exclusively targeted to the liver. We demonstrate that *L-G6Ppc*^{-/-} mice have all hepatic symptoms of the human pathology, including hepatomegaly, steatosis, and glycogen overload. *L-G6pc*^{-/-} mice also have the expected dysregulations of plasma metabolites related to liver function such as triglycerides, cholesterol, lactic and uric acids. Our animal GSD1a model is perfectly viable without treatment and is normoglycaemic when food is available. Because of this, for the first time we are able to report that the development of adenomas is bound to happen with time in GSD1a livers. In addition, a significant proportion of these adenomas exhibit the features of pre-carcinomas. Because of its viability, this new animal model will be extremely useful for a better understanding of the pathological mechanisms of GSD1a. It will also be of value in assessing the effects of food quality on delaying the deleterious consequences of the disease (e.g. adenomas). Our model should be able to help refine the different gene therapy approaches aimed at correcting G6Pase expression in the liver. Finally, in the near future, the CRE-lox approach, used to generate the liver-deficient model, will allow us to assess the consequences of kidney or intestine pathology. This will be based on the use of a CRE recombinase expressed under the control of adapted gut or kidney gene promoters to specifically target the deficiency to either organ.

Conflict of interest

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

Acknowledgments

We would like to thank the Mouse Clinical Institute (Strasbourg, France) for invaluable help in generating the *B6.g6pc*^{lox} mice. This work received financial support from the "Association Française contre les Myopathies" (Paris, France) and the "GIS-Institut des Maladies Rares" (Paris, France). We also thank Prof. Pierre Chambon and Dr. Daniel Metzger (Mouse Clinical Institute, Strasbourg, France) for generously providing *B6.SA*^{CreERT2} transgenic mice, Nicolas Gadot and Prof. Jean-Yves Scoazec (ANIPATH, Faculty of Medecine Laennec, Lyons, France) for carrying out the histology study, Angèle Chamousset and Jean-Michel Vicat for animal care (ALECS, Faculty of Medecine Laennec, IFR62 Lyon-Est, Lyons), Jean-Baptiste Langlois for MRI acquisitions (Animage Platform, Cermep, Lyons) and the members of the CECIL Platform (Faculty of Medecine Laennec, IFR62 Lyon-Est, Lyons). This work was supported by research grants from the "Agence Nationale de la Recherche" (ANR-07-MRAR-011-01) and the "Association Francophone des Glycogénoses".

References

- [1] Chou JY, Mansfield BC. Mutations in the glucose-6-phosphatase-alpha (G6PC) gene that cause type Ia glycogen storage disease. *Hum Mutat* 2008;29:921–930.
- [2] Chou JY, Matern D, Mansfield BC, Chen YT. Type I glycogen storage diseases: disorders of the glucose-6-phosphatase complex. *Curr Mol Med* 2002;2:121–143.
- [3] Moses SW. Historical highlights and unsolved problems in glycogen storage disease type I. *Eur J Pediatr* 2002;161 (Suppl. 1):S2–S9.
- [4] Ozen H. Glycogen storage diseases: new perspectives. *World J Gastroenterol* 2007;13:2541–2553.
- [5] Bruni N, Rajas F, Montano S, Chevalier-Porst F, Maire I, Mithieux G. Enzymatic characterization of four new mutations in the glucose-6 phosphatase (G6PC) gene which cause glycogen storage disease type Ia. *Ann Hum Genet* 1999;63:141–146.
- [6] Chevalier-Porst F, Bozon D, Bonardot AM, Bruni N, Mithieux G, Mathieu M, et al. Mutation analysis in 24 French patients with glycogen storage disease type Ia. *J Med Genet* 1996;33:358–360.
- [7] Crosset M, Rajas F, Zitoun C, Hurot JM, Montano S, Mithieux G. Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. *Diabetes* 2001;50:740–746.
- [8] Mithieux G, Bady I, Gautier A, Crosset M, Rajas F, Zitoun C. Induction of control genes in intestinal gluconeogenesis is sequential during fasting and maximal in diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;286:E370–E375.
- [9] Mithieux G, Rajas F, Gautier-Stein A. A novel role for glucose 6-phosphatase in the small intestine in the control of glucose homeostasis. *J Biol Chem* 2004;279:44231–44234.
- [10] Rajas F, Bruni N, Montano S, Zitoun C, Mithieux G. The glucose-6 phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: regulation of expression in fasted and diabetic rats. *Gastroenterology* 1999;117:132–139.
- [11] Cassiman D, Libbrecht L, Verslype C, Meersseman W, Troisi R, Zucman-Rossi J, et al. An adult male patient with multiple adenomas and a hepatocellular carcinoma: mild glycogen storage disease type Ia. *J Hepatol* 2010;53:213–217.
- [12] Franco LM, Krishnamurthy V, Bali D, Weinstein DA, Arn P, Clary B, et al. Hepatocellular carcinoma in glycogen storage disease type Ia: a case series. *J Inher Metab Dis* 2005;28:153–162.
- [13] Heller S, Worona L, Consuelo A. Nutritional therapy for glycogen storage diseases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008;47 (Suppl. 1):S15–S21.
- [14] Labrune P, Trioche P, Duvaltier I, Chevalier P, Odievre M. Hepatocellular adenomas in glycogen storage disease type I and III: a series of 43 patients and review of the literature. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997;24:276–279.
- [15] Matern D, Starzl TE, Arnaout W, Barnard J, Bynon JS, Dhawan A, et al. Liver transplantation for glycogen storage disease types I, III, and IV. *Eur J Pediatr* 1999;158 (Suppl. 2):S43–S48.
- [16] Lei KJ, Chen H, Pan CJ, Ward JM, Mosinger Jr B, Lee EJ, et al. Glucose-6-phosphatase dependent substrate transport in the glycogen storage disease type-1a mouse. *Nat Genet* 1996;13:203–209.
- [17] Shelly LL, Lei KJ, Pan CJ, Sakata SF, Ruppert S, Schutz G, et al. Isolation of the gene for murine glucose-6-phosphatase, the enzyme deficient in glycogen storage disease type 1A. *J Biol Chem* 1993;268:21482–21485.

- [18] Ghosh A, Allamarvdasht M, Pan CJ, Sun MS, Mansfield BC, Byrne BJ, et al. Long-term correction of murine glycogen storage disease type Ia by recombinant adeno-associated virus-1-mediated gene transfer. *Gene Ther* 2006;13:321–329.
- [19] Yiu WH, Lee YM, Peng WT, Pan CJ, Mead PA, Mansfield BC, et al. Complete normalization of hepatic G6PC deficiency in murine glycogen storage disease type Ia using gene therapy. *Mol Ther* 2010;18:1076–1084.
- [20] Chou JY, Mansfield BC. Gene therapy for type I glycogen storage diseases. *Curr Gene Ther* 2007;7:79–88.
- [21] Schuler M, Dierich A, Chambon P, Metzger D. Efficient temporally controlled targeted somatic mutagenesis in hepatocytes of the mouse. *Genesis* 2004;39:167–172.
- [22] Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P. Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10887–10890.
- [23] Nagy A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 2000;26:99–109.
- [24] Baboi L, Pilleul F, Milot L, Lartizien C, Poncet G, Roche C, et al. Magnetic resonance imaging follow-up of liver growth of neuroendocrine tumors in an experimental mouse model. *Magn Reson Imaging* 2010;28:264–272.
- [25] Beuf O, Lartizien C, Milot L, Baboi L, Roche C, Langlois JB, et al. Multimodal imaging for the detection and characterization of liver lesions in a mouse model of neuroendocrine tumor. *Gastroenterol Clin Biol* 2008;32:32–40.
- [26] Guignot L, Mithieux G. Mechanisms by which insulin, associated or not with glucose, may inhibit hepatic glucose production in the rat. *Am J Physiol* 1999;277:E984–989.
- [27] Mithieux G, Guignot L, Bordet JC, Wiernsperger N. Intrahepatic mechanisms underlying the effect of metformin in decreasing basal glucose production in rats fed a high-fat diet. *Diabetes* 2002;51:139–143.
- [28] Daniele N, Rajas F, Payrastré B, Mauco G, Zitoun C, Mithieux G. Phosphatidylinositol 3-kinase translocates onto liver endoplasmic reticulum and may account for the inhibition of glucose-6-phosphatase during refeeding. *J Biol Chem* 1999;274:3597–3601.
- [29] Mithieux G, Daniele N, Payrastré B, Zitoun C. Liver microsomal glucose-6-phosphatase is competitively inhibited by the lipid products of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 1998;273:17–19.
- [30] Rajas F, Croset M, Zitoun C, Montano S, Mithieux G. Induction of PEPCCK gene expression in insulinopenia in rat small intestine. *Diabetes* 2000;49:1165–1168.
- [31] Rajas F, Jourdan-Pineau H, Stefanutti A, Mrad EA, Iynedjian PB, Mithieux G. Immunocytochemical localization of glucose 6-phosphatase and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in gluconeogenic tissues reveals unsuspected metabolic zonation. *Histochem Cell Biol* 2007;127:555–565.
- [32] Pillot B, Soty M, Gautier-Stein A, Zitoun C, Mithieux G. Protein feeding promotes redistribution of endogenous glucose production to the kidney and potentiates its suppression by insulin. *Endocrinology* 2009;150:616–624.
- [33] Chatelain F, Pegorier JP, Minassian C, Bruni N, Tarpin S, Girard J, et al. Development and regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in rat liver, intestine, and kidney: in vivo and in vitro studies in cultured fetal hepatocytes. *Diabetes* 1998;47:882–889.
- [34] Girard J, Ferre P, Pegorier JP, Duee PH. Adaptations of glucose and fatty acid metabolism during perinatal period and suckling-weaning transition. *Physiol Rev* 1992;72:507–562.
- [35] Battezzati A, Caumo A, Martino F, Sereni LP, Coppa J, Romito R, et al. Nonhepatic glucose production in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;286:E129–E135.
- [36] She P, Burgess SC, Shiota M, Flakoll P, Donahue EP, Malloy CR, et al. Mechanisms by which liver-specific PEPCCK knockout mice preserve euglycemia during starvation. *Diabetes* 2003;52:1649–1654.
- [37] Salganik SV, Weinstein DA, Shupe TD, Salganik M, Pintilie DG, Petersen BE. A detailed characterization of the adult mouse model of glycogen storage disease Ia. *Lab Invest* 2009;89:1032–1042.

III. Conclusions et perspectives

Cet article décrit un nouveau modèle murin de GSD 1a, ciblant spécifiquement la pathologie hépatique. Pour la première fois, nous disposons d'un modèle animal de GSD 1a viable et normoglycémique. Ces souris L-G6pc^{-/-} n'ont besoin d'aucun traitement supplémentaire afin de maintenir une glycémie normale lorsqu'elles ont accès libre à la nourriture. De plus, les souris reproduisent parfaitement la pathologie hépatique des patients atteints de GSD1a. Elles développent une hépatomégalie associée à une surcharge de glycogène et à une stéatose. A plus-long-terme, 100% des souris développent des adénomes hépatocellulaires dont 20% présentent des signes de pré-carcinomes.

Chez les patients GSD 1a, les mécanismes physiopathologiques du développement des HCA sont encore mal connus. Les souris L-G6pc^{-/-} représentent donc un bon modèle pour la compréhension de ces mécanismes. Il a été suggéré qu'un mauvais contrôle métabolique pourrait être responsable de la survenue d'HCA (Parker et al., 1981). Dans cette étude, nous avons montré que les premiers adénomes apparaissent à l'âge de 9-12 mois, âge auquel les paramètres plasmatiques se sont déjà normalisés (Mutel et al., in press). Ainsi, cette étude suggère que le contrôle métabolique plasmatique n'influence pas le développement des HCA. Cependant, les paramètres métaboliques hépatiques ont tendance à s'aggraver avec le temps de déficience, avec une accumulation importante de TG hépatiques au cours du temps. Les souris L-G6pc^{-/-} seront donc utilisées pour tester l'influence **du degré de stéatose sur le développement des tumeurs hépatiques**. Chez l'homme, le développement de l'hépatomégalie et de la stéatose est contrôlé par un régime alimentaire très strict. Les patients GSD 1a doivent limiter leur consommation de sucres rapides (fructose, galactose...), afin d'éviter un apport supplémentaire de G6P et de glycogène au niveau du foie. Cependant, la restriction de consommation de certains aliments, comme les fruits et les produits lactés, varie de l'interdiction à la limitation de quantités définies, en fonction des médecins pédiatres. Ce nouveau modèle de GSD1a permettra d'étudier **l'influence du régime alimentaire sur le développement des tumeurs hépatiques**. Les souris seront soumises à des régimes enrichis en fructose ou en galactose, des régimes hyperlipidiques et riches en saccharose (HF/HS High Fat High Sucrose) et des régimes hyperlipidiques sans

sucré rapide. Ces différents régimes permettront de moduler le degré de stéatose et le stockage de glycogène pour évaluer si ces deux paramètres sont liés à la survenue des HCA.

Enfin, chez l'homme, la caractérisation moléculaire des HCA ou HCC hépatiques des patients GSD1a reste difficile car le nombre de biopsies est limité. Actuellement seuls quatre biopsies d'adénomes de patients GSD 1a ont pu être caractérisées (Bioulac-Sage et al., 2009; Zucman-Rossi et al., 2006). Ce modèle de souris L-G6pc^{-/-} devrait permettre de mieux caractériser ces tumeurs et de pouvoir établir leur classification en fonction des voies moléculaires dérégulées. Une première étude sera une étude moléculaire des marqueurs connus pour être mutés dans les HCA, comme HNF1 α et la β caténine, ainsi que l'étude de l'expression de leurs gènes cibles.

En conclusion, les données qui seront obtenues au travers de ces prochaines études permettront d'adapter le régime des patients GSD 1a afin de limiter l'apparition des tumeurs hépatiques.

Les pathologies rénales et intestinales pourront également être étudiées grâce à la création de lignées de souris spécifiquement invalidées pour le gène *G6pc* dans les reins ou l'intestin. L'utilisation d'une souris exprimant la recombinaise Cre-ERT2 sous le promoteur de la villine (El Marjou et al., 2004) ou de la protéine Kap (Kidney Androgen regulated protein) (ICS) permettra une expression spécifique de la recombinaise au niveau intestinal ou rénal, respectivement. Ainsi, en croisant ces souris avec les souris B6.g6pc^{lox/lox}, nous disposerons de deux nouveaux modèles de GSD 1a ciblant spécifiquement la pathologie rénale (insuffisance rénale) et intestinale (malabsorption du glucose), ce qui permettra une étude plus précise des mécanismes moléculaires mis en jeu. De plus, les souris invalidées au niveau intestinal nous permettront d'étudier une voie alternative d'absorption du glucose impliquant la G6Pase, suggérée lors de la caractérisation des souris invalidées pour le transporteur GLUT2 (Stumpel et al., 2001).

2ème partie : Test de l'efficacité de vecteurs
viraux recombinants dans le traitement des
glycogénoses de type 1a

Le traitement actuel des patients atteints de GSD 1a vise à mieux contrôler l'hypoglycémie et à limiter le développement de l'hépatomégalie et des insuffisances rénales, grâce à un contrôle du régime alimentaire, sans cependant être curatif. La thérapie génique apparaît comme un traitement attractif pour soigner cette maladie. Des résultats obtenus chez le chien GSD 1a et chez la souris totalement invalidée pour le gène *G6pc* ont montré la faisabilité d'un traitement par thérapie génique sur le contrôle de la glycémie (voir introduction). Cependant, les résultats obtenus ne montrent pas une correction totale de la pathologie puisque l'hépatomégalie et la stéatose ne sont que partiellement corrigées. Une étude réalisée chez le modèle murin de GSD 1b a montré que malgré la correction à long-terme de la glycémie, des adénomes et même un carcinome se développent chez les souris traitées avec des AAV recombinants. Chez ces souris, l'hépatomégalie et la stéatose n'étaient pas corrigées (Yiu et al., 2009). Ainsi, si la stéatose persiste, le risque de développer des HCA à long-terme existe.

Pour pouvoir soigner la pathologie hépatique, la correction doit être apportée au plus grand nombre d'hépatocytes possible, voire à tous les hépatocytes. Il est donc nécessaire de disposer de vecteurs permettant une très bonne transduction au niveau des hépatocytes. En collaboration avec l'équipe de biothérapie hépatique de Nantes, nous **avons testé l'efficacité ainsi que l'innocuité de nouveaux vecteurs viraux tels que les lentivecteurs et les scAAV** (self complementary Adeno-Associated Virus) dans notre modèle de souris L-*G6pc*^{-/-}, à long-terme, sur le contrôle de la glycémie et le développement des adénomes. En parallèle, de nouvelles technologies sont également développées permettant d'augmenter la transduction des hépatocytes au niveau du foie, comme l'hépatectomie partielle ou l'hyperpression hépatique (Dariel et al., 2009; Park et al., 2000).

Cette partie porte sur les premières études réalisées à l'aide de ces deux types de vecteurs viraux dans le modèle de souris L-*G6pc*^{-/-}. Dans une première partie, **le vecteur lentiviral HIV-mTTR-hG6PC** a été validé par une étude à court-terme puis utilisé pour évaluer l'efficacité thérapeutique à long-terme sur le développement de la pathologie hépatique. Dans une seconde partie, **le vecteur scAAV2/8 mTTR-hG6PC** a été testé dans le modèle L-*G6pc*^{-/-}. Une étude réalisée sur 1 mois a permis de vérifier l'efficacité du virus. Cependant, la dose de virus injectée ($1,5 \times 10^{11}$ Vg/kg) n'a pas permis de corriger la pathologie hépatique. Dans une deuxième étude, en augmentant la dose de vecteur viral (6×10^{11} Vg/kg),

la glycémie après 6 heures de jeûne s'est maintenue autour de 120 mg/dL. Cette étude a été réalisée sur 8½ mois post-traitement.

I Introduction à la thérapie génique du foie

Le foie représente une cible idéale pour la thérapie génique car il présente de nombreux avantages. C'est l'organe le plus volumineux des viscères et le parenchyme hépatique est homogène. Plus de 60% (80% en volume) des cellules hépatiques sont des hépatocytes organisés en travées autour des sinusoides. Le foie est un organe très vascularisé et à la caractéristique de posséder deux systèmes de circulation : la circulation systémique, *via* l'artère hépatique, et la circulation portale, *via* la veine porte, qui provient de l'intestin et qui représente 70% de la circulation hépatique. Ainsi, toute particule injectée dans la circulation systémique se retrouve rapidement concentrée au niveau du foie. De plus, l'endothélium hépatique est fenestré. Les sinusoides hépatiques présentent des fenestrations de l'ordre de 100 nm de diamètre, ce qui permet aux macromolécules telles que des particules virales de traverser l'endothélium pour atteindre les hépatocytes. Enfin, le foie adulte est un organe quiescent, avec moins de 1% de division cellulaire des hépatocytes, ce qui permet une expression à long-terme de la protéine thérapeutique (Nguyen and Ferry, 2004).

I.1 Les voies de transfert de gènes

Le transfert de gènes dans le foie peut être réalisé *ex vivo* ou *in vivo* (Ferry, 2003; Nguyen and Ferry, 2004).

La stratégie *ex vivo* consiste à prélever les cellules du patient, les transduire *in vitro* puis les réimplanter au patient. Cette stratégie permet la transduction des hépatocytes uniquement en évitant la dissémination du transgène dans l'organisme et de contrôler précisément le nombre de cellules transduites.

L'approche *in vivo* consiste à injecter les vecteurs de transfert directement dans la circulation sanguine du patient. Cependant, l'injection du vecteur chez le patient peut présenter des risques de dissémination du transgène et de transduction d'autres tissus que les tissus-cibles. Ainsi, une réponse immunitaire peut se développer contre le vecteur ou contre la protéine d'intérêt. De plus, il n'est pas possible de contrôler facilement le nombre

de cellules transduites (Ferry, 2003). Néanmoins, cette technique est majoritairement utilisée pour cibler le foie car elle est moins contraignante que la technique *ex vivo*, qui nécessite le prélèvement d'un lobe hépatique puis la réimplantation des hépatocytes transduits (Wilson, 2001).

I.2 Les vecteurs de transfert

Des systèmes de transport ont dû être développés pour pouvoir transférer un gène thérapeutique dans l'organisme. Deux types de vecteurs existent : 1) les vecteurs synthétiques, basés sur l'utilisation de lipides ou de polypeptides pour complexer l'ADN, (non détaillés ici) et 2) Les vecteurs dérivés des virus qui sont efficaces à la fois pour le transfert *ex vivo* et *in vivo*. Les principaux vecteurs viraux recombinants utilisés en thérapie génique sont les adénovirus, les virus adéno-associés (AAV), les onco-rétrovirus et les lentivirus. Les vecteurs viraux sont rendus défectifs (élimination d'une partie du génome permettant la réplication du virus) et une grande partie de leur génome est remplacée par le transgène d'intérêt. Chacun présente des avantages et des inconvénients ([tableau 1](#)). Seuls les AAV et les lentivirus seront décrits ci-après.

I.2.1 Les virus adéno-associés (AAV)

Le virus AAV appartient au genre des *Dependovirus* et à la famille des *Parvovirus*. C'est un virus à ADN de petite taille (20 à 25 nm), non enveloppé, traversant facilement l'endothélium fenestré des hépatocytes. Chez l'homme, 9 sous-types ont été identifiés (AAV1-AAV9). Bien que 80% de la population possède une immunité pré-existante contre l'AAV2, aucune pathologie n'est associée aux AAV (Vasileva and Jessberger, 2005).

➤ **Génome de l'AAV**

Le génome de l'AAV sauvage est composé de deux cadres ouverts de lecture : *Rep* et *Cap*. Le gène *Rep* code pour 4 protéines régulatrices, impliquées dans la réplication et la régulation de l'expression des gènes et le gène *Cap* code pour 3 protéines de capsid. Ces régions sont encadrées par des séquences de 145pb appelées séquences terminales répétées inversées (ITR). Les 125 premiers nucléotides forment un palindrome et sont repliés en forme de T. Les séquences ITR contiennent des séquences RBE (Rep-Binding Element) et trs (terminal resolution site) nécessaires pour la réplication du génome. Ces

séquences ITR servent aussi d'origine pour la réplication virale avec une extrémité 3' OH libre (figure 19).

➤ *Cycle viral des AAV*

Les virus AAV ont besoin, pour leur réplication, de l'aide de virus auxiliaires « helper » tels que l'adénovirus ou l'herpes simplex virus (HSV). En présence de virus « helper », le cycle lytique débute. Il y a alors réplication du génome, expression des gènes viraux et la production de virions. En absence de virus « helper », la réplication est limitée et l'expression des gènes viraux est réprimée. Chez l'homme, l'AAV sauvage s'intègre dans le génome de la cellule hôte au niveau d'un site spécifique AAVS1, situé dans la zone q13.4 du chromosome 19 créant une phase de latence (Daya and Berns, 2008) (figure 20).

L'étape limitante lors de la transduction par des AAVr est la conversion du génome AAV simple brin en ADN double brin (ADNdb), en absence de virus « helper » (Ferrari et al., 1996), entraînant des délais d'expression longs du transgène. La synthèse du brin complémentaire débute au niveau des ITR grâce à l'ADN polymérase cellulaire (Figure 21). Un mécanisme alternatif pour former ces ADNdb existe et consiste en une hybridation de deux molécules ADNsb complémentaires apportées par deux particules virales différentes. En effet, les AAV peuvent empaquetés, avec la même efficacité, des brins d'ADN de polarité positive ou négative. Ainsi, lors de transduction à de fortes doses, ce mécanisme doit contribuer à la formation des ADNdb (McCarty, 2008). Les AAVdb formés peuvent ensuite former des structures circulaires plus stables (Wang et al., 2007) et s'associer, grâce à des phénomènes de recombinaison entre les ITR, pour former des dimères ou des concatémères (Nakai et al., 2000). La majorité des génomes viraux des AAVr sont présents sous forme d'épisomes (Vasileva and Jessberger, 2005). Ce type de vecteur viral est donc à utiliser préférentiellement pour transduire des cellules quiescentes comme le foie adulte. En effet, si des vecteurs AAV2/8 sont injectés durant la période néonatale chez des souris, le foie est efficacement transduit mais, dès deux semaines post-injection, le vecteur épisomal est perdu presque totalement du au doublement du poids du foie (Cunningham et al., 2008). De façon similaire, le traitement de rats Gunn, atteints de la maladie de Crigler-Najjar, par un vecteur AAV durant la période néonatale résulte en une perte d'expression du transgène après un et trois mois post-injection (Flageul et al., 2009).

➤ **Développement de vecteurs dérivés des AAV**

Le génome de l'AAV recombinant (AAVr) contient toujours les deux séquences ITR mais les gènes *Rep* et *Cap* sont remplacés par la cassette d'expression du gène d'intérêt. Les séquences ITR sont les seuls éléments requis pour la réplication ainsi que l'encapsidation du génome viral. Pour la production des AAVr, les gènes *Rep* et *Cap* et les éléments du virus « helper » sont apportés en *trans*.

Les premiers vecteurs AAVr ont été développés à partir de l'AAV de sérotype 2, qui permet la transduction de nombreux tissus avec une efficacité modérée. Pour améliorer le tropisme et l'efficacité de transduction des AAVr, la technique de pseudotypage a été développée. Cette technique permet de produire des particules mixtes associant les ITR de l'AAV2 et la capsid d'un autre sérotype (Buning et al., 2008). Ainsi, des vecteurs AAV2/8 ont pu être développés pour un transfert de gène très efficace au niveau du foie. Le [tableau 2](#) illustre les sérotypes les plus adaptés pour la transduction de différents tissus.

➤ **Développement de vecteurs AAV « self complementary » (scAAV)**

Afin de contourner l'étape de formation des ADNdb (synthèse ou hybridation inter-molécules), de nouveaux vecteurs scAAV ont été développés permettant la libération dans le noyau cellulaire de structures doubles brins par hybridation intra-molécule. Pour produire des scAAV, le transgène doit avoir une taille limitée à 2,3kb (la moitié du génome AAVr) et la séquence doit être répétée inversée, après le clonage d'une séquence ITR mutée (Goncalves, 2005; McCarty, 2008). La présence de cette séquence ITR mutée empêche l'action d'une endonucléase, qui, normalement coupe les intermédiaires de réplication au niveau des ITR pour générer les structures simple brin. Ainsi, des génomes dimériques se forment, avec une ITR mutée au centre de leur structure et les deux ITR sauvages à chaque extrémité ([figure 21](#)). Une fois libéré dans la cellule-cible, le génome s'auto-apparie de manière autonome, ce qui permet une expression rapide du transgène.

1.2.2 Les lentivirus

Les lentivirus appartiennent à la famille des rétrovirus qui sont des virus à ARN enveloppés. Les onco-rétrovirus appartiennent également à cette famille. Lors du cycle d'infection, l'ARN viral va être rétrotranscrit en ADN, formant ainsi le génome proviral. Celui-ci s'intègre dans le génome de la cellule hôte et utilise sa machinerie cellulaire pour former

de nouveaux virions qui sont libérés par bourgeonnement hors de la cellule. L'avantage majeur des lentivirus par rapport aux onco-rétrovirus pour le développement de vecteurs viraux est leur capacité à infecter les cellules qui ne se divisent pas (Lewis et al., 1992). Ainsi, les lentivirus ont la capacité à infecter les neurones ou les hépatocytes chez l'adulte.

Le lentivirus le plus étudié est le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) responsable du syndrome de l'immunodéficience acquise, maladie chronique à évolution lente et les premiers vecteurs lentiviraux ont été développés à partir de ce virus (figure 22). L'inconvénient majeur de ces virus est leur taille ; les particules virales ont une taille de 100 nm et franchissent difficilement l'endothélium des hépatocytes (fenestrations de 100 nm), ce qui diminue l'efficacité de transduction.

➤ **Le génome des lentivirus**

Le génome viral est composé de deux molécules ARN. Comme tous les rétrovirus, le génome des lentivirus contient trois phases de lecture *gag*, *pol* et *env* (figure 23). Le gène *gag* code pour les protéines de la matrice intramembranaire, de la capsidie et de la nucléocapsidie. Le gène *pol* code pour les enzymes nécessaires au cycle de réplication : la protéase PR (responsable du clivage des produits des gènes *gag* et *pol*), la rétrotranscriptase et l'intégrase. Le gène *env* code pour les deux protéines de l'enveloppe (SU et TM) (figure 23).

En plus de ces gènes de structure, les lentivirus (exemple de HIV-1) contiennent également des gènes de régulation *tat* et *rev* codant deux facteurs de régulation de la réplication et des gènes accessoires *vif*, *vpr*, *vpu* et *nef* codant des protéines qui participent à la pathogénicité du virus.

Le génome des rétrovirus contient aussi des séquences non codantes, qui agissent en *cis*. Aux extrémités du génome viral, on trouve les « long terminal repeat » (LTR) qui contiennent des signaux d'initiation et de terminaison de la transcription. La séquence Ψ correspond au signal d'encapsidation du génome ARN. D'autres séquences interviennent au cours de la rétrotranscription : la séquence « primer binding site » (PBS), les séquences « polypurine tract PPT » et « central PPT » (cPPT) et la séquence « central terminaison sequence » (CTS).

➤ **Le cycle répliatif des lentivirus : exemple du HIV-1 (Freed, 2001)**

Le cycle répliatif du HIV se divise en deux phases principales (figure 24):

- Les phases précoces qui aboutissent à l'intégration de l'ADN viral dans la chromatine de la cellule infectée.
- Les phases tardives qui aboutissent à la formation d'une nouvelle particule infectieuse.

Les phases précoces

L'entrée du virus a lieu après fixation du virion sur des récepteurs de la membrane cellulaire et fusion des membranes cellulaires et virales. Le virus subit une étape de décapsulation qui conduit à la libération du complexe nucléoprotéique : le complexe de rétrotranscription. Le génome ARN est alors rétrotranscrit par la rétrotranscriptase en une molécule ADN double brin. L'association de l'ADNdb, de protéines virales et cellulaires forment le complexe de préintégration (PIC), qui est transloqué dans le noyau cellulaire et le génome peut être intégré au génome cellulaire grâce à l'intégrase virale.

Les phases tardives

Ces phases débutent par les étapes de synthèse des ARN viraux, suivi de la production des protéines virales, de l'assemblage des particules nucléoprotéiques. Les particules virales immatures sont évacuées de la cellule par bourgeonnement. Elles emportent une partie de la membrane cellulaire où se sont incorporées les glycoprotéines d'enveloppe. La maturation des particules a lieu à l'extérieur de la cellule par clivage des précurseurs protéiques issus des gènes *gag* et *pol*.

Le développement d'outils de transfert de gène à partir du HIV-1 consiste à ne conserver que les phases précoces jusqu'à l'intégration du provirus dans le génome et à supprimer la phase post-intégrative.

➤ **Développement de vecteurs lentiviraux dérivés du HIV-1**

Afin de développer des vecteurs lentiviraux déficients, les gènes viraux doivent être apportés en *trans*. Certaines séquences non codantes qui agissent en *cis* doivent être conservées. Ainsi, le vecteur d'expression doit contenir, en plus de la cassette d'expression

du transgène, les deux LTR, la séquence Ψ pour l'encapsidation de l'ARN et la séquence RRE (Rev Response element), nécessaire à l'export nucléaire des ARN viraux. Les séquences d'expression des protéines de structure (*gag*), des enzymes (*pol*), des protéines d'enveloppe (*Env*) et les protéines régulatrices Tat et Rev sont apportées en trans.

La production de ces vecteurs repose donc sur la co-transfection transitoire de trois plasmides dans les cellules HEK-293T :

- Le plasmide d'expression du génome ARN vecteur, qui sera encapsidé dans la particule virale.
- Le plasmide codant les gènes viraux *gag*, *pol*, *tat* et *rev* sous le contrôle d'un promoteur CMV (cytomégalovirus). La délétion des LTR et de la séquence d'encapsidation empêche l'encapsidation de l'ARN transcrit par ce plasmide.
- Le plasmide d'enveloppe permettant le pseudotypage du vecteur. Le gène codant les protéines d'enveloppe du HIV-1 est remplacé par des protéines d'enveloppe d'autres virus afin d'élargir le tropisme du vecteur. La glycoprotéine d'enveloppe la plus utilisée pour les vecteurs lentiviraux est la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G).

L'utilisation de trois plasmides permet de réduire les risques de reconstituer un lentivirus compétent pour la réplication, et de garantir ainsi la biosécurité des vecteurs lentiviraux.

Des améliorations peuvent être apportées pour augmenter la transduction des cellules et l'expression du transgène. La première modification a été le pseudotypage des vecteurs avec la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculaire (cf paragraphe précédent). L'ajout des séquences cPPT/CTS dans la cassette d'expression du transgène a permis d'augmenter la transduction des cellules cibles (Zennou et al., 2000). Enfin, l'ajout d'une séquence WPRE (Woodchuck hepatitis virus transcriptional Regulatory Element) en 3' du transgène favorise la stabilité des ARNm et l'expression du transgène (Zufferey et al., 1999).

II. Etude de l'efficacité d'un vecteur lentiviral HIV-mTTR-hG6PC chez les souris L-G6pc^{-/-}

Afin d'améliorer le pourcentage de transduction des hépatocytes, le traitement lentiviral doit être réalisé durant la période néonatale. Pour disposer de souriceaux L-G6pc^{-/-} à la naissance, l'induction de la déficience par traitement au tamoxifène doit être réalisée *in utero*. Malheureusement, les essais de traitement au tamoxifène chez les mères gestantes ne nous ont pas permis d'obtenir de souriceaux vivants. La mort des souriceaux peut être liée à la toxicité du tamoxifène chez le fœtus ou à la mère qui ne s'occupe pas de ses souriceaux après la mise-bas.

Ainsi, l'efficacité et l'innocuité du vecteur lentiviral ont été étudiées dans le cadre d'un protocole de prévention : le vecteur lentiviral a été administré avant l'induction de la déficience.

II.1 Protocole expérimental

II.1.1 Description et production du vecteur lentiviral HIV-mTTR-hG6PC

Les vecteurs lentiviraux HIV-mTTR-hG6PC inactivés ont été produits par TH Nguyen, à Nantes (Inserm U948) (figure 25). L'ADNc *G6PC* humain a été cloné sous le contrôle d'un promoteur hépato-spécifique mTTR, le promoteur de la transthyrétine murine fusionné à un enhancer hépato-spécifique (Nguyen et al., 2005). En amont du promoteur mTTR, le vecteur viral contient également les fragments cPPT et CTS du virus HIV-1 qui facilitent la translocation nucléaire du complexe pré-intégratif du vecteur et l'élément de régulation post-transcriptionnel du virus de l'hépatite de la marmotte.

Les vecteurs lentiviraux défectifs sont produits par transfection transitoire, dans les cellules 293T, de trois plasmides : un plasmide codant les protéines d'enveloppe VSV-G du virus VSV (Vesicular Stomatitis Virus), un plasmide codant les protéines (*Gag, Pol, Tat, Rev*) nécessaires pour la formation des particules virales et un plasmide codant le vecteur de transfert (Bovia et al., 2003). Ils sont ensuite concentrés par ultracentrifugation.

Le titre des productions de HIV-mTTR-hG6PC ont été déterminés après transduction de cellules Hela par PCR quantitative.

Titre de la production 1 : 1.3×10^9 TU/ml (TU=Transduced Unit).

Titre de la production 2 : 8×10^8 TU/ml.

II.1.2 Transduction de cellules HepG2 par le vecteur HIV-mTTR-hG6PC

La lignée de cellules HepG2 est issue d'un hépatocarcinome humain (ECACC : European Collection Agency of Cell Cultures, UK). Les cellules sont cultivées dans un milieu Dulbecco's modified Eagles's medium (DMEM : Invitrogen) 1g/L de D-glucose, supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Invitrogen), 2mM de glutamine, 1µg/µL de streptomycin et 1U/ml de pénicilline, à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂.

Les cellules sontensemencées à 50 000 cellules par puits de 35mm. A 40% de confluence, les cellules sont traitées par le lentivirus HIV-mTTR-hG6PC (Multiplicity Of Infection=MOI 10 ou 30 ; une MOI 10 correspond à 10 particules infectieuses par cellule) pendant une nuit à 37°C dans du DMEM (1g/L de glucose) sans SVF, puis le milieu est remplacé par du milieu complet. Les cellules sont ensuite maintenues pendant 24 heures à 37°C puis sont récupérées grâce à un traitement à la trypsine et conservés à -80°C.

Un dosage d'activité G6Pase est ensuite réalisé sur un homogénat cellulaire. Les cellules sont homogénéisées dans 10mM HEPES, pH7,3 par ultrasonication. L'activité G6Pase est déterminée sur l'homogénat cellulaire dilué 20 fois dans un tampon 10mM HEPES, 0,25M sucrose, pH 7,3 (cf 3^{ème} partie II.4) (Mutel et al., in press).

II.1.3 Injection des vecteurs lentiviraux chez la souris B6.G6pc^{lox/lox}/SA^{creERT2/+}

Les vecteurs lentiviraux HIV-mTTR-hG6PC [4 à 5x10⁷TU (transduced Units) dilué dans un volume de 50µL] sont administrés via la veine temporale chez des souriceaux B6.G6pc^{lox/lox}/SA^{creERT2/+} âgés de deux jours (aiguille de 27G). L'injection est réalisée très progressivement, à l'aide d'une pompe péristaltique, à un débit faible et continu de 3µL/sec. En contrôle, des souriceaux ont été injectés avec 50µL de sérum physiologique. La manipulation des souriceaux nécessite des précautions particulières pour éviter leur rejet par la mère (imprégnation du manipulateur avec l'odeur de la litière).

Le génotypage des souris est vérifié uniquement à l'âge de 10 jours, à partir de l'ADNg extrait d'un morceau de queue.

II.1.4 Induction de l'excision du gène *G6pc* dans le foie des souris B6.g6pc^{lox/lox}/SA^{creERT2/+}

L'induction de la déficience est réalisée à l'âge de 18-21 jours, par injections intrapéritonéale de tamoxifène durant 5 jours avec une dose de 0,5mg de tamoxifène/jour. Les souris L-G6pc^{-/-} sont donc obtenues à l'âge de 3-4 semaines.

Après induction de la déficience, le développement de la pathologie a été étudié à court-terme (3 semaines) pour valider le vecteur lentiviral, puis, dans une deuxième étude, à long-terme, après 7½ mois d'inactivation du gène.

II.2 Validation de la construction lentivirale

II.2.1 Validation *in vitro*

Les cellules HepG2 présentent une activité G6Pase basale faible (figure 26). L'efficacité de la construction lentivirale a donc été étudiée dans ces cellules après transduction par le vecteur HIV-mTTR-hG6PC à deux concentrations virales (MOI 10 ou 30). La transduction des cellules HepG2 induit une augmentation de l'activité G6Pase de manière dose-dépendante (figure 26), validant ainsi la fonctionnalité de la construction lentivirale.

II.2.2 Validation *in vivo*

Dans le cadre de cette première étude pour validation, l'efficacité du vecteur lentiviral a été vérifiée sur la régulation de la glycémie, l'accumulation de glycogène et de TG hépatiques et l'expression du transgène G6PC humain au niveau du foie, **trois semaines après induction de la déficience.**

➤ **Correction des paramètres plasmatiques**

En comparaison avec les souris L-G6pc^{-/-} non traitées, les souris L-G6pc^{-/-} traitées par le vecteur lentiviral mTTR-hG6PC (n=3) ont normalisé leur glycémie ainsi que leurs taux de triglycérides et de cholestérol plasmatique. Après 6 heures de jeûne, elles présentent une glycémie similaire aux souris témoins (7,1 ± 1,0mM vs 7,5 ± 0,1mM chez les L-G6pc^{+/+}) et significativement augmentée par rapport aux souris L-G6pc^{-/-} non traitées (3,51 ± 0,6mM) (figure 27A). Le taux de TG est significativement diminué par rapport aux souris L-G6pc^{-/-} non traitées (0,9 ± 0,1g/L vs 2,1 ± 0,3g/L chez les L-G6pc^{-/-} non traitées) (figure 27B). De même, le taux de cholestérol tend à diminuer et à être normalisé mais n'est pas significativement

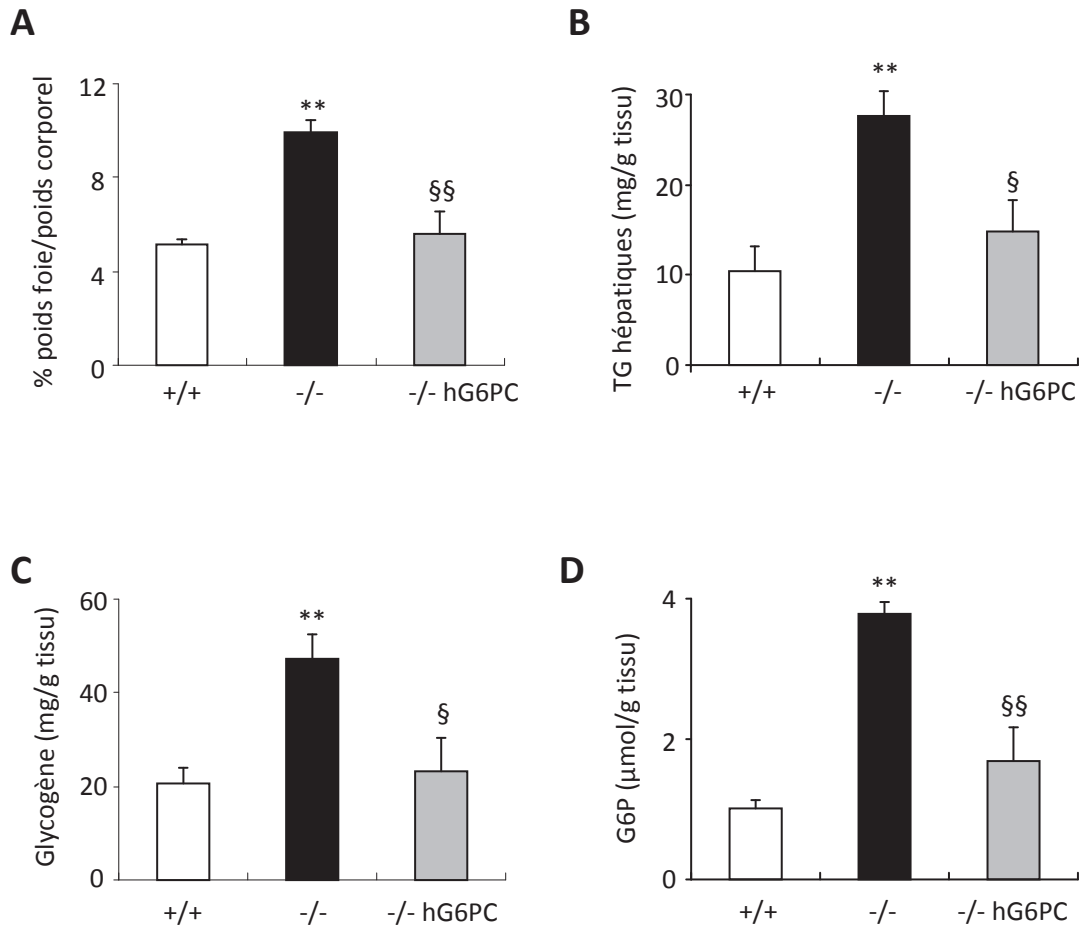


Figure 28 : Paramètres métaboliques hépatiques des souris L-G6pc^{-/-} traitées par le vecteur lentiviral HIV- mTTR-hG6PC

(A) % du poids du foie par rapport au poids corporel, (B) Contenu hépatique en triglycérides, (C) contenu hépatique en glycogène, (D) contenu hépatique en G6P des souris L-G6pc^{+/+} (barres blanches), des souris L-G6pc^{-/-} non traitées (barres noires) et des souris L-G6pc^{-/-} traitées par les lentivirus mTTR-hG6PC (barres grises).

Les données ont été obtenues 3 semaines après l'induction de la déficience par traitement au tamoxifène, soit 6 semaines après l'injection systémique des lentivirus mTTR-hG6PC, chez des souris euthanasiées après 6h de jeûne.

Les résultats sont représentés sous la forme moyenne \pm SEM (L-G6pc^{+/+} : n=3 ; L-g6pc^{-/-} : n=5 ; L-G6pc^{-/-} hG6PC : n=3)

** Significativement différent des souris L-G6pc^{+/+} (Test Mann & Whitney, p<0,01)

§ et §§ Significativement différent des souris L-G6pc^{-/-} non traitées (Test Mann & Whitney, p<0,05 et p<0,01)

différent des souris non traitées ($1,0 \pm 0,2\text{g/L}$ vs $1,5 \pm 0,1\text{g/L}$ chez les L-G6pc^{-/-} non traitées) (figure 27C).

➤ **L'expression du transgène prévient le développement de l'hépatomégalie**

Comme attendu, 3 semaines après l'induction de la déficience, les souris L-G6pc^{-/-} non traitées développent une hépatomégalie avec un foie représentant 10% de leur poids corporel comparé aux souris témoins dont le foie ne représente que 5% de leur poids total (figure 28A). Cette hépatomégalie est due au stockage de glycogène et de TG plus important dans le foie de ces souris (figures 28B et 28C). A l'opposé, les souris L-G6pc^{-/-} traitées par le vecteur lentiviral mTTR-hG6PC ne présentent plus d'hépatomégalie, avec un poids de foie représentant $5,6 \pm 0,9\%$ de leur poids total (figure 28A). Ces résultats sont en accord avec des taux de glycogène et de G6P comparables aux souris témoins L-G6pc^{+/+} (figures 28C et 28D). De plus, les souris traitées n'ont pas développé de stéatose hépatique et leur taux de TG hépatiques sont très inférieurs aux souris L-G6pc^{-/-} non traitées (figure 28B).

➤ **Le vecteur lentiviral restaure l'activité G6Pase hépatique**

L'expression du gène *G6pc* a été analysée dans le foie des souris au niveau de l'expression des ARNm *G6pc* endogène, des ARNm du transgène *G6PC* humain et de l'activité G6Pase (figure 29). La séquence humaine du gène *G6PC* a été utilisée comme transgène afin de nous permettre de différencier l'expression du gène endogène et du transgène, à l'aide d'amorces spécifiques. L'expression du transgène a été déterminée par RT-PCR quantitative. Le transgène est exprimé au niveau du foie des souris L-G6pc^{-/-} traitées, alors qu'il est indétectable chez les souris contrôles et L-G6pc^{-/-} non traitées (figure 29A). L'expression du transgène permet une normalisation de l'expression du gène *G6pc* endogène, qui est fortement induit chez les souris L-G6pc^{-/-} non traitées (Figure 29B et figure 2B, *J Hepatol*). L'expression de la G6PC humaine permet une restauration de 70% de l'activité G6Pase basale, dans le foie des souris L-G6pc^{-/-} traitées ($7,7 \pm 1,6$ U/g tissu vs $10,9 \pm 2,4$ U/g tissu chez les L-G6pc^{+/+}) (figure 29C). L'activité G6Pase est indétectable chez les souris L-G6pc^{-/-} non traitées.

➤ **Dissémination tissulaire du transgène**

Etant donné que l'injection de vecteurs viraux dans la circulation systémique peut entraîner la transduction de multiples organes, une analyse par PCR du transgène a été réalisée dans de nombreux tissus pour vérifier la dissémination chez deux souris L-G6pc^{-/-} traitées. Comme attendu, le transgène est présent au niveau du foie (Figure 30). Le transgène G6PC humain est également détecté au niveau de l'intestin, du cœur et des muscles chez les deux souris. Chez une souris, le transgène est détecté au niveau du rein (Figure 30). La PCR n'étant pas réalisée dans des conditions semi-quantitatives, la différence d'expression entre les différents tissus ne peut pas être analysée. Le transgène n'est pas détecté au niveau des autres organes testés (rate, testicule, tissu adipeux et poumons) (Figure 30). Malgré cette dissémination, l'expression du transgène est sous le contrôle du promoteur de la transthyréline, spécifiquement produite par le foie. Ainsi, le transgène doit être transcrit uniquement dans le foie.

II.3 Efficacité du vecteur à long-terme sur le contrôle de la glycémie

Les résultats obtenus *in vitro* après transduction des cellules HepG2 et *in vivo* ont permis de démontrer la restauration d'une activité G6Pase validant l'efficacité du vecteur. Un second groupe de souriceaux B6.G6pc^{lox/lox}/SA^{creERT2/+}, âgés de deux jours, a été injecté avec le vecteur lentiviral (provenant d'une production différente). Après induction de la déficience, à l'âge de 3 semaines, la glycémie est suivie une fois par mois, après 6 heures de jeûne. La figure 31 illustre le suivi de glycémie, à partir du premier mois et jusqu'à 7 mois après le traitement au tamoxifène. Après 6h de jeûne, les souris témoins L-G6pc^{+/+} ont une glycémie d'environ 150mg/dL en moyenne au cours des 7 mois alors que les souris L-G6pc^{-/-} non traitées ont une glycémie significativement diminuée d'environ 50-60 mg/dL en moyenne tout au long du suivi (figure 31). Un mois après avoir induit la déficience, la glycémie des souris L-G6pc^{-/-} traitées n'est pas corrigée et les souris développent une hypoglycémie contrairement aux résultats obtenus dans l'étude à court-terme. Cependant, à partir du 2^{ème} mois de déficience, la glycémie à 6 heures de jeûne est corrigée et se stabilise à une valeur de 140mg/dL en moyenne chez les souris L-G6pc^{-/-} traitées, non différente de celle des souris contrôles.

Les paramètres plasmatiques TG et cholestérol ont été analysés 3 mois et 7½ mois après induction de la déficience. A 3 mois, les souris L-G6pc^{-/-} traitées ont normalisés leur taux de

TG et de cholestérol plasmatiques (figure 32). La correction au niveau des TG plasmatiques est maintenue après 7½ mois chez les souris L-G6pc^{-/-} traitées mais le cholestérol est à nouveau augmenté par rapport aux souris témoins et atteint le taux des souris L-G6pc^{-/-} non traitées (figure 32).

III. Etude de l'efficacité d'un vecteur scAAV mTTR-hG6PC chez les souris L-G6pc^{-/-}

Afin d'évaluer l'efficacité du vecteur scAAV-mTTR-hG6PC chez le souris L-G6pc^{-/-}, le traitement a été réalisé à l'âge de sept semaines afin d'assurer une bonne transduction au niveau des hépatocytes. Ce protocole nous permet de tester l'effet thérapeutique du vecteur scAAV étant donné que la pathologie est déjà présente au moment du traitement.

III.1 Protocole expérimental

III.1.1 Description des vecteurs scAAV2/8-mTTR-hG6PC

Les vecteurs scAAV2/8-mTTR-hG6PC ont été produits par la plate-forme de production de vecteurs viraux, à Nantes (Inserm U649). Ils codent pour l'ADNc *G6PC* humain, sous le contrôle du promoteur mTTR. Ils contiennent également les séquences ITR de l'AAV2 de part et d'autres du transgène et les protéines de la capsid sont de sérotype 8 (figure 33).

III.1.2 Transfection des cellules HepG2 avec la construction plasmidique scAAV.mTTR-hG6PC

1x10⁶ cellules HepG2 (cf II.1.2) ont été transfectées par 5 µg d'ADN plasmidique codant le scAAV.mTTR-hG6PC en présence d'un agent transfectant (Exgen 500®, Euromedex). Après 24 heures à 37°C, les cellules sont traitées à la trypsine et conservées à -80°C. Un dosage d'activité G6Pase est réalisé sur les homogénats cellulaires (cf II.1.2).

III.1.3 Induction de l'excision du gène *G6pc* dans le foie des souris B6.g6pc^{lox/lox}/SA^{creERT2/+}

L'induction de la déficience est réalisée à l'âge de 18-21 jours, par un traitement au tamoxifène durant 5 jours avec une dose de 0,5mg de tamoxifène/jour. Les souris L-G6pc^{-/-}

sont obtenues à l'âge de 3 semaines. Le développement de la maladie est caractérisé avant le traitement viral par suivi de leur glycémie à 6 heures de jeûne.

III.1.4 Injection des vecteurs scAAV recombinants

Les vecteurs scAAV2/8-mTTR-hG6PC sont administrés, sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane, par voie systémique via la veine rétro-orbitaire chez les souris L-G6pc^{-/-} âgées de 7 semaines, soit 4 semaines après avoir induit la déficience du gène *G6pc*. Deux doses virales ont été testées. Le premier groupe a reçu une dose de $1,5 \times 10^{11}$ Vg/kg (Vg= Viral Genome) et a été euthanasié après 1 mois de traitement (groupe 1 : n=4). Le deuxième groupe a reçu une dose de 6×10^{11} Vg/kg et a été euthanasié après 8½ mois de traitement (n=4).

III.2 Validation de l'efficacité du vecteur scAAV2/8-mTTR-hG6PC

III.2.1 Validation de la construction plasmidique scAAV-mTTR-hG6PC *in vitro*

Avant de réaliser la production de scAAV, la construction plasmidique scAAV-mTTR-hG6PC a été testée par le dosage d'activité G6Pase, dans des cellules HepG2 transfectées par le plasmide scAAV-mTTR-hG6PC. En présence de plasmide, l'activité G6Pase est induite de 5 fois par rapport à l'activité basale des cellules HepG2 ($58,7 \pm 5,2$ vs $11,4 \pm 2,5$ nmol/min/mg protéines dans les cellules HepG2 non transfectées) ([figure 34](#)). La construction plasmidique est validée et les productions virales ont été réalisées par la plate-forme de production de vecteurs viraux à Nantes (Inserm U649).

III.2.2 Validation de l'efficacité du vecteur scAAV2/8-mTTR-hG6PC *in vivo*

Les souris ont été injectées avec le vecteur scAAV2/8-mTTR-hG6PC avec une dose de $1,5 \times 10^{11}$ Vg/kg, un mois après induction de la déficience. L'efficacité du vecteur est évaluée sur la régulation de la glycémie et l'amélioration de la pathologie hépatique, 1 mois après le traitement.

➤ ***Efficacité du vecteur sur la régulation de la glycémie, l'hépatomégalie et la stéatose***

La [figure 35](#) illustre le suivi de glycémie, à 6 heures de jeûne, avant et après l'injection des vecteurs chez les souris L-g6pc^{-/-}. Comme attendu, les souris présentent une hypoglycémie après 6 heures de jeûne, avant le traitement par les vecteurs scAAV. Dès la

première semaine après l'injection des virus, les souris L-G6pc^{-/-} ont partiellement corrigé leur glycémie (108±4 mg/dL vs 43±7mg/dL avant l'injection) ; elles ne développent plus d'hypoglycémie. La glycémie se stabilise autour de 110mg/dL durant le premier mois (Figure 35).

Un mois après l'induction de la déficience, les souris L-g6pc^{-/-} traitées par le scAAV2/8 présentent toujours une hépatomégalie avec un poids représentant 8,5±0,2% du poids total de la souris, mais significativement diminuée par rapport aux souris non traitées (9,9%±0,6%) (figure 36A). Cette diminution de l'hépatomégalie est associée à une diminution significative des taux de G6P par rapport aux souris L-G6pc^{-/-} non traitées (figure 36B). Les taux de glycogène et de TG hépatiques des souris L-G6pc^{-/-} traitées restent toujours très élevés et non différents de ceux des souris L-G6pc^{-/-} non traitées (figures 36 C&D). Le traitement des souris L-G6pc^{-/-} par une dose de 1,5x10¹¹Vg/kg de vecteur scAAV2/8-mTTR-hG6PC ne permet donc pas d'améliorer l'hépatomégalie et la stéatose hépatique, qui reste toujours plus importante que les souris L-G6pc^{+/+} (figure 36).

➤ **Restauration d'une faible activité G6Pase hépatique**

La transduction du foie par le vecteur scAAV-mTTR-hG6PC a été analysée par RT-PCR quantitative permettant de déterminer le nombre de copies du transgène par cellule diploïde. Les souris traitées présentent en moyenne 0,11±0,2 copies du vecteur par cellule. Ceci permet une expression faible du transgène au niveau des ARNm, 20 fois inférieure à la valeur obtenue avec les lentivirus (cf figure 29A). Après un mois de traitement, l'activité G6Pase hépatique est très faible (1,4±0,1 U/g tissu) chez les souris L-G6pc^{-/-} traitées et ne représente que 14% de l'activité G6Pase des souris témoins L-G6pc^{+/+} (Données non illustrées).

L'ensemble de ces résultats démontrent qu'un traitement par des vecteurs scAAV2/8-mTTR-hG6PC est réalisable dans ce modèle de souris L-g6pc^{-/-}, mais l'efficacité de transduction doit être nettement améliorée.

III.3 Efficacité du vecteur scAAV2/8-mTTR-hG6PC à long-terme chez les souris L-G6pc^{-/-}

Dans cette étude à plus long-terme, nous avons choisi d'augmenter la dose de virus scAAV2/8-mTTR-hG6PC dans le but d'obtenir une meilleure transduction du foie. Les souris ont reçu une dose de 6×10^{11} Vg/kg par la veine rétro-orbitale, 1 mois après l'induction de la déficience du gène *G6pc*.

➤ *Correction partielle de l'hypoglycémie et des paramètres plasmatiques*

Dès la première semaine après le traitement, les souris L-G6pc^{-/-} traitées ont normalisé leur glycémie après 6 heures de jeûne à une valeur d'environ 120mg/dL (figure 37). Par rapport aux souris L-G6pc^{-/-} non traitées qui présentent toujours une hypoglycémie d'environ 50-60mg/dL après 6 heures de jeûne, la glycémie des souris traitées est normalisée mais reste cependant légèrement inférieure à celle des souris témoins qui est d'environ 150-170mg/dL (figure 37). Au terme de l'étude, la glycémie des souris traitées tend à diminuer mais sans être significatif et reste bien supérieure à 100mg/dL.

Au niveau des paramètres plasmatiques lipidiques, les souris L-G6pc^{-/-} traitées par le vecteur scAAV2/8 ont normalisé leur taux de TG par rapport aux souris L-G6pc^{-/-} non traitées (figure 38A). Cette normalisation est visible dès la première semaine après l'injection des scAAV et dure tout au long des 8 mois de traitement (données non illustrées). Au niveau du cholestérol total, les souris L-G6pc^{-/-} traitées présentent des taux significativement plus élevés que les souris témoins L-G6pc^{+/+} et similaires aux souris L-G6pc^{-/-} non traitées, 8 mois après le traitement (figure 38B). Aucune normalisation au niveau du cholestérol plasmatique n'a pu être observée tout au long de cette étude chez les souris L-G6pc^{-/-} traitées (données non illustrées).

➤ *Amélioration de l'hépatomégalie*

L'hépatomégalie a été analysée à l'euthanasie des animaux, 8½ mois après le traitement viral des souris. Chez les souris L-G6pc^{-/-} traitées, l'hépatomégalie est toujours présente par rapport aux souris témoins L-G6pc^{+/+} mais est significativement diminuée comparée aux souris L-G6pc^{-/-} non traitées (figure 38C).

Seul le dosage d'activité enzymatique G6Pase a pu être réalisé pour cette étude et montre la restauration d'une faible activité G6Pase de $2,2 \pm 0,4$ U/g de tissu en moyenne (figure 38D).

L'injection des scAAV2/8 a permis une restauration de 14% de l'activité G6Pase hépatique chez les souris L-G6pc^{-/-} par rapport à l'activité basale des souris L-G6pc^{+/+} (16,1±0,4 U/g tissu) (figure 38D). Les observations histologiques des foies des souris ont confirmé l'amélioration de la stéatose. Le foie des souris L-G6pc^{-/-} non traitées révèlent une stéatose très marquée (>90%) avec des hépatocytes contenant de grosses vacuoles lipidiques (figure 39B), comparée à celle des foies des souris témoins (figure 39A). L'injection des scAAV2/8-mTTR-hG6PC aux souris L-G6pc^{-/-} a permis une réduction de la stéatose hépatique (50% de stéatose). L'accumulation de vacuoles lipidiques au sein des hépatocytes est réduite, bien que certaines zones restent stéatosique (figure 39C).

IV. Conclusions-Perspectives

Les résultats présentés dans cette partie démontrent la faisabilité d'un traitement par thérapie génique *in vivo* chez la souris L-G6pc^{-/-}. La première étude a permis d'évaluer l'efficacité d'un vecteur lentiviral mTTR-hG6PC dans la prévention du développement de la GSD 1a. L'avantage de ces vecteurs lentiviraux est qu'ils permettent l'intégration du transgène au sein du génome cellulaire. Ainsi, même si l'injection est réalisée durant la période néonatale, le transgène n'est pas perdu et est transmis aux cellules filles, permettant ainsi l'expression du transgène dans un grand nombre d'hépatocytes. Cependant, l'étude à long-terme a montré que la glycémie n'était pas corrigée un mois après avoir induit la déficience en G6Pase hépatique. Ces résultats suggèrent que l'intégration du transgène peut s'être faite dans une zone où la chromatine n'est pas ouverte, ne permettant pas la transcription du transgène au moment de l'induction de la déficience. La restauration d'une glycémie similaire aux souris témoins à partir du deuxième mois de déficience suggère que cette zone de chromatine doit être transcrite plus tardivement. Bien que ces lentivirus permettent une expression stable du transgène, un inconvénient majeur est le site d'intégration du transgène. En effet, dans cette étude, le transgène s'est probablement intégré dans une zone où la chromatine n'est pas transcrite, mais des études réalisées à l'aide de vecteurs onco-rétroviraux ont montré que l'intégration du transgène pouvait conduire au développement de cancer dû à l'activation de proto-oncogènes, y compris chez l'homme lors d'essais cliniques (Hacein-Bey-Abina et al., 2008; Hacein-Bey-Abina et al., 2003; Montini et al., 2009). Une intégration ciblée par recombinaison homologue permettrait

d'éviter ces problèmes de génotoxicité ou d'absence d'expression de la protéine thérapeutique (Wong and Chiu, 2010). Malgré cela, la glycémie est totalement corrigée tout au long de l'étude mais aucune donnée au niveau de la pathologie hépatique n'est disponible à ce jour (protocole en cours).

Ces résultats ne nous permettent pas de conclure quant à l'effet thérapeutique du vecteur lentiviral car le lentivirus recombinant a été injecté avant le développement de la pathologie. Ce vecteur n'a pas été utilisé dans le cadre d'un protocole de traitement curatif car l'injection des virus a été réalisée en période néonatale. Les vecteurs lentiviraux sont pourtant connus pour permettre la transduction des cellules qui ne se divisent pas. En effet, les neurones sont efficacement transduits par les vecteurs lentiviraux ainsi que les hépatocytes humains *in vitro* (Naldini et al., 1996; Nguyen et al., 2002). Bien que les hépatocytes humains quiescents soient transduits efficacement, les hépatocytes de rongeurs et en particulier les hépatocytes murins sont plus résistants à la transduction par les lentivirus *in vitro* et *in vivo* (Nguyen et al., 2002; Park et al., 2000; Pfeifer et al., 2001). Il a été montré que les hépatocytes doivent être en phase G1 du cycle cellulaire, pour permettre leur transduction (Korin and Zack, 1998; Park et al., 2000). L'amélioration de l'efficacité de transduction dans les hépatocytes murins est possible en augmentant la dose de virus injectée ou en réalisant une hépatectomie partielle, ce qui déclenche le cycle cellulaire (Nguyen et al., 2002; Park et al., 2000). De nouvelles techniques sont également développées pour augmenter l'efficacité de transduction dans le foie adulte, sans induire le cycle cellulaire. Dans le modèle animal de la maladie Crigler-Najjar, le rat Gunn adulte, la transduction des hépatocytes est augmentée en réalisant une hyperpression hépatique, en excluant transitoirement le foie de la circulation systémique (Dariel et al., 2009). Ainsi, les particules lentivirales sont forcées à passer l'endothélium pour atteindre plus facilement les hépatocytes. Ceci résulte en une correction de la pathologie tout au long de l'étude, grâce à une augmentation de la transduction des hépatocytes reflétée par l'augmentation du nombre de copies du vecteur par hépatocytes, et ceci avec une dose virale inférieure à celle utilisée généralement *in vivo* (Schmitt et al., 2010).

La deuxième partie de ce travail a consisté à tester l'efficacité d'un scAAV2/8 dans le traitement de la GSD 1a. Dans cette partie, le vecteur recombinant a été injecté à l'âge adulte, un mois après l'induction de la déficience du gène *G6pc*. L'avantage de l'utilisation

d'un vecteur scAAV par rapport à un AAV simple brin est l'expression rapide du transgène. En effet, une fois dans la cellule, le transgène est capable de s'auto-apparier, libérant ainsi un ADN double brin qui peut immédiatement être transcrit. Ainsi, nous avons montré que dès la première semaine après l'injection des scAAV2/8, la glycémie était corrigée chez les souris L-G6pc^{-/-} traitées. Cette correction de la glycémie est maintenue pendant plus de 7 mois mais, au niveau hépatique, la correction n'est que partielle. L'augmentation de la dose virale a permis d'augmenter l'efficacité de transduction et ainsi l'activité G6Pase chez les souris L-G6pc^{-/-} traitées par le vecteur scAAV. Cependant, l'activité G6Pase hépatique des souris traitées reste faible, d'environ 2U/g de tissu, ce qui représente moins de 20% de l'activité basale des souris témoins. La restauration de cette activité G6Pase hépatique a permis de corriger l'hépatomégalie et de diminuer la stéatose hépatique. Cependant, si tous les hépatocytes ne sont pas corrigés, l'accumulation de glycogène et de TG sera toujours présente au sein des cellules affectées et le risque de développer des adénomes sera toujours présent. Récemment, une étude a démontré qu'un patient a été diagnostiqué GSD 1a à l'âge de 42 ans, suite à la découverte d'un HCC qui s'est développé à partir d'un HCA. Ce patient, qui n'avait suivi aucun traitement diététique, n'était pas hypoglycémique mais présentait une hépatomégalie (Cassiman et al., 2010). Ainsi, si le foie n'est pas totalement corrigé, le risque de développer des HCA existe toujours. Néanmoins, bien que l'hypoglycémie après 6 heures de jeûne soit corrigée tout au long de l'étude chez les souris L-G6pc^{-/-} traitées, la glycémie présente une tendance à diminuer à long-terme, comparée aux glycémies durant les cinq premiers mois de traitement. Ceci peut s'expliquer par la persistance du transgène sous forme d'épisome (Flageul et al., 2009; Yiu et al., 2010a). En effet, même si le foie est un organe quiescent, il existe quand même une division cellulaire qui touche environ 1% des hépatocytes. Ainsi, sur le long-terme, ce renouvellement hépatocytaire à bas bruit peut être responsable de la diminution de l'efficacité du traitement avec la perte lente et progressive du transgène. Afin de lutter contre cette perte potentielle du transgène, une deuxième injection de vecteur pourrait être administrée aux souris. Dans ce cas, le pseudotypage de la capsid du vecteur devra être différent pour éviter le déclenchement d'une réaction immunitaire contre la protéine de la capsid (Weinstein et al., 2010).

Le développement d'une réaction immunitaire n'a pas été étudié dans ces études réalisées chez les souris LG6pc^{-/-} mais l'analyse histologique des foies des souris traitées n'a

pas montré d'infiltration lymphocytaire et la correction au niveau glycémique est maintenue sur le long-terme, ce qui nous permet d'exclure le développement d'une réaction immunitaire. De plus, dans notre modèle de souris L-G6pc^{-/-}, l'induction de la déficience est réalisé à l'âge de quatre semaines. Les souris ont donc exprimé la protéine G6PC dans le foie avant le traitement par les vecteurs viraux et la protéine thérapeutique n'est certainement pas reconnue comme étrangère au soi. Ainsi, l'induction de la déficience au moment du sevrage permet certainement d'établir une tolérance vis-à-vis de la protéine thérapeutique. De plus, le traitement par le vecteur lentiviral a été réalisé en période néonatale. A cette période, le système immunitaire est encore immature et permet d'induire une tolérance vis-à-vis du transgène (Nguyen et al., 2005; Xu et al., 2003). Les premiers résultats obtenus à l'aide de ces deux vecteurs viraux sont comparables aux études réalisées chez la souris totalement invalidée pour le gène *G6pc*. Dans la plupart des études, les traitements ont été réalisés avec des vecteurs AAV ou adénoviraux recombinants exprimant le gène *G6pc* sous le contrôle de promoteur/enhancer ubiquitaire β -Actine/CMV. Ces traitements ont permis une restauration faible de l'activité G6Pase hépatique, permettant aux souris de vivre sans injection de glucose. Cependant l'hépatomégalie et la stéatose n'étaient pas normalisées (Ghosh et al., 2006; Koeberl et al., 2006; Sun et al., 2002a; Zingone et al., 2000). Plus récemment, l'équipe de Yiu a obtenu une normalisation complète de la pathologie en utilisant un AAV exprimant le gène *G6PC* humain sous le contrôle du promoteur/enhancer *G6PC* humain (Yiu et al., 2010a). Ainsi, le choix du promoteur semble très important pour maintenir une correction à long-terme et la construction que l'on a utilisée devra peut être évoluée pour tenter de corriger plus efficacement la pathologie hépatique des souris L-G6pc^{-/-}.

En conclusion, ces résultats préliminaires ont montré la faisabilité d'un traitement par thérapie génique dans notre modèle de souris L-G6pc^{-/-}. La correction, au niveau de la régulation de la glycémie, semble meilleure à l'aide du vecteur lentiviral HIV-mTTR-hG6PC. Cependant, l'efficacité du vecteur lentiviral HIV-mTTR-hG6PC n'a pas pu être évaluée au niveau hépatique (protocole en cours). Le traitement des souris L-G6pc^{-/-} par le vecteur scAAV-mTTR-hG6PC a permis l'amélioration de l'hépatomégalie et de la stéatose, sans toutefois être totalement corrigées. Un travail de mise au point devra être réalisé afin d'obtenir une meilleure efficacité de transduction soit par modification du promoteur, soit par modification de l'administration des vecteurs en injectant les virus directement en veine

porte. Les prochaines études devront être réalisées sur un an de traitement pour permettre d'évaluer la protection apportée par le traitement sur l'apparition des HCA chez les souris L-G6pc^{-/-} traitées.

3ème partie : Etude de l'homéostasie
glucidique en absence de production
hépatique de glucose chez les souris L-G6pc^{-/-}

I. Introduction

Depuis les premiers travaux réalisés par Claude Bernard au XIX^{ème} siècle démontrant l'existence d'une synthèse de glucose au sein de l'organisme, la communauté scientifique considère toujours le foie comme étant la source majeure pour la PEG dans toutes les situations nutritionnelles (Wahren and Ekberg, 2007). Cependant, les reins et l'intestin sont capables de produire du glucose notamment au cours du jeûne prolongé (Mithieux et al., 2004a; Mithieux et al., 2006; Owen et al., 1969) et sous des régimes enrichis en protéines (Mithieux et al., 2005; Pillot et al., 2009). Dans ces situations, la quantification du glucose libéré par les reins et l'intestin a suggéré que la PHG était diminuée (<50%), entraînant une nouvelle répartition de la production de glucose à travers les trois organes. Le rôle prédominant du foie dans la PEG est donc remis en question. Etant donné que la détermination de la PRG et la PIG est basée sur l'utilisation de méthodes imprécises, combinant dilutions de traceurs et balances glycémiques artério-veineuses, le rôle quantitatif précis de chacun de ces deux organes dans la PEG est toujours mis en doute (Ekberg et al., 1999; Pillot et al., 2009; Previs et al., 2009; Watford, 2005).

Notre modèle de souris L-G6pc^{-/-} ne peut pas produire de glucose par le foie puisque l'activité G6Pase hépatique est nulle (Mutel et al., in press). Ainsi, les deux voies de synthèse du glucose – la glycogénolyse et la néoglucogénèse- sont inhibées lors de la dernière réaction avant la libération de glucose dans la circulation sanguine.

L'étude de ce modèle, au cours du jeûne prolongé, permettra de déterminer l'effet d'une absence de PHG dans la régulation de l'homéostasie glucidique et d'évaluer la capacité de la néoglucogénèse extra-hépatique à maintenir une homéostasie glucidique au cours du jeûne.

Dans cette étude, les souris L-G6pc^{-/-} ont été soumises à un jeûne prolongé de 45 heures afin de suivre la glycémie en absence de PHG. Les résultats ont montré que les souris étaient parfaitement viables et capables de réguler leur glycémie au cours du jeûne. Les mécanismes de compensation mis en jeu dans la régulation de l'homéostasie glucidique ont donc été recherchés par l'analyse de la néoglucogénèse extra-hépatique et la détermination de la PEG.

II. Matériels et méthodes

II.1 Animaux et prélèvements des tissus

Les souris mâles B6.g6pc^{lox/lox}/SA^{creERT2/+}, âgés de 6 à 8 semaines, ont reçu une injection quotidienne de tamoxifène (Sigma) avec une dose de 1mg/jour durant 5 jours afin d'induire l'excision de l'exon 3 du gène *G6pc*, spécifiquement au niveau du foie. Des souris témoins C57Bl6/J (Charles River, L'Arbresle) ont reçu le même traitement.

Au cours des expériences de jeûne, les souris ont toujours un accès libre à l'eau.

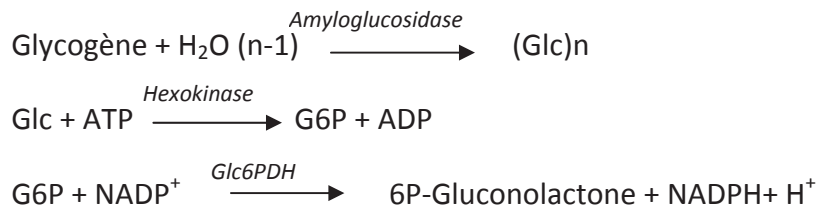
Les animaux ont été euthanasiés après 5 semaines de déficience, à l'état nourri ou après un jeûne de 6 heures. Les prélèvements de tissus (foie, rein et intestin) ont été réalisés rapidement par « freeze clamping » à la température de l'azote liquide (-196°C) pour les analyses biochimiques. Pour les analyses de ChIP, un rein et environ 2,5cm d'intestin sont coupés en petits morceaux et fixés dans du formaldéhyde 1% pendant 10 minutes à température ambiante. La fixation est stoppée après ajout de glycine 1M directement dans le milieu avec une concentration finale de 125mM pendant 10 minutes. Les tissus sont ensuite rincés deux fois dans du tampon phosphate salin (PBS) puis congelés dans l'azote liquide. Tous les tissus sont conservés à -80°C.

II.2 Etudes des paramètres plasmatiques

Le sang est prélevé dans le sinus-rétro orbitaire chez les souris nourries ou mises à jeun 6h. Les concentrations plasmatiques d'insuline, de glucagon et de corticostérone sont déterminées à l'aide de kits ELISA de Cristal Chem, Biovendor et Neogen (Interchim), respectivement. Les concentrations plasmatiques de catécholamines ont été déterminées par dosage HPLC. Les concentrations de β -hydroxybutyrate ont été mesurés à l'aide de bandelette Optium β -ketone avec un lecteur Optium Xceed (Abbott Diabetes Care, UK). Au cours des expériences de jeûne, la glycémie est suivie à l'aide d'un glucomètre (Roche, Accu-Check Go), à partir d'une goutte de sang prélevée à la queue.

II.3 Dosage du glycogène hépatique

Il s'effectue indirectement selon la méthode de Keppler et Decker par mesure du glucose libéré après hydrolyse enzymatique du glycogène.



Le tissu (100mg) est repris dans une solution d'acide perchlorique 6% (V/V) puis après sonication, l'homogénat est centrifugé à 10000g, 15 min à 4°C. Le surnageant est neutralisé avec du K₂CO₃ 3,2M et centrifugé 5 min. Une partie du surnageant est conservé pour le dosage du G6P et le reste est porté à ébullition pendant 20 min dans une solution de NaOH 0,3M. Il est ensuite incubé pendant 1h30 à 37°C avec l' α -amyloglucosidase (1mg/ml) dans une solution d'acide acétique 0,3M, tampon acétate 2M à pH 4,8. Le milieu réactionnel contient du TEA 0,3M, ATP 150mM, NADP 12mM, Glc6PDH (1U). L'addition d'hexokinase (0,7U) déclenche la réaction. Après 30 min à température ambiante, la densité optique est lue à 340nm. Les résultats sont exprimés en mg de glycogène/ g de foie.

II.3 Mesure de la production endogène de glucose

Les souris sont anesthésiées par voie gazeuse (Isoflurane) pour permettre la pose d'un cathéter en silicone dans la veine jugulaire droite, pour la perfusion de 3^{[3]H}-glucose. La détermination de la PEG est réalisée chez la souris vigile, entre 4 et 7 jours après la pose de cathéter chez des souris ayant retrouvées au moins 95% de leur poids initial. Les souris sont mises à jeun 5 heures ou 24 heures avant la perfusion. Un bolus de traceur 3^{[3]H}-glucose (92,5 kBq) est effectué lors de la première minute, puis le traceur est perfusé à un débit de 6,3 kBq/min. La glycémie est suivie toutes les 15 minutes, à l'aide d'un glucomètre. A l'état d'équilibre (entre 60 et 90 minutes de perfusion), le sang est prélevé pour déterminer la concentration en glucose et l'activité spécifique du traceur. La concentration plasmatique de glucose est déterminée à l'aide d'un kit Biomérieux. Pour déterminer l'activité spécifique du traceur, le sang est déprotéinisé par ajout de 1 volume de ZnSO₄ (0,3M) et 1 volume de Ba(OH)₂ (0,3M) puis centrifugé à 10 000g pendant 3 minutes. Après évaporation au préalable de l'eau tritiée, le signal radioactif du glucose tritié sanguin est mesuré dans un compteur béta et est exprimée en cpm/ml de plasma.

La PEG, exprimée en μmol de glucose /min, est égale au débit d'apparition du glucose (R_a en $\mu\text{mol}/\text{min}$). A l'état d'équilibre, le R_a est égal au R_d , débit de disparition du glucose ($\mu\text{mol}/\text{min}$). La PEG se calcule en déterminant le R_d , selon l'équation suivante :

$$R_d = F/AS \text{ avec } \begin{array}{l} F = \text{débit de perfusion de } 3[{}^3\text{H}]\text{-glucose (cpm/min)} \\ AS = \text{activité spécifique (cpm}/\mu\text{mol de glucose)} \end{array}$$

II.4 Mesure de l'expression des gènes

➤ *Quantification des ARNm*

Les ARN totaux ont été extraits à partir d'homogénats de tissus avec le réactif « TRIzol » (Invitrogen), en suivant les instructions du fabricant. La synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) est effectuée sur 500ng d'ARNm à l'aide de la M-MLV reverse transcriptase RNase H minus (Promega, France) et des oligonucléotides poly d(T) pendant 1h à 40°C. La PCR quantitative est réalisée par un appareil light-cycler (Roche Diagnostics, Germany) à l'aide d'amorces spécifiques (Mutel et al., in press). Les transcrits de la protéine ribosomique L19 sont utilisés comme référence.

➤ *Analyse des protéines en western-blot*

Les protéines à analyser sont dénaturées et réduites dans un tampon composé de β -mercaptoéthanol (5%V/V), SDS (5% P/V), glycérol (10% V/V), Tris-HCl (31,25mM), pH 6,8 et incubées 5 min à 100°C.

Les protéines (30 μg) sont séparées par migration sur un gel de polyacrylamide (10% P/V) SDS-PAGE contenant : SDS (0,1% P/V), Tris-HCl (37,5 mM), pH 8,8. La migration s'effectue à 200V dans un tampon Tris-HCl (25mM), glycine (192mM) et SDS (,1% P/V), pH 8,3.

Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane d'Immobilon-P (polyvinylidène fluorure, Millipore), dans un tampon Tris-HCl (25mM), glycine (192mM) et méthanol (20% V/V), pH 8-8,4 à 90V pendant 1 heure. Les membranes sont saturées par incubation dans un tampon TBS-Tween 0,2%, lait écrémé 2%. Les membranes sont ensuite incubées 1h à température ambiante en présence de l'anticorps primaire : soit anti-G6PC dilué au 1/5000^{ème} produit chez le lapin (Inserm U855), soit anti-PEPCK dilué au 1/5000^{ème} produit chez le lapin (Santa Cruz biotechnology), soit anti-glutaminase dilué au 1/2000^{ème} (fourni par N. Curthoys), soit anti- β -actine dilué au 1/40000^{ème} produit chez la souris (Sigma-Aldrich).

Après 3 lavages successifs, dans du TBS-Tween 0,2%, les membranes sont incubées en présence de l'anticorps secondaire dilué au 1/10000^{ème} [anti-immunoglobulines de lapin ou de souris couplées à la peroxydase produites chez la chèvre, BIORAD]. La détection est effectuée par chimioluminescence.

➤ **Dosage des activités enzymatiques**

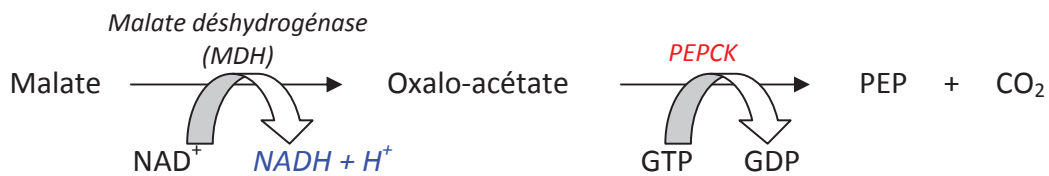
- Activité Glucose- 6-phosphatase

L'activité de la Glc6Pase est déterminée par la méthode de Baginski *et al*, basée sur la détermination colorimétrique spécifique du phosphate inorganique (Pi) libéré par la réaction d'hydrolyse du G6P. En parallèle, la mesure de l'hydrolyse d'un autre substrat, le β -glycérophosphate (β -Gly), permet de déterminer l'activité des phosphatases non spécifiques. L'activité spécifique de la Glc6Pase est donc obtenue par soustraction de l'activité phosphatase non spécifique à l'activité Glc6Pase totale.

Les homogénats tissulaires sont obtenus par broyage de 100mg de tissu congelé, qui sont ensuite repris dans 900 μ L d'un tampon Hepes-sucrose (Hépès 10mM, sucrose 0,25mM, pH 7,3) et soumis à un traitement aux ultrasons pour assurer une bonne lyse des membranes cellulaires. Le milieu réactionnel composé de 100 μ L de Tris-HCl 100mM pH 7,3 et de 100 μ L d'homogénat tissulaire est mis à incuber à 30°C. La réaction enzymatique est déclenchée par l'ajout de 100 μ L de G6P (100mM) ou 100 μ L de β -Gly (100mM) dans le milieu de réaction. Après 10 min d'incubation, la réaction est arrêtée par l'ajout de 2 mL d'un mélange d'acide trichloroacétique/ acide ascorbique (10%, 2% P/V) qui précipite les protéines. Après une centrifugation de 10 min à 2000g à 4°C, le Pi libéré est dosé sur 1mL de surnageant, par complexation avec 500 μ L de molybdate d'ammonium (1% P/V). Ce complexe est réduit par l'acide ascorbique. L'ajout de 1mL d'arsénite (2% P/V) citrate (2% P/V) permet de lier le molybdène libre en excès. La densité optique est lue à 700nm après 30min d'incubation à température ambiante. L'activité spécifique Glc6Pase est exprimée en μ mol de Pi libéré par minute et par gramme de protéine (μ mol/min/g prot).

- Activité phosphoénol pyruvate carboxykinase cytosolique

Ce dosage repose sur la détermination de la formation de phosphoénol pyruvate (PEP) par déplacement de l'équilibre de la réaction catalysée par la malate déshydrogénase (MDH). La vitesse d'apparition du PEP sera identique à celle du NADH :



Les homogénats tissulaires, obtenus de la même manière que pour le dosage de la Glc6Pase, sont soumis à une centrifugation d'une heure à 100000g à 4°C afin d'obtenir le cytosol. Le milieu de réaction contient 50mM de Tris, 0,75mM de MnCl₂, 1mM de NAD⁺, 1mM de GTP et 2,5U de MDH, pH8. 50µL de cytosol est ajouté au milieu réactionnel. Les cuves sont thermostatées à 37°C et la réaction est déclenchée par ajout de 10µL de malate 1M. L'évolution de la densité optique est mesurée à 340nm durant 15 min. L'activité PEPCK-c est proportionnelle à la pente initiale de la courbe et est exprimée en µmol/min/g de protéines.

II.5 Expériences d'immunoprécipitation de la chromatine

Environ 200mg de tissu fixé est réduit en poudre dans l'azote liquide puis lysé dans un tampon « cell lysis buffer » (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, cocktail anti-protéases, pH 8), pendant 30 minutes à 4°C et homogénéisé dans un potter Douce. Après centrifugation (2500g, 8min, 4°C), le culot de noyaux est lysé dans 10 ml de tampon « Nuclei lysis buffer » (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.5 M NaCl, pH 8, 1% Triton, 0.5% sodium deoxycholate, 0.5% Sarcosyl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, cocktail anti-protéases) pendant 30 min à 4°C. La chromatine obtenue est ensuite fragmentée à l'aide du kit « enzymatic shearing kit » (Active motif), selon les recommandations du fabricant, permettant l'obtention de fragments de chromatine de 200-500 pb. Les échantillons sont centrifugés à 14000g, 4 minutes à 4°C pour éliminer les débris et le surnageant contenant la chromatine fragmentée est collecté. 50µL de surnageant est conservé comme contrôle positif (input). Chaque immunoprécipitation est réalisée avec 10µg de chromatine en utilisant le kit CHIP-It Express (Active motif). Les complexes sont immunoprécipités pendant 16-18 heures à 4°C avec un anticorps anti P_{ser133}-CREB (1/40, Epitomics) ou anti-GFP (Santa-Cruz) comme contrôle négatif. Après récupération et purification de l'ADN (NucleoSpin Extract II, Macherey Nagel), une amplification par PCR est réalisée en utilisant des amorces spécifiques de la région -174/+44 du gène *G6pc* (fw : 5'-TTTGCTATTTTACGTAAATCACCT-3' ; rev: 5'-

GTACCTCAGGAAGCTGCCA-3') et de la région -207/-6 du gène *Pck1* (fw : 5'-GGCCTCCCAACATTCATTAAC-3' ; rev 5'-GTAGCTAGCCCTCCTCGCTTAA-3') (Duong et al., 2002).

III. Résultats

III.1. Contrôle de la glycémie au cours du jeûne prolongé chez les souris L-G6pc^{-/-}

A l'état nourri, les souris L-G6pc^{-/-} présentent une glycémie similaire aux souris témoins L-G6pc^{+/+} [figure 40C & (Mutel et al., in press)]. Comme la PHG est considérée comme cruciale pour l'homéostasie glucidique au cours du jeûne, nous avons suivi la glycémie des souris L-G6pc^{-/-} au cours d'un jeûne de 45 heures et leur PEG a été déterminée après 6 heures et 24 heures de jeûne (figure 40). La détermination de la PEG chez les souris L-G6pc^{-/-} mises à jeun pendant 6 heures a révélé une diminution de 50% par rapport aux souris témoins (65,3±7,5 µmol/kg/min versus 120,0±5,0 µmol/kg/min chez les souris témoins ; Figure 40A). Cette diminution de PEG est associée au développement d'une hypoglycémie chez les souris L-G6pc^{-/-} après 6 heures de jeûne (55±4 mg/dl versus 155±9 mg/dl chez les souris témoins; (Figure 40C ; Tableau 1). Ces résultats sont en accord avec le rôle prédominant de la glycolyse hépatique à l'état post-absorptif. Alors que les souris témoins ont totalement mobilisé leur glycogène après 24 heures de jeûne, les souris L-G6pc^{-/-} n'ont pas diminué leurs stocks de glycogène après 6 heures et 24 heures de jeûne, démontrant leur impossibilité à produire du glucose par le foie (Figure 40B). Cependant, malgré l'absence de PHG, la différence de PEG entre les souris L-G6pc^{-/-} et les souris témoins n'est plus visible après un jeûne de 24 heures (Figure 40A). De plus, les souris L-G6pc^{-/-} présentent une augmentation de leur glycémie entre 6 et 16 heures de jeûne pour atteindre une glycémie similaire aux souris témoins après 30 heures de jeûne (Figure 40C). A l'opposé, la glycémie des souris L-G6pc^{+/+} diminue progressivement pour atteindre une glycémie de jeûne d'environ 100mg/dL après 24 heures de jeûne (Figure 40C).

III.2. Induction de la néoglucogenèse extra-hépatique chez les souris L-G6pc^{-/-}

Etant donné que la PHG est absente après 6 heures de jeûne chez les souris L-G6pc^{-/-} et que la PEG n'est pas nulle, des mécanismes de compensation doivent se mettre en place à

travers une induction rapide de la néoglucogenèse extra-hépatique pour maintenir la glycémie. L'induction de la néoglucogenèse au niveau rénal et intestinal a été analysée par l'étude des deux enzymes clés de la néoglucogenèse : la PEPCk-c et la G6Pase. La glutamine étant le substrat principal de la néoglucogenèse rénal et intestinale, l'expression de la glutaminase a été aussi analysée par Western blot.

III.2.1. Induction de la néoglucogenèse extra-hépatique après 6 heures de jeûne

En accord avec notre hypothèse, l'expression de ces enzymes clés de la néoglucogenèse est fortement induite dans les reins et l'intestin des souris L-G6pc^{-/-}. Au niveau rénal, le niveau d'ARNm du gène *G6pc* est doublé par rapport aux souris témoins et il en résulte une augmentation de l'activité G6Pase de 35% chez les souris L-G6pc^{-/-} (128,6 ± 4,2 U/g protéines vs 95,8 ± 6,9 U/g protéines chez les souris L-G6pc^{+/+} ; figures 41A et 41B). Le niveau d'ARNm *Pck1* est également augmenté de trois fois dans le rein des souris L-G6pc^{-/-} entraînant une augmentation de deux fois de l'activité PEPCk (71,2 ± 7,9 U/g protéines vs 31,0 ± 2,2 U/g protéines chez les souris témoins ; figures 41A et 41B). En accord avec ces résultats, l'analyse des protéines par western blot a également confirmé l'induction de la synthèse des protéines G6PC, PEPCk ainsi que la glutaminase chez les souris L-G6pc^{-/-} (figure 41C). Ces données démontrent une induction de la voie de la néoglucogenèse rénale au niveau des trois enzymes clés.

De façon similaire, les niveaux des ARNm *G6pc* et *Pck1* sont induits de trois fois dans l'intestin des souris L-G6pc^{-/-} par rapport aux souris témoins (figure 41D). En accord, l'activité G6Pase intestinale est augmentée de 48% chez les souris L-G6pc^{-/-} (figure 41E) et les quantités de protéines PEPCk et glutaminase sont augmentées (figure 41F).

De façon très rapide (dès 6 heures de jeûne), les souris L-G6pc^{-/-} sont donc capables de compenser l'absence de PHG en induisant la voie néoglucogénique au niveau du rein et au niveau de l'intestin.

III.2.2 La néoglucogenèse rénale est induite dès l'état nourri

A l'état nourri, il est intéressant de noter que les souris L-G6pc^{-/-} ont une glycémie similaire à celle des souris témoins. Ceci n'est pas le cas des souris totalement invalidées pour le gène *G6pc* qui sont hypoglycémiques (Lei et al., 1996). Nous avons donc analysé l'expression des enzymes G6Pase et PEPCk dans les reins et l'intestin des souris L-G6pc^{-/-}

nourries, ce qui a permis de mettre en évidence une induction de la néoglucogenèse rénale. En effet, la G6Pase rénale est induite au niveau des ARNm (augmentation de 70%), de la protéine (augmentation de 3 fois) et de l'activité (augmentation d'environ 35%) chez les souris L-G6pc^{-/-} comparée aux souris témoins (figures 42A-D). Cependant, l'expression de la PEPCCK rénale n'est pas induite chez les souris L-G6pc^{-/-} nourries (figures 42A-D). Dans l'intestin des souris L-G6pc^{-/-}, aucune induction des ARNm, de la quantité protéique ou d'activité enzymatique n'est retrouvée au niveau de la G6Pase et de la PEPCCK (figures 42E-H).

III.3. Le glucagon active la néoglucogenèse extra-hépatique chez les souris L-g6pc^{-/-}

III.3.1 La sécrétion de glucagon est augmentée chez les souris L-G6pc^{-/-}

Les souris L-G6pc^{-/-} développent une hypoglycémie après 6 heures de jeûne et induisent leur néoglucogenèse extra-hépatique. Elles reproduisent une situation qui est rencontrée lors d'un jeûne avancé. Les hormones régulatrices de la glycémie ont été analysées chez ces souris nourries et après 6 heures de jeûne. A l'état nourri, les souris présentent une insulinémie élevée sans différence entre les deux groupes de souris (figure 43B). Cependant, les souris L-G6pc^{-/-} ont un taux de glucagon plasmatique significativement augmenté par rapport aux souris témoins à l'état nourri (100 ± 15 pg/ml vs 66 ± 5 pg/ml chez les souris L-G6pc^{+/+}, $p < 0,05$; figure 43A). Cette augmentation du glucagon permet d'augmenter de deux fois le ratio glucagon/insuline chez les souris L-G6pc^{-/-} en faveur du glucagon (figure 43C). Après 6 heures de jeûne, le métabolisme des souris est orienté vers un métabolisme de production de glucose. En effet, chez les souris témoins, le glucagon plasmatique est augmenté alors que l'insuline est diminuée entraînant une augmentation du ratio glucagon/insuline comparée à l'état nourri ($0,04 \pm 0,01$ UA vs $0,53 \pm 0,1$ UA à l'état nourri; figure 43C). Chez les souris L-G6pc^{-/-}, ce mécanisme est amplifié car le glucagon plasmatique est augmenté de près de deux fois alors que l'insuline est diminuée deux fois. Ainsi, comme à l'état nourri, le ratio glucagon/insuline bascule en faveur du glucagon chez les souris L-G6pc^{-/-}, avec une augmentation de trois fois de ce rapport par rapport aux souris L-G6pc^{+/+} (figure 43C). Comme les souris développent une hypoglycémie à 6 heures de jeûne, les taux de corticostérone et des catécholamines ont également été mesurés. Une forte induction de la sécrétion de corticostérone est retrouvée après 6 heures de jeûne chez les

souris L-G6pc^{-/-} (tableau 3), alors que les taux d'adrénaline et de noradrénaline ne sont pas modifiés (tableau 3). Cette augmentation de la sécrétion de corticostérone est une réponse à l'hypoglycémie car aucune différence n'est visible à l'état nourri (63±10 ng/ml chez les souris L-G6pc^{-/-} vs 65±14 ng/ml chez les souris L-G6pc^{+/+}).

III.3.2 Le glucagon régule l'expression des gènes dans le rein et l'intestin des souris L-G6pc^{-/-}

Le glucagon est connu pour réguler positivement la transcription des gènes *G6pc* et *Pck1* dans le foie, via la phosphorylation du facteur de transcription CREB et sa fixation dans la région promotrice de ces gènes (voir introduction II.1.2). Il est également connu que le récepteur au glucagon est exprimé dans le rein et dans l'intestin mais sa fonction au niveau de ces deux organes est aujourd'hui inconnue (Burcelin et al., 1995). Nous avons fait l'hypothèse que le glucagon pourrait agir dans le rein et l'intestin pour induire l'expression des gènes de la néoglucogenèse. Afin de vérifier cette hypothèse, la fixation du facteur CREB phosphorylé (P-CREB) sur le promoteur des gènes *G6pc* et *Pck1* a été analysée grâce à des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine. Dès l'état nourri, où seule l'expression de la G6Pase est induite dans les reins des souris L-G6pc^{-/-} (figure 42), P-CREB est déjà fixé au promoteur *G6pc* chez les souris L-G6pc^{-/-} (figure 43D). Après 6 heures de jeûne, lorsque l'expression des deux enzymes G6Pase et PEPCK est induite dans les reins et l'intestin des souris L-G6pc^{-/-}, P-CREB est fixé au niveau du promoteur *G6pc* dans les deux tissus (figure 43E-F). Cependant, la fixation au promoteur de la PEPCK diffère dans le rein et l'intestin des souris L-G6pc^{-/-}. P-CREB est fixé au promoteur *Pck1* uniquement dans l'intestin et n'est pas retrouvé sur le promoteur rénal chez les souris L-G6pc^{-/-} (figure 43E-F), suggérant une régulation différente du gène *Pck1* dans le rein.

Pour vérifier que ce mécanisme impliquant la liaison de P-CREB aux promoteurs *G6pc* et *Pck1* est retrouvée au niveau rénal et intestinal chez des souris témoins G6pc^{+/+}, un challenge au glucagon a été réalisé chez des souris témoins. Trente minutes après l'injection, le glucagon plasmatique est augmenté chez les souris témoins à un taux similaire à celui des souris L-G6pc^{-/-} mises à jeun 6 heures (figure 44A vs figure 43A). Les expériences de ChIP révèlent une fixation de P-CREB sur la région promotrice du gène *G6pc* plus importante dans les deux tissus, 30 minutes après l'injection de glucagon (figure 44B). En accord avec les

résultats observés chez les souris L-G6pc^{-/-}, P-CREB est lié au promoteur *Pck1* uniquement dans l'intestin des souris traitées au glucagon et ne se lie pas dans les reins (figure 44B).

III.4. L'expression de la PEPCK rénale est régulée par l'acidose

Au vu de ces résultats, l'induction de l'expression du gène *Pck1* dans le rein des souris L-G6pc^{-/-} semble dépendant d'un autre mécanisme. L'acidose métabolique est une situation connue pour stimuler la néoglucogenèse rénale, via une activation de la transcription du gène *Pck1* (Chakravarty et al., 2005; Taylor and Curthoys, 2004). Afin de lutter contre l'acidose, le métabolisme de la glutamine est augmenté dans le rein, pour augmenter l'excrétion urinaire d'ions ammonium et rétablir l'équilibre acido-basique. Parallèlement, la néoglucogenèse est induite suite à l'activation de la PEPCK, entraînant une augmentation de la production rénale de glucose.

L'acidose a été évaluée par la mesure du pH urinaire au cours du jeûne. Le pH urinaire des souris L-G6pc^{-/-} est devenu fortement acide (pH ≈5,0) après 6 heures de jeûne (figure 46A), suggérant le développement d'une acidose au niveau sanguin.

Chez les souris L-G6pc^{-/-}, le développement d'une acidose métabolique peut s'expliquer par une augmentation plasmatique du lactate (tableau 3) et des corps cétoniques (figure 45) après 6 heures de jeûne. Lors d'un jeûne prolongé, la concentration sanguine de corps cétoniques est augmentée pour fournir des substrats énergétiques aux tissus pour pallier au manque de glucose. En réponse à l'hypoglycémie développée à 6 heures de jeûne, les souris L-G6pc^{-/-} sont capables de stimuler leur production de corps cétoniques. En effet, les corps cétoniques sont présents à faible concentration chez les deux groupes de souris nourries et la concentration est légèrement augmentée après 6 heures de jeûne chez les souris témoins (figure 45A). Chez les souris L-G6pc^{-/-}, la concentration sanguine de corps cétoniques est augmentée de trois fois par rapport aux souris témoins, après 6 heures de jeûne (figure 45A). En accord avec ce résultat, l'expression de l'HMG-CoA synthase (3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase) mitochondriale, enzyme de la cétogenèse, est fortement induite dans le foie des souris L-G6pc^{-/-} après 6 heures de jeûne (figure 45B).

Afin de tester l'hypothèse de l'induction de la PEPCK rénale par l'acidose, du bicarbonate de sodium (NaHCO₃ 0,28M) a été ajouté dans l'eau de boisson des souris L-G6pc^{-/-} pendant trois jours, afin de contrer l'acidose. L'ajout du NaHCO₃ entraîne une

augmentation du pH urinaire à l'état nourri (figure 46A) et prévient l'acidification de l'urine des souris L-G6pc^{-/-} après 6 heures de jeûne, qui présentent un pH urinaire similaire à celui des souris témoins à jeun (figure 46A).

En présence de NaHCO₃, la néoglucogenèse intestinale est toujours induite, l'expression de la G6Pase et de la PEPCK chez les souris L-G6pc^{-/-} étant toujours élevée à 6 heures de jeûne (figure 46C, 46E, 46G). En revanche, au niveau rénal, le traitement des souris L-G6pc^{-/-} par le NaHCO₃, entraîne une normalisation de l'expression de la PEPCK au niveau des ARNm, de la protéine et de l'activité enzymatique (figures 46B, 46D, 46F). En revanche, l'expression de la G6Pase n'est pas modifiée par le traitement au NaHCO₃ et reste induite comme chez les souris L-G6pc^{-/-}.

Ces résultats démontrent donc que l'induction de la PEPCK rénale est spécifiquement induite par l'acidose chez les souris L-G6pc^{-/-} après 6 heures de jeûne.

IV. Discussion- Conclusions

Au cours du jeûne, la PEG permet de maintenir une glycémie stable grâce à un apport constant de glucose aux tissus. Elle fait intervenir dans un premier temps la glycogénolyse hépatique, rapidement mobilisable puis la néoglucogenèse qui prend place au niveau du foie, des reins et plus tardivement au niveau de l'intestin. Cependant, le foie est toujours considéré comme l'organe majeur de la PEG quelque soit la situation nutritionnelle. Or, dans certaines situations nutritionnelles, nous avons montré que le foie peut produire moins de glucose qu'attendu, notamment au cours du jeûne prolongé chez le rat ou lors d'un régime riche en protéines (Croset et al., 2001; Mithieux et al., 2004a; Mithieux et al., 2005; Pillot et al., 2009). Les résultats présentés dans cette partie démontrent que la PHG n'est pas cruciale pour la régulation de la glycémie au cours du jeûne. En accord avec le rôle important de la glycogénolyse hépatique après 6 heures de jeûne, les souris L-G6pc^{-/-} présentent une PEG et une glycémie diminuées par rapport aux souris témoins. Cependant, si le jeûne perdure, la glycémie des souris L-G6pc^{-/-} augmente et atteint des valeurs autour de 80-100 mg/dL, similaires à celles des souris témoins. Ce maintien de la glycémie est possible grâce à une induction très rapide de la néoglucogenèse extra-hépatique dans les reins et l'intestin. Pour pallier à la légère hypoglycémie observée à 6 heures de jeûne et augmenter l'apport de substrats énergétiques, les souris L-G6pc^{-/-} sont capables d'induire leur production de corps

cétoniques. A 6 heures de jeûne, les souris L-G6pc^{-/-} se trouvent dans une situation équivalente à un jeûne avancé chez une souris témoin, caractérisée par une baisse de la glycémie et une induction de la synthèse des corps cétoniques (Fukao et al., 2004). Ces deux mécanismes mis en place permettent donc la survie des souris, sans développer un réel état de stress, comme en témoigne l'absence d'induction des catécholamines (Tableau 3).

En accord avec l'induction de la néoglucogenèse dans les reins et l'intestin, le taux plasmatique de glutamine est diminué, après 6 heures de jeûne, chez les souris L-G6pc^{-/-} en comparaison aux souris témoins (Tableau 3). En effet, il existe une sélectivité de substrats néoglucogéniques en fonction de l'organe producteur de glucose. La glutamine est utilisée majoritairement au niveau du rein et de l'intestin alors que l'alanine est utilisée préférentiellement par le foie (Mithieux et al., 2004b; Stumvoll et al., 1998). Ainsi, l'augmentation de la consommation de glutamine par les reins et l'intestin explique la diminution de sa concentration plasmatique. A l'inverse, une augmentation de 50% du taux circulant d'alanine est retrouvée chez les souris L-G6pc^{-/-} (Tableau 3). Ceci est en accord avec l'absence de production hépatique de glucose à partir de ce substrat.

Bien que la PHG soit inhibée, la première réponse à être mise en place pour réguler l'homéostasie glucidique est une augmentation de la sécrétion de glucagon. En effet, dès l'état nourri, la sécrétion du glucagon est augmentée chez les souris L-G6pc^{-/-} et est amplifiée en réponse à l'hypoglycémie. Le rôle principal du glucagon est d'augmenter la PHG, par son action rapide sur la glycogénolyse. Dans le foie, le glucagon régule aussi positivement la transcription des gènes de la néoglucogenèse, grâce à la fixation du facteur de transcription CREB phosphorylé sur les régions CRE des promoteurs, permettant le recrutement de co-activateurs tels que CREB Binding Protein (CBP) (Fimia and Sassone-Corsi, 2001; Roesler, 2000; Thiel et al., 2005). De plus, P-CREB est associé au promoteur uniquement dans les situations d'activation de la transcription (Gautier-Stein et al., 2005). Pour obtenir une activité maximale, d'autres facteurs de transcription sont nécessaires comme HNF1 α , HNF6, C/EBP (Yabaluri and Bashyam, 2010). Les résultats obtenus suggèrent fortement un rôle physiologique du glucagon dans les reins et l'intestin des souris L-G6pc^{-/-} pour induire l'expression des gènes de la néoglucogenèse. Dans cette étude, nous avons montré la fixation de P-CREB dès l'état nourri au promoteur *G6pc* rénal. Sa liaison est plus tardive au promoteur *G6pc* intestinal (après 6 heures de jeûne). Ceci est en accord avec l'induction de l'activité G6Pase qui prend place à l'état nourri dans le rein et après 6 heures de jeûne dans

l'intestin. Ces résultats mettent en exergue le rôle régulateur du glucagon au niveau de ces organes, qui n'était pas encore défini. L'injection intrapéritonéale de glucagon à des souris témoins a permis de reproduire la fixation de la protéine P-CREB au promoteur *G6pc* dans les reins et l'intestin. L'induction de la néoglucogenèse extrahépatique peut donc s'expliquer en grande partie par le changement du statut hormonal, avec des taux élevés de glucagon et faibles d'insuline, chez les souris L-G6pc^{-/-}. Cependant, le gène *Pck1* rénal ne semble pas régulé par le glucagon ; aucune fixation de P-CREB n'a été mise en évidence sur le gène *Pck1* dans le rein, alors que ce facteur est lié au promoteur dans l'intestin.

L'augmentation de l'ARNm *Pck1* et de l'activité PEPCCK après 6 heures de jeûne dans le rein peut s'expliquer par le développement d'une acidose métabolique chez les souris L-G6pc^{-/-}. L'acidose métabolique est une situation connue pour induire l'expression de la PEPCCK rénale (Burch et al., 1978; Chakravarty et al., 2005; Taylor and Curthoys, 2004). Cet effet est annulé par une alcalose. L'augmentation de l'ammoniogenèse et de la néoglucogenèse rénale à partir de la glutamine constitue une réponse adaptative qui permet de rétablir, en partie, l'équilibre acido-basique lors d'une acidose (Taylor and Curthoys, 2004). Parallèlement, l'augmentation du catabolisme de la glutamine entraîne une augmentation du taux d' α -cétoglutarate rénal. Celui-ci entre dans le cycle de Krebs et peut en être détourné pour la synthèse de glucose *de novo*, via l'augmentation de la PEPCCK. L'ajout de NaHCO₃ dans l'eau de boisson des souris, afin de contrer l'acidose développée après 6 heures de jeûne, a permis de vérifier que l'induction de la PEPCCK rénale était liée à l'acidose. En revanche, l'expression de la G6Pase n'a pas été modifiée par le traitement au NaHCO₃, confirmant que l'expression de la G6Pase rénale n'est pas régulée par l'acidose. (Burch et al., 1978). Ces résultats suggèrent aussi que les gènes de la néoglucogenèse ne sont pas régulés par l'acidose dans l'intestin.

En conclusion, les souris L-G6pc^{-/-} sont capables de s'adapter à l'absence de PHG grâce à l'induction rapide de la néoglucogenèse rénale et intestinale et à la synthèse de corps cétoniques. L'absence de glyco-génolyse hépatique est compensée par l'augmentation des corps cétoniques afin de pouvoir fournir des substrats énergétiques aux différents tissus et notamment au cerveau. Dans le même temps, l'augmentation de la sécrétion du glucagon et l'acidose métabolique conduisent à une induction maximale des enzymes de la néoglucogenèse chez les souris L-G6pc^{-/-}, leur permettant de réguler leur glycémie.

Ces résultats fournissent une preuve quantitative du rôle de la néoglucogenèse extrahépatique pour maintenir une production de glucose substantielle lors d'un jeûne prolongé.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les objectifs au début de ce travail reposaient sur deux problématiques concernant la PEG et son enzyme clé : la G6Pase. La première problématique concernait la maladie rare liée à la déficience d'activité G6Pase : la glycogénose de type 1. Depuis les années 1980, le seul traitement des patients GSD1a repose sur un traitement nutritionnel strict. Ce traitement a permis d'améliorer considérablement la qualité de vie des patients mais a fait apparaître le développement de complications à long-terme comme la survenue d'adénomes hépatiques et d'insuffisance rénale. Les mécanismes moléculaires d'apparition des adénomes hépatiques sont encore incompris et aucun traitement curatif n'existe.

La deuxième problématique concernait la PEG, encore considérée comme une fonction unique et principalement hépatique. Or des données du laboratoire ont fortement suggéré que les reins et l'intestin pouvaient contribuer de façon significative à la PEG dans certaines situations nutritionnelles. De plus, selon le site de production, le glucose pourrait jouer un rôle différent sur l'homéostasie glucidique, avec notamment un effet délétère du glucose produit par le foie conduisant au développement d'une insulino-résistance et du diabète (Magnusson et al., 1992; Trinh et al., 1998). A l'inverse, le glucose produit par l'intestin aurait des effets bénéfiques dans le contrôle de la glycémie, grâce au déclenchement d'un signal glucose portal capable de diminuer la prise alimentaire, d'augmenter l'utilisation du glucose par les tissus périphériques et d'améliorer l'inhibition la production hépatique de glucose par l'insuline (Burcelin et al., 2000; Mithieux et al., 2005; Pillot et al., 2009; Tordoff and Friedman, 1986).

Dans ce travail, nous avons développé un nouveau modèle murin original de GSD 1a avec une invalidation inductible du gène *G6pc* spécifiquement au niveau du foie. Nous avons montré que ces souris sont viables (>20 mois) et normoglycémiques, lorsqu'elles ont accès à la nourriture. Nous avons pu montrer que la néoglucogénèse rénale était induite à l'état nourri, permettant à ces souris le maintien de leur homéostasie glucidique, à l'inverse des souris totalement invalidées pour le gène *G6pc* qui développent des hypoglycémies, même à l'état nourri (Lei et al., 1996). La survie des souris sur le long-terme nous a permis de valider ce modèle comme un nouveau modèle de GSD 1a hépatique puisque ces souris reproduisent parfaitement la pathologie hépatique. Comme chez l'homme, la pathologie hépatique est progressive, avec le développement d'une hépatomégalie liée à un stockage important de glycogène et d'une stéatose, qui s'aggravent avec le temps de déficience. A partir de 9 mois

de déficience, des adénomes apparaissent dans le foie des souris L-G6pc^{-/-} et après 18 mois, toutes les souris présentent au moins un adénome au niveau du foie. Ces souris permettront enfin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'apparition des adénomes et seront un excellent modèle pour tester l'efficacité d'un traitement par thérapie génique sur l'apparition des adénomes hépatiques.

Le développement de ce modèle nous a également permis de débiter des essais de thérapie génique, afin de développer un traitement curatif pour la GSD 1a. En effet, la GSD 1a est une maladie candidate pour développer ce type de traitement puisque c'est une maladie monogénique. L'inactivation spécifique du gène au niveau du foie nous a permis de débiter des essais de thérapie génique en ciblant uniquement le foie. Dans des conditions non pathologiques, le foie est le seul des trois organes producteurs à pouvoir stocker du glycogène en quantité importante, pouvant assurer le maintien de la glycémie pendant les courtes périodes de jeûne. De plus, la correction hépatique suffit pour normaliser la glycémie, comme il a été montré lors de transplantation hépatique chez l'homme (Labrune, 2002). Des essais de traitement par thérapie génique ont déjà été réalisés dans le modèle murin d'inactivation totale du gène *G6pc* ou chez le chien GSD1a, en utilisant différents vecteurs viraux (Chou and Mansfield, 2007). Les résultats démontrent qu'un tel traitement est réalisable pour la GSD1a mais, des résultats très satisfaisants doivent d'abord être obtenus dans les modèles animaux avant de développer un essai clinique. En collaboration avec l'équipe de biothérapies hépatiques à Nantes, nous avons choisi de tester l'efficacité de deux nouveaux vecteurs viraux dérivés des lentivirus et des AAV. Les avancées concernant la vectorologie et les essais de traitement dans les modèles animaux ont déjà permis d'utiliser ces deux types de vecteurs pour des essais cliniques. En 2006, une étude clinique a rapporté la possibilité de transduction des hépatocytes humains par un vecteur AAV, après une administration *in vivo* via l'artère hépatique chez des patients atteints d'hémophilie. Ce traitement a permis d'obtenir des taux de facteur IX thérapeutiques. La correction fut transitoire due au développement d'une réaction immunitaire contre les protéines de la capsid, qui n'avait pas été développée dans les études pré-cliniques (Manno et al., 2006). Un second essai clinique a démontré l'efficacité des AAV pour le traitement d'une maladie rétinienne comme la maladie de Leber. Un an et demi après l'administration sub-rétinienne du vecteur AAV, les patients ont une amélioration de leur vision (Simonelli et al., 2010). Les vecteurs lentiviraux dérivés du HIV ont également été utilisés très récemment dans des

essais cliniques pour traiter la β -thalassémie et l'adrénoleukodystrophie liée à l'X. Plus de deux ans après le traitement, le patient atteint de β -thalassémie ne nécessite plus de transfusion sanguine (Cavazzana-Calvo et al., 2010). Chez les patients atteints d'adrénoleukodystrophie, la progression de la démyélinisation a été stoppée, 15 mois après le traitement (Cartier et al., 2009). Dans ces deux essais, les cellules ont été transduites *ex vivo* pour éviter la dissémination du vecteur lentiviral dans l'organisme.

Les résultats préliminaires obtenus à l'aide de ces deux vecteurs montrent que la glycémie est corrigée chez les souris L-G6pc^{-/-} traitées, après 6 heures de jeûne. Cependant, ces souris développent toujours une hépatomégalie et une stéatose importantes après 7 à 8 mois de traitement. Ces études ne nous ont pas encore permis d'étudier l'effet du traitement sur le développement des adénomes. Des améliorations doivent donc être apportées afin d'augmenter l'efficacité de transduction des vecteurs. Il sera également important de prendre en considération le fait que la glycogénose de type 1 est une maladie qui entraîne des anomalies au niveau de l'architecture du foie. Le traitement devra donc corriger le maximum d'hépatocytes pour limiter la stéatose, l'hépatomégalie et l'apparition d'adénomes. Il a néanmoins été démontré que les hépatocytes corrigés par thérapie génique pouvaient acquérir un avantage sélectif. La transduction d'un faible nombre d'hépatocytes peut permettre le repeuplement du foie et la guérison grâce à cet avantage sélectif (Mallet et al., 2002).

Enfin, concernant le dogme actuel de la PEG, l'étude de la régulation de la glycémie au cours du jeûne nous a permis de démontrer que le foie n'est pas essentiel au maintien de la glycémie au cours du jeûne. En absence de PHG, les souris L-G6pc^{-/-} développent une hypoglycémie transitoire, ce qui confirme le rôle essentiel de la glycogénolyse hépatique en période post-prandiale. Mais, si le jeûne se prolonge, les souris sont capables de maintenir une glycémie grâce à l'induction de la néoglucogénèse dans les reins et l'intestin. Ces résultats nous ont permis de démontrer le rôle quantitatif important de la néoglucogénèse rénale et intestinale pour le maintien de l'homéostasie glucidique, en absence de PHG. La même induction de la néoglucogénèse extra-hépatique, avec une diminution concomitante de la PHG, a été retrouvée chez le rat, en période post-absorptive sous un régime enrichi en protéines (Mithieux et al., 2005; Pillot et al., 2009). L'augmentation de la production intestinale et rénale de glucose lors d'un régime enrichi en protéines n'a pas été associée à

une augmentation de la PEG. La redistribution de la production de glucose à travers ces trois organes pourrait avoir un rôle quantitatif mais aussi un rôle qualitatif sur le maintien de l'homéostasie glucidique et énergétique. Des études ont ainsi suggéré que l'induction de la néoglucogenèse intestinale était le lien mécanistique de l'effet satiétogène des protéines et des améliorations métaboliques très rapides obtenues chez les patients obèses diabétiques ayant subi un by-pass gastrique (Mithieux et al., 2005; Troy et al., 2008). Ainsi, l'augmentation de la production intestinale de glucose aurait plutôt un rôle bénéfique dans le cadre de l'homéostasie glucidique et énergétique alors que l'induction de la PHG serait en cause dans le développement de l'insulino-résistance et du diabète (Trinh et al., 1998). Des données du laboratoire non publiées obtenues à l'aide de ces souris L-G6pc^{-/-} et des souris invalidées spécifiquement pour le gène *G6pc* au niveau intestinal (I-G6pc^{-/-}) supportent ce nouveau concept. En effet, les souris L-G6pc^{-/-} nourries par un régime high fat/high sucrose, connu pour induire rapidement une obésité et un diabète de type 2, sont résistantes au développement du diabète. Ainsi, l'absence de production hépatique de glucose est suffisante pour protéger les souris du diabète (Abdul-Wahed et al., 2009). A l'inverse, les souris I-G6pc^{-/-} développent, quant à elles, une insulino-résistance et une intolérance au glucose dès les premières semaines d'invalidation, sous un régime standard (Penhoat et al., 2009). Les prochaines études sur ces souris et le développement de souris sur-exprimant le gène *G6pc* spécifiquement dans le foie ou dans l'intestin nous permettront de valider ce nouveau concept de la PEG avec une production bénéfique par l'intestin et une production délétère par le foie, dans le cadre de l'homéostasie glucidique et énergétique.

TRAVAUX PERSONNELS

➤ PUBLICATIONS

1. E. Mutel, A. Abdul-Wahed, N. Ramamonjisoa, A. Stefanutti, I. Houberdon, S. Cavassila, F. Pilleul, O. Beuf, A. Penhoat, G. Mithieux, F. Rajas
Targeted deletion of liver glucose-6-phosphatase mimics glycogen storage disease type 1a including development of multiple adenomas.
Journal of Hepatology, in press.
2. J. Gout, D. Sarafian, E. Mutel, M. Vigier, F. Rajas, G. Mithieux, M. Begeot, D. Naville.
Metabolic and melanocortin gene expression alterations in male offspring of obese mice.
Mol Cell Endocrinol. 2010 May 5;319(1-2):99-108.
3. A. Penhoat, E. Mutel, M. Amigo Correig, B. Pillot, A. Stefanutti, F. Rajas, G. Mithieux.
Protein-induced satiety is abolished in the absence of intestinal gluconeogenesis
Soumis à *Physiology and Behaviour*.
4. E. Mutel, A. Gautier-Stein, A. Abdul-Wahed, M. Amigo Correig, F. Delaere, C. Zitoun, A. Stefanutti, I. Houberdon, V. Large, A. Penhoat, G. Mithieux, F. Rajas
Control of blood glucose in the absence of hepatic glucose production due to an induction of extrahepatic glucose production by glucagon, *en préparation*.

➤ COMMUNICATIONS ORALES

1. E. Mutel, A. Stefanutti, G. Mithieux, F. Rajas.
Développement d'un modèle hépatique de glycogénose de type 1a.
2ème Colloque génomique fonctionnelle du foie, Janvier 2008, Paris, France.
2. E. Mutel, A. Stefanutti, G. Mithieux, F. Rajas.
Invalidation du gène de la glucose-6-phosphatase hépatique et régulation de la glycémie.
Congrès de l'ALFEDIAM, Mars 2008, Bruxelles, Belgique.
3. A. Abdul-Wahed, E. Mutel, G. Mithieux, F. Rajas.
L'absence de production hépatique de glucose prévient le développement du diabète et de l'obésité.
Congrès de l'ALFEDIAM, Mars 2009, Strasbourg, France
4. E. Mutel, N. Ramamonjisoa, A. Abdul-Wahed, I. Houberdon, S. Cavassila, F. Pilleul, G. Mithieux, O. Beuf, F. Rajas.
Développement d'adénomes hépatiques dans un modèle de glycogénose de type 1a.
65èmes Journées de l'AFEF, Septembre 2009, Marne la Vallée, France.

5. S. Casteras, E. Mutel, S. Frodjo, A. Gautier-Stein, F. Rajas, L. Pirolla, G. Mithieux.
L'absence de production hépatique de glucose induit une amélioration de la sensibilité à l'insuline dans les organes périphériques.
4ème congrès de la Société Française de Nutrition, Décembre 2009, Montpellier, France
6. A. Penhoat, L. Fayard, A. Stefanutti, E. Mutel, C. Zitoun, F. Rajas, G. Mithieux.
Régulation de la glycémie chez la souris doublement invalidée pour la glucose-6 phosphatase hépatique et intestinale.
Congrès de la Société Francophone de Diabétologie, Mars 2010, Lille, France
7. S. Casteras, E. Mutel, S. Frodjo, A. Gautier-Stein, F. Rajas, L. Pirolla, G. Mithieux.
L'absence de production hépatique de glucose induit une amélioration de la sensibilité à l'insuline dans les organes périphériques.
Congrès de la Société Francophone de Diabétologie, Mars 2010, Lille, France
8. E. Mutel.
Glycogen storage disease type1a: liver pathology and gene therapy.
Séminaire doctorant de l'Institut Fédératif de Recherche 62, Mai 2010, Lyon, France.
9. N. Ramamonjisoa, H. Ratiney, F. Rajas, E. Mutel, F. Pilleul, S. Cavassila, O. Beuf.
In vivo hepatic localized proton magnetic resonance spectroscopy at 7T in a glycogen storage disease mouse model.
ISMIRM and ESMRMB joint meeting, Mai 2010, Stockholm, Suède.
10. E. Mutel, I. Houberdon, A. Stefanutti, N. Ferry, G. Mithieux, T. Nguyen, F. Rajas.
Prevention of the development of glycogen storage disease in a mouse model of liver-specific deletion of glucose-6 phosphatase, by in vivo lentiviral gene therapy.
9ème congrès de la Société Francophone de Thérapie Cellulaire et Génique, Juin 2010, Paris, France.
11. E. Mutel, A. Abdul-Wahed, F. Delaere, C. Zitoun, A. Stefanutti, I. Houberdon, A. Stein, A. Penhoat, G. Mithieux, F. Rajas.
Contrôle de la glycémie en absence de production hépatique de glucose : induction glucagon-dépendante de la néoglucogenèse extra-hépatique.
19ème réunion du GLGL, octobre 2010, Lausanne, Suisse.

➤ **COMMUNICATIONS AFFICHEES**

1. E. Mutel, A. Stefanutti, G. Mithieux, F. Rajas.
Invalidation du gène de la glucose-6-phosphatase hépatique et régulation de la glycémie.
Journée de l'Institut Fédératif de Recherche 62, Decembre 2007, Lyon, France.
2. F. Rajas, E. Mutel, A. Stefanutti, G. Mithieux.
Regulation of glycaemia in the absence of glucose production by the liver.
44th European Association for the Study of Diabetes meeting, Septembre 2008, Rome, Italie.

3. E. Mutel, A. Stefanutti, G. Mithieux, F. Rajas.

Invalidation du gène de la glucose-6-phosphatase hépatique et régulation de la glycémie.
7èmes Journées Francophones de Nutrition, Novembre 2008, Brest, France.

4. E. Mutel, A. Abdul-Wahed, F. Delaere, C. Zitoun, A. Stefanutti, I. Houberdon, A. Stein, A. Penhoat, G. Mithieux, F. Rajas.

Induction of extra-hepatic gluconeogenesis in the absence of glucose production by the liver.
70th scientific sessions of American Diabetes Association, Juin 2010, Orlando, FL, USA.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdul-Wahed, A., Mutel, E., Mithieux, G., and Rajas, F. (2009). L'absence de la production hépatique de glucose prévient le développement du diabète et de l'obésité, presented at: Congrès annuel de l'Alfediam (Strasbourg: Diabetes & Metabolism 35, Special Issue 1). ISSN: 1262-3636
- Arden, S. D., Zahn, T., Steegers, S., Webb, S., Bergman, B., O'Brien, R. M., and Hutton, J. C. (1999). Molecular cloning of a pancreatic islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein. *Diabetes* 48, 531-542
- Arion, W. J., Wallin, B. K., Lange, A. J., and Ballas, L. M. (1975). On the involvement of a glucose 6-phosphate transport system in the function of microsomal glucose 6-phosphatase. *Molecular and Cellular Biochemistry* 6, 75-83
- Ashmore, J., Hastings, A. B., Nesbett, F. B., and Renold, A. E. (1956). Studies on carbohydrate metabolism in rat liver slices. VI. Hormonal factors influencing glucose-6-phosphatase. *J Biol Chem* 218, 77-88
- Babinet, C., and Cohen-Tannoudji, M. (2000). Vingt ans d'interventions délibérées sur le génome de la souris. *médecine/sciences* 16, 31-42
- Bady, I., Zitoun, C., Guignot, L., and Mithieux, G. (2002). Activation of liver G-6-Pase in response to insulin-induced hypoglycemia or epinephrine infusion in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E905-910
- Bali, D., and Chen, Y. (2008). *Glycogen Storage Disease Type I*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2006 Apr 19 [updated 2008 Sep 02]
- Bandsma, R. H., Prinsen, B. H., van Der Velden Mde, S., Rake, J. P., Boer, T., Smit, G. P., Reijngoud, D. J., and Kuipers, F. (2008). Increased de novo lipogenesis and delayed conversion of large VLDL into intermediate density lipoprotein particles contribute to hyperlipidemia in glycogen storage disease type 1a. *Pediatr Res* 63, 702-707
- Bandsma, R. H., Rake, J. P., Visser, G., Neese, R. A., Hellerstein, M. K., van Duyvenvoorde, W., Princen, H. M., Stellaard, F., Smit, G. P., and Kuipers, F. (2002). Increased lipogenesis and resistance of lipoproteins to oxidative modification in two patients with glycogen storage disease type 1a. *J Pediatr* 140, 256-260
- Bandsma, R. H., Wiegman, C. H., Herling, A. W., Burger, H. J., ter Harmsel, A., Meijer, A. J., Romijn, J. A., Reijngoud, D. J., and Kuipers, F. (2001). Acute inhibition of glucose-6-phosphate translocator activity leads to increased de novo lipogenesis and development of hepatic steatosis without affecting VLDL production in rats. *Diabetes* 50, 2591-2597
- Bansal, P., and Wang, Q. (2008). Insulin as a physiological modulator of glucagon secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E751-761
- Beaudet, A. L., Anderson, D. C., Michels, V. V., Arion, W. J., and Lange, A. J. (1980). Neutropenia and impaired neutrophil migration in type IB glycogen storage disease. *J Pediatr* 97, 906-910
- Belingeri, M., Ghio, L., Sala, A., Menni, F., Trespidi, L., Ferrareso, M., Berardinelli, L., Rossi, G., Edefonti, A., and Parini, R. (2007). Combined liver-kidney transplantation in glycogen storage disease Ia: a case beyond the guidelines. *Liver Transpl* 13, 762-764
- Bernard, C. (1850). Sur une nouvelle fonction du foie chez l'Homme et les animaux *Compte-Rendu, Académie des Sciences Paris* 44:578-586

- Bianchi, L. (1993). Glycogen storage disease I and hepatocellular tumours. *European Journal of Pediatrics* 152, 63-70
- Bioulac-Sage, P., Balabaud, C., and Zucman-Rossi, J. (2010). Subtype classification of hepatocellular adenoma. *Dig Surg* 27, 39-45
- Bioulac-Sage, P., Blanc, J. F., Rebouissou, S., Balabaud, C., and Zucman-Rossi, J. (2007a). Genotype phenotype classification of hepatocellular adenoma. *World J Gastroenterol* 13, 2649-2654
- Bioulac-Sage, P., Laumonier, H., Couchy, G., Le Bail, B., Sa Cunha, A., Rullier, A., Laurent, C., Blanc, J. F., Cubel, G., Trillaud, H., *et al.* (2009). Hepatocellular adenoma management and phenotypic classification: the Bordeaux experience. *Hepatology* 50, 481-489
- Bioulac-Sage, P., Rebouissou, S., Thomas, C., Blanc, J. F., Saric, J., Sa Cunha, A., Rullier, A., Cubel, G., Couchy, G., Imbeaud, S., *et al.* (2007b). Hepatocellular adenoma subtype classification using molecular markers and immunohistochemistry. *Hepatology* 46, 740-748
- Bollen, M., Keppens, S., and Stalmans, W. (1998). Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochem J* 336 (Pt 1), 19-31
- Bouatia-Naji, N., Rocheleau, G., Van Lommel, L., Lemaire, K., Schuit, F., Cavalcanti-Proenca, C., Marchand, M., Hartikainen, A.-L., Sovio, U., De Graeve, F., *et al.* (2008). A Polymorphism Within the G6PC2 Gene Is Associated with Fasting Plasma Glucose Levels. *Science* 320, 1085-1088
- Bovia, F., Salmon, P., Matthes, T., Kvell, K., Nguyen, T. H., Werner-Favre, C., Barnet, M., Nagy, M., Leuba, F., Arrighi, J. F., *et al.* (2003). Efficient transduction of primary human B lymphocytes and nondividing myeloma B cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Blood* 101, 1727-1733
- Boztug, K., Appaswamy, G., Ashikov, A., SchÅœffer, A. A., Salzer, U., Diestelhorst, J., Germeshausen, M., Brandes, G., Lee-Gossler, J., Noyan, F., *et al.* (2009). A Syndrome with Congenital Neutropenia and Mutations in G6PC3. *New England Journal of Medicine* 360, 32-43
- Brix, A. E., Howerth, E. W., McConkie-Rosell, A., Peterson, D., Egnor, D., Wells, M. R., and Chen, Y. T. (1995). Glycogen storage disease type Ia in two littermate Maltese puppies. *Vet Pathol* 32, 460-465
- Bruni, N., Rajas, F., Montano, S., Chevalier-Porst, F., Maire, I., and Mithieux, G. (1999). Enzymatic characterization of four new mutations in the glucose-6 phosphatase (G6PC) gene which cause glycogen storage disease type 1a. *Ann Hum Genet* 63, 141-146
- Buning, H., Perabo, L., Coutelle, O., Quadt-Humme, S., and Hallek, M. (2008). Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *J Gene Med* 10, 717-733
- Burcelin, R., Dolci, W., and Thorens, B. (2000). Portal glucose infusion in the mouse induces hypoglycemia: evidence that the hepatoportal glucose sensor stimulates glucose utilization. *Diabetes* 49, 1635-1642
- Burcelin, R., Li, J., and Charron, M. J. (1995). Cloning and sequence analysis of the murine glucagon receptor-encoding gene. *Gene* 164, 305-310

- Burch, H. B., Narins, R. G., Chu, C., Fagioli, S., Choi, S., McCarthy, W., and Lowry, O. H. (1978). Distribution along the rat nephron of three enzymes of gluconeogenesis in acidosis and starvation. *Am J Physiol* 235, F246-253
- Cartier, N., Hacein-Bey-Abina, S., Bartholomae, C. C., Veres, G., Schmidt, M., Kutschera, I., Vidaud, M., Abel, U., Dal-Cortivo, L., Caccavelli, L., *et al.* (2009). Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* 326, 818-823
- Cassiman, D., Libbrecht, L., Verslype, C., Meersseman, W., Troisi, R., Zucman-Rossi, J., and Van Vlierberghe, H. (2010). An adult male patient with multiple adenomas and a hepatocellular carcinoma: mild glycogen storage disease type Ia. *J Hepatol* 53, 213-217
- Cavazzana-Calvo, M., Payen, E., Negre, O., Wang, G., Hehir, K., Fusil, F., Down, J., Denaro, M., Brady, T., Westerman, K., *et al.* (2010). Transfusion independence and HMGGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. *Nature* 467, 318-322
- Cersosimo, E., Garlick, P., and Ferretti, J. (1999). Renal glucose production during insulin-induced hypoglycemia in humans. *Diabetes* 48, 261-266
- Cersosimo, E., Molina, P. E., and Abumrad, N. N. (1997). Renal glucose production during insulin-induced hypoglycemia. *Diabetes* 46, 643-646
- Chakravarty, K., Cassuto, H., Reshef, L., and Hanson, R. W. (2005). Factors that control the tissue-specific transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase-C. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 40, 129-154
- Chatelain, F., Pégorier, J. P., Minassian, C., Bruni, N., Tarpin, S., Girard, J., and Mithieux, G. (1998). Development and regulation of glucose-6-phosphatase gene expression in rat liver, intestine, and kidney: in vivo and in vitro studies in cultured fetal hepatocytes. *Diabetes* 47, 882-889
- Chen, L. Y., Shieh, J. J., Lin, B., Pan, C. J., Gao, J. L., Murphy, P. M., Roe, T. F., Moses, S., Ward, J. M., Lee, E. J., *et al.* (2003). Impaired glucose homeostasis, neutrophil trafficking and function in mice lacking the glucose-6-phosphate transporter. *Hum Mol Genet* 12, 2547-2558
- Chen, S.-Y., Pan, C.-J., Nandigama, K., Mansfield, B. C., Ambudkar, S. V., and Chou, J. Y. (2008). The glucose-6-phosphate transporter is a phosphate-linked antiporter deficient in glycogen storage disease type Ib and Ic. *FASEB J* 22, 2206-2213
- Chen, Y.-T. (1991). Type I glycogen storage disease: Kidney involvement, pathogenesis and its treatment. *Pediatric Nephrology* 5, 71-76
- Chen, Y.-T., Coleman, R. A., Scheinman, J. I., Kolbeck, P. C., and Sidbury, J. B. (1988). Renal Disease in Type I Glycogen Storage Disease. *New England Journal of Medicine* 318, 7-11
- Chen, Y. T., Cornblath, M., and Sidbury, J. B. (1984). Cornstarch therapy in type I glycogen-storage disease. *N Engl J Med* 310, 171-175
- Cheung, Y. Y., Kim, S. Y., Yiu, W. H., Pan, C.-J., Jun, H.-S., Ruef, R. A., Lee, E. J., Westphal, H., Mansfield, B. C., and Chou, J. Y. (2007). Impaired neutrophil activity and increased susceptibility to bacterial infection in mice lacking glucose-6-phosphatase-beta. *The Journal of Clinical Investigation* 117, 784-793

- Chevalier-Porst, F., Bozon, D., Bonardot, A. M., Bruni, N., Mithieux, G., Mathieu, M., and Maire, I. (1996). Mutation analysis in 24 French patients with glycogen storage disease type 1a. *J Med Genet* 33, 358-360
- Chopra, A. R., Louet, J. F., Saha, P., An, J., Demayo, F., Xu, J., York, B., Karpen, S., Finegold, M., Moore, D., *et al.* (2008). Absence of the SRC-2 coactivator results in a glycogenopathy resembling Von Gierke's disease. *Science* 322, 1395-1399
- Chou, J. Y., Jun, H. S., and Mansfield, B. C. (2010). Neutropenia in type Ib glycogen storage disease. *Curr Opin Hematol* 17, 36-42
- Chou, J. Y., and Mansfield, B. C. (2007). Gene therapy for type I glycogen storage diseases. *Curr Gene Ther* 7, 79-88
- Chou, J. Y., and Mansfield, B. C. (2008). Mutations in the glucose-6-phosphatase-alpha (G6PC) gene that cause type Ia glycogen storage disease. *Hum Mutat* 29, 921-930
- Chou, J. Y., Matern, D., Mansfield, B. C., and Chen, Y. T. (2002). Type I glycogen storage diseases: disorders of the glucose-6-phosphatase complex. *Curr Mol Med* 2, 121-143
- Clore, J. N., Glickman, P. S., Nestler, J. E., and Blackard, W. G. (1991). In vivo evidence for hepatic autoregulation during FFA-stimulated gluconeogenesis in normal humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 261, E425-429
- Clore, J. N., Stillman, J., and Sugerman, H. (2000). Glucose-6-phosphatase flux in vitro is increased in type 2 diabetes. *Diabetes* 49, 969-974
- Conti, J. A., and Kemeny, N. (1992). Type Ia glycogenosis associated with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 69, 1320-1322
- Cori, G. T., and Cori, C. F. (1952). Glucose-6-phosphatase of the liver in glycogen storage disease. *J Biol Chem* 199, 661-667
- Countaway, J. L., Waddell, I. D., Burchell, A., and Arion, W. J. (1988). The phosphohydrolase component of the hepatic microsomal glucose-6-phosphatase system is a 36.5-kilodalton polypeptide. *Journal of Biological Chemistry* 263, 2673-2678
- Croniger, C., Leahy, P., Reshef, L., and Hanson, R. W. (1998). C/EBP and the Control of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Gene Transcription in the Liver. *Journal of Biological Chemistry* 273, 31629-31632
- Croset, M., Rajas, F., Zitoun, C., Hurot, J. M., Montano, S., and Mithieux, G. (2001). Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. *Diabetes* 50, 740-746
- Cunningham, S. C., Dane, A. P., Spinoulas, A., Logan, G. J., and Alexander, I. E. (2008). Gene delivery to the juvenile mouse liver using AAV2/8 vectors. *Mol Ther* 16, 1081-1088
- Dariel, A., Nguyen, T. H., Pichard, V., Schmitt, F., Aubert, D., Ferry, N., and Podevin, G. (2009). A new surgical approach to improve gene transfer in liver using lentiviral vectors. *J Pediatr Surg* 44, 517-522
- Daya, S., and Berns, K. I. (2008). Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev* 21, 583-593
- Dentin, R., Girard, J., and Postic, C. (2005). Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie* 87, 81-86

- Di Rocco, M., Calevo, M. G., Taro, M., Melis, D., Allegri, A. E., and Parenti, G. (2008). Hepatocellular adenoma and metabolic balance in patients with type Ia glycogen storage disease. *Mol Genet Metab* 93, 398-402
- Duong, D. T., Waltner-Law, M. E., Sears, R., Sealy, L., and Granner, D. K. (2002). Insulin inhibits hepatocellular glucose production by utilizing liver-enriched transcriptional inhibitory protein to disrupt the association of CREB-binding protein and RNA polymerase II with the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter. *J Biol Chem* 277, 32234-32242
- Eigler, N., Sacca, L., and Sherwin, R. S. (1979). Synergistic interactions of physiologic increments of glucagon, epinephrine, and cortisol in the dog: a model for stress-induced hyperglycemia. *J Clin Invest* 63, 114-123
- Ekberg, K., Landau, B. R., Wajngot, A., Chandramouli, V., Efendic, S., Brunengraber, H., and Wahren, J. (1999). Contributions by kidney and liver to glucose production in the postabsorptive state and after 60 h of fasting. *Diabetes* 48, 292-298
- El Marjou, F., Janssen, K.-P., Hung-Junn Chang, B., Li, M., Hindie, V., Chan, L., Louvard, D., Chambon, P., Metzger, D., and Robine, S. (2004). Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *genesis* 39, 186-193
- Feil, R., Brocard, J., Mascrez, B., LeMeur, M., Metzger, D., and Chambon, P. (1996). Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10887-10890
- Ferrari, F. K., Samulski, T., Shenk, T., and Samulski, R. J. (1996). Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol* 70, 3227-3234
- Ferry, N. (2003). [Gene therapy and liver diseases]. *Gastroenterol Clin Biol* 27, 288-290
- Field, J. B., Epstein, S., and Egan, T. (1965). Studies in Glycogen Storage Diseases. I. Intestinal Glucose-6-Phosphatase Activity in Patients with Von Gierke's Disease and Their Parents*. *The Journal of Clinical Investigation* 44, 1240-1247
- Fimia, G. M., and Sassone-Corsi, P. (2001). Cyclic AMP signalling. *J Cell Sci* 114, 1971-1972
- Fine, R. N., Kogut, M. D., and Donnell, G. N. (1969). Intestinal absorption in type I glycogen storage disease. *J Pediatr* 75, 632-635
- Flageul, M., Aubert, D., Pichard, V., Nguyen, T. H., Nowrouzi, A., Schmidt, M., and Ferry, N. (2009). Transient expression of genes delivered to newborn rat liver using recombinant adeno-associated virus 2/8 vectors. *J Gene Med* 11, 689-696
- Forsyth, R. J., Bartlett, K., Burchell, A., Scott, H. M., and Eyre, J. A. (1993). Astrocytic glucose-6-phosphatase and the permeability of brain microsomes to glucose 6-phosphate. *Biochem J* 294 (Pt 1), 145-151
- Franco, L. M., Krishnamurthy, V., Bali, D., Weinstein, D. A., Arn, P., Clary, B., Boney, A., Sullivan, J., Frush, D. P., Chen, Y. T., and Kishnani, P. S. (2005). Hepatocellular carcinoma in glycogen storage disease type Ia: a case series. *J Inherit Metab Dis* 28, 153-162
- Freed, E. O. (2001). HIV-1 Replication. *Somatic Cell and Molecular Genetics* 26, 13-33

- Fukao, T., Lopaschuk, G. D., and Mitchell, G. A. (2004). Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70, 243-251
- Gamberucci, A., Marcolongo, P., Fulceri, R., Giunti, R., Watkins, S. L., Waddell, I. D., Burchell, A., and Benedetti, A. (1996). Low levels of glucose-6-phosphate hydrolysis in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle: involvement of glucose-6-phosphatase. *Mol Membr Biol* 13, 103-108
- Gannon, M. C., and Nuttall, F. Q. (2004). Effect of a High-Protein, Low-Carbohydrate Diet on Blood Glucose Control in People With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 53, 2375-2382
- Gannon, M. C., Nuttall, F. Q., Saeed, A., Jordan, K., and Hoover, H. (2003). An increase in dietary protein improves the blood glucose response in persons with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 78, 734-741
- Garland, R. C. (1986). Induction of glucose 6-phosphatase in cultured hepatoma cells by dexamethasone. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 139, 1130-1141
- Gautier-Stein, A., Mithieux, G., and Rajas, F. (2005). A distal region involving hepatocyte nuclear factor 4 α and CAAT/enhancer binding protein markedly potentiates the protein kinase A stimulation of the glucose-6-phosphatase promoter. *Mol Endocrinol* 19, 163-174
- Gautier-Stein, A., Zitoun, C., Lalli, E., Mithieux, G., and Rajas, F. (2006). Transcriptional regulation of the glucose-6-phosphatase gene by cAMP/vasoactive intestinal peptide in the intestine. Role of HNF4 α , CREM, HNF1 α , and C/EBP α . *J Biol Chem* 281, 31268-31278
- Gerin, I., Veiga-da-Cunha, M., Achouri, Y., Collet, J. F., and Van Schaftingen, E. (1997). Sequence of a putative glucose 6-phosphate translocase, mutated in glycogen storage disease type Ib. *FEBS Lett* 419, 235-238
- Ghosh, A., Allamarvdasht, M., Pan, C. J., Sun, M. S., Mansfield, B. C., Byrne, B. J., and Chou, J. Y. (2006). Long-term correction of murine glycogen storage disease type Ia by recombinant adeno-associated virus-1-mediated gene transfer. *Gene Ther* 13, 321-329
- Ghosh, A., Shieh, J. J., Pan, C. J., Sun, M. S., and Chou, J. Y. (2002). The catalytic center of glucose-6-phosphatase. HIS176 is the nucleophile forming the phosphohistidine-enzyme intermediate during catalysis. *J Biol Chem* 277, 32837-32842
- Goncalves, M. A. (2005). Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virol J* 2, 43
- Greene, H. L., Slonim, A. E., O'Neill, J. A., Jr., and Burr, I. M. (1976). Continuous nocturnal intragastric feeding for management of type 1 glycogen-storage disease. *N Engl J Med* 294, 423-425
- Grefhorst, A., Schreurs, M., Oosterveer, M. H., Cortes, V. A., Havinga, R., Herling, A. W., Reijngoud, D. J., Groen, A. K., and Kuipers, F. (2010). Carbohydrate-response-element-binding protein (ChREBP) and not the liver X receptor alpha (LXR α) mediates elevated hepatic lipogenic gene expression in a mouse model of glycogen storage disease type 1. *Biochem J* 432, 249-254

- Grinshpun, A., Condiotti, R., Waddington, S. N., Peer, M., Zeig, E., Peretz, S., Simerzin, A., Chou, J., Pann, C. J., Giladi, H., and Galun, E. (2010). Neonatal gene therapy of glycogen storage disease type Ia using a feline immunodeficiency virus-based vector. *Mol Ther* *18*, 1592-1598
- Gustavson, S. M., Chu, C. A., Nishizawa, M., Neal, D., Farmer, B., Yang, Y., Donahue, E. P., Flakoll, P., and Cherrington, A. D. (2004). Effects of hyperglycemia, glucagon, and epinephrine on renal glucose release in the conscious dog. *Metabolism* *53*, 933-941
- Hacein-Bey-Abina, S., Garrigue, A., Wang, G. P., Soulier, J., Lim, A., Morillon, E., Clappier, E., Caccavelli, L., Delabesse, E., Beldjord, K., *et al.* (2008). Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* *118*, 3132-3142
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., *et al.* (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* *302*, 415-419
- Hall, R. K., Yamasaki, T., Kucera, T., Waltner-Law, M., O'Brien, R., and Granner, D. K. (2000). Regulation of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase and Insulin-like Growth Factor-binding Protein-1 Gene Expression by Insulin. *Journal of Biological Chemistry* *275*, 30169-30175
- Hayde, M., and Widhalm, K. (1990). Effects of cornstarch treatment in very young children with type I glycogen storage disease. *Eur J Pediatr* *149*, 630-633
- Haynes, C. M., Titus, E. A., and Cooper, A. A. (2004). Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death. *Mol Cell* *15*, 767-776
- Heller, S., Worona, L., and Consuelo, A. (2008). Nutritional therapy for glycogen storage diseases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* *47 Suppl 1*, S15-21
- Hemrika, W., and Wever, R. (1997). A new model for the membrane topology of glucose-6-phosphatase: the enzyme involved in von Gierke disease. *FEBS Lett* *409*, 317-319
- Igarashi, Y., Otomo, H., Narisawa, K., and Tada, K. (1979). A new variant of glycogen storage disease type 1: Probably due to a defect in the glucose-6-phosphate transport system. *Journal of Inherited Metabolic Disease* *2*, 45-49
- Ihara, K., Kuromaru, R., and Hara, T. (1998). Genomic structure of the human glucose 6-phosphate translocase gene and novel mutations in the gene of a Japanese patient with glycogen storage disease type Ib. *Hum Genet* *103*, 493-496
- Janecke, A. R., Bosshard, N. U., Mayatepek, E., Schulze, A., Gitzelmann, R., Burchell, A., Bartram, C. R., and Jansen, B. (1999). Molecular diagnosis of type 1c glycogen storage disease. *Human Genetics* *104*, 275-277
- Jarchum, I., Nichol, L., Trucco, M., Santamaria, P., and DiLorenzo, T. P. (2008). Identification of novel IGRP epitopes targeted in type 1 diabetes patients. *Clinical Immunology* *127*, 359-365
- Jiang, G., and Zhang, B. B. (2003). Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *284*, E671-678
- Jun, H. S., Lee, Y. M., Cheung, Y. Y., McDermott, D. H., Murphy, P. M., De Ravin, S. S., Mansfield, B. C., and Chou, J. Y. (2010). Lack of glucose recycling between endoplasmic reticulum and cytoplasm underlies cellular dysfunction in glucose-6-phosphatase- β -deficient neutrophils in a congenital neutropenia syndrome. *Blood* *116*, 2783-2792

- Kallwellis-Opara, A., Zaho, X., Zimmermann, U., Unterman, T. G., Walther, R., and Schmoll, D. (2003). Characterization of cis-elements mediating the stimulation of glucose-6-phosphate transporter promoter activity by glucocorticoids. *Gene* 320, 59-66
- Kehlenbrink, S., Tonelli, J., Koppaka, S., Chandramouli, V., Hawkins, M., and Kishore, P. (2009). Inhibiting gluconeogenesis prevents fatty acid-induced increases in endogenous glucose production. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297, E165-173
- Khan, A., Hong-Lie, C., and Landau, B. R. (1995). Glucose-6-phosphatase activity in islets from ob/ob and lean mice and the effect of dexamethasone. *Endocrinology* 136, 1934-1938
- Kida, K., Nakajo, S., Kamiya, F., Toyama, Y., Nishio, T., and Nakagawa, H. (1978). Renal net glucose release in vivo and its contribution to blood glucose in rats. *J Clin Invest* 62, 721-726
- Kim, S. Y., Jun, H. S., Mead, P. A., Mansfield, B. C., and Chou, J. Y. (2008). Neutrophil stress and apoptosis underlie myeloid dysfunction in glycogen storage disease type Ib. *Blood* 111, 5704-5711
- Kishnani, P. S., Bao, Y., Wu, J. Y., Brix, A. E., Lin, J. L., and Chen, Y. T. (1997). Isolation and nucleotide sequence of canine glucose-6-phosphatase mRNA: identification of mutation in puppies with glycogen storage disease type Ia. *Biochem Mol Med* 61, 168-177
- Kishnani, P. S., Chuang, T. P., Bali, D., Koeberl, D., Austin, S., Weinstein, D. A., Murphy, E., Chen, Y. T., Boyette, K., Liu, C. H., *et al.* (2009). Chromosomal and genetic alterations in human hepatocellular adenomas associated with type Ia glycogen storage disease. *Hum Mol Genet* 18, 4781-4790
- Kishnani, P. S., Faulkner, E., VanCamp, S., Jackson, M., Brown, T., Boney, A., Koeberl, D., and Chen, Y. T. (2001). Canine model and genomic structural organization of glycogen storage disease type Ia (GSD Ia). *Vet Pathol* 38, 83-91
- Koeberl, D. D., Kishnani, P. S., and Chen, Y. T. (2007). Glycogen storage disease types I and II: treatment updates. *J Inher Metab Dis* 30, 159-164
- Koeberl, D. D., Pinto, C., Sun, B., Li, S., Kozink, D. M., Benjamin, D. K., Jr., Demaster, A. K., Kruse, M. A., Vaughn, V., Hillman, S., *et al.* (2008). AAV vector-mediated reversal of hypoglycemia in canine and murine glycogen storage disease type Ia. *Mol Ther* 16, 665-672
- Koeberl, D. D., Sun, B. D., Damodaran, T. V., Brown, T., Millington, D. S., Benjamin, D. K., Bird, A., Schneider, A., Hillman, S., Jackson, M., *et al.* (2006). Early, sustained efficacy of adeno-associated virus vector-mediated gene therapy in glycogen storage disease type Ia. *Gene Ther* 13, 1281-1289
- Korin, Y. D., and Zack, J. A. (1998). Progression to the G1b phase of the cell cycle is required for completion of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription in T cells. *J Virol* 72, 3161-3168
- Kuijpers, T. W., Maianski, N. A., Tool, A. T., Smit, G. P., Rake, J. P., Roos, D., and Visser, G. (2003). Apoptotic neutrophils in the circulation of patients with glycogen storage disease type 1b (GSD1b). *Blood* 101, 5021-5024
- Labrune, P. (2002). Glycogen storage disease type I: indications for liver and/or kidney transplantation. *Eur J Pediatr* 161 Suppl 1, S53-55

- Lam, T. K., van de Werve, G., and Giacca, A. (2003). Free fatty acids increase basal hepatic glucose production and induce hepatic insulin resistance at different sites. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284, E281-290
- Lam, T. K. T., Yoshii, H., Haber, C. A., Bogdanovic, E., Lam, L., Fantus, I. G., and Giacca, A. (2002). Free fatty acid-induced hepatic insulin resistance: a potential role for protein kinase C-delta. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283, E682-691
- Lange, A. J., Argaud, D., el-Maghrabi, M. R., Pan, W., Maitra, S. R., and Pilkis, S. J. (1994). Isolation of a cDNA for the catalytic subunit of rat liver glucose-6-phosphatase: regulation of gene expression in FAO hepatoma cells by insulin, dexamethasone and cAMP. *Biochem Biophys Res Commun* 201, 302-309
- Lee, P. (2002). Glycogen storage disease type I: pathophysiology of liver adenomas. *European Journal of Pediatrics* 161, S46-S49
- Lei, K. J., Chen, H., Pan, C. J., Ward, J. M., Mosinger, B., Jr., Lee, E. J., Westphal, H., Mansfield, B. C., and Chou, J. Y. (1996). Glucose-6-phosphatase dependent substrate transport in the glycogen storage disease type-1a mouse. *Nat Genet* 13, 203-209
- Lei, K. J., Chen, Y. T., Chen, H., Wong, L. J., Liu, J. L., McConkie-Rosell, A., Van Hove, J. L., Ou, H. C., Yeh, N. J., Pan, L. Y., and et al. (1995). Genetic basis of glycogen storage disease type 1a: prevalent mutations at the glucose-6-phosphatase locus. *Am J Hum Genet* 57, 766-771
- Lei, K. J., Shelly, L. L., Pan, C. J., Sidbury, J. B., and Chou, J. Y. (1993). Mutations in the glucose-6-phosphatase gene that cause glycogen storage disease type 1a. *Science* 262, 580-583
- Lewis, P., Hensel, M., and Emerman, M. (1992). Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *Embo J* 11, 3053-3058
- Limmer, J., Fleig, W. E., Leupold, D., Bittner, R., Ditschuneit, H., and Beger, H. G. (1988). Hepatocellular carcinoma in type I glycogen storage disease. *Hepatology* 8, 531-537
- Lin, B., Annabi, B., Hiraiwa, H., Pan, C. J., and Chou, J. Y. (1998a). Cloning and characterization of cDNAs encoding a candidate glycogen storage disease type 1b protein in rodents. *J Biol Chem* 273, 31656-31660
- Lin, B., Morris, D. W., and Chou, J. Y. (1998b). Hepatocyte nuclear factor 1alpha is an accessory factor required for activation of glucose-6-phosphatase gene transcription by glucocorticoids. *DNA Cell Biol* 17, 967-974
- Magnusson, I., Rothman, D. L., Katz, L. D., Shulman, R. G., and Shulman, G. I. (1992). Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A ¹³C nuclear magnetic resonance study. *J Clin Invest* 90, 1323-1327
- Mallet, V. O., Regimbeau, J. M., Mitchell, C., Guidotti, J. E., Soubrane, O., and Gilgenkrantz, H. (2002). [Liver repopulation: the selective advantage concept]. *Gastroenterol Clin Biol* 26, 480-485
- Manno, C. S., Pierce, G. F., Arruda, V. R., Glader, B., Ragni, M., Rasko, J. J., Ozelo, M. C., Hoots, K., Blatt, P., Konkle, B., et al. (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* 12, 342-347

- Martin, C. C., Bischof, L. J., Bergman, B., Hornbuckle, L. A., Hilliker, C., Frigeri, C., Wahl, D., Svitek, C. A., Wong, R., Goldman, J. K., *et al.* (2001). Cloning and Characterization of the Human and Rat Islet-specific Glucose-6-phosphatase Catalytic Subunit-related Protein (IGRP) Genes. *Journal of Biological Chemistry* 276, 25197-25207
- Martin, C. C., Oeser, J. K., Svitek, C. A., Hunter, S. I., Hutton, J. C., and O'Brien, R. M. (2002). Identification and characterization of a human cDNA and gene encoding a ubiquitously expressed glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein. *J Mol Endocrinol* 29, 205-222
- Massillon, D., Barzilai, N., Hawkins, M., Prus-Wertheimer, D., and Rossetti, L. (1997). Induction of hepatic glucose-6-phosphatase gene expression by lipid infusion. *Diabetes* 46, 153-157
- Matern, D., Starzl, T. E., Arnaout, W., Barnard, J., Bynon, J. S., Dhawan, A., Emond, J., Haagsma, E. B., Hug, G., Lachaux, A., *et al.* (1999). Liver transplantation for glycogen storage disease types I, III, and IV. *Eur J Pediatr* 158 Suppl 2, S43-48
- McAdams, A. J., Hug, G., and Bove, K. E. (1974). Glycogen storage disease, types I to X: criteria for morphologic diagnosis. *Hum Pathol* 5, 463-487
- McCarty, D. M. (2008). Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol Ther* 16, 1648-1656
- McDermott, D. H., De Ravin, S. S., Jun, H. S., Liu, Q., Long Priel, D. A., Noel, P., Takemoto, C. M., Ojode, T., Paul, S. M., Dunsmore, K. P., *et al.* (2010). Severe congenital neutropenia due to G6PC3 deficiency with increased neutrophil CXCR4 expression and myelokathexis. *Blood*, blood-2010-2001-265942
- McGuinness, O. P., Burgin, K., Moran, C., Bracy, D., and Cherrington, A. D. (1994). Role of glucagon in the metabolic response to stress hormone infusion in the conscious dog. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 266, E438-447
- McGuinness, O. P., Fugiwara, T., Murrell, S., Bracy, D., Neal, D., O'Connor, D., and Cherrington, A. D. (1993). Impact of chronic stress hormone infusion on hepatic carbohydrate metabolism in the conscious dog. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 265, E314-322
- McGuinness, O. P., Shau, V., Benson, E. M., Lewis, M., Snowden, R. T., Greene, J. E., Neal, D. W., and Cherrington, A. D. (1997). Role of epinephrine and norepinephrine in the metabolic response to stress hormone infusion in the conscious dog. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 273, E674-681
- Meyer, C., Stumvoll, M., Dostou, J., Welle, S., Haymond, M., and Gerich, J. (2002). Renal substrate exchange and gluconeogenesis in normal postabsorptive humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282, E428-434
- Mezzano, S. A., Ruiz-Ortega, M., and Egido, J. (2001). Angiotensin II and Renal Fibrosis. *Hypertension* 38, 635-638
- Milla, P. J., Atherton, D. A., Leonard, J. V., Wolff, O. H., and Lake, B. D. (1978). Disordered intestinal function in glycogen storage disease. *J Inherit Metab Dis* 1, 155-157

- Minassian, C., Zitoun, C., and Mithieux, G. (1996). Differential time course of liver and kidney glucose-6 phosphatase activity during long-term fasting in rat correlates with differential time course of messenger RNA level. *Mol Cell Biochem* 155, 37-41
- Mithieux, G. (1997). New knowledge regarding glucose-6 phosphatase gene and protein and their roles in the regulation of glucose metabolism. *Eur J Endocrinol* 136, 137-145
- Mithieux, G., Ajzannay, A., and Minassian, C. (1995). Identification of Membrane-Bound Phosphoglucomutase and Glucose-6 Phosphatase by ³²P-Labeling of Rat Liver Microsomal Membrane Proteins with ³²P-Glucose-6 Phosphate. *Journal of Biochemistry* 117, 908-914
- Mithieux, G., Bady, I., Gautier, A., Croset, M., Rajas, F., and Zitoun, C. (2004a). Induction of control genes in intestinal gluconeogenesis is sequential during fasting and maximal in diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286, E370-375
- Mithieux, G., Gautier-Stein, A., Rajas, F., and Zitoun, C. (2006). Contribution of intestine and kidney to glucose fluxes in different nutritional states in rat. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 143, 195-200
- Mithieux, G., Misery, P., Magnan, C., Pillot, B., Gautier-Stein, A., Bernard, C., Rajas, F., and Zitoun, C. (2005). Portal sensing of intestinal gluconeogenesis is a mechanistic link in the diminution of food intake induced by diet protein. *Cell Metab* 2, 321-329
- Mithieux, G., Rajas, F., and Gautier-Stein, A. (2004b). A novel role for glucose 6-phosphatase in the small intestine in the control of glucose homeostasis. *J Biol Chem* 279, 44231-44234
- Mithieux, G., Vidal, H., Zitoun, C., Bruni, N., Daniele, N., and Minassian, C. (1996). Glucose-6-phosphatase mRNA and activity are increased to the same extent in kidney and liver of diabetic rats. *Diabetes* 45, 891-896
- Mitro, N., Mak, P. A., Vargas, L., Godio, C., Hampton, E., Molteni, V., Kreuzsch, A., and Saez, E. (2007). The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* 445, 219-223
- Montini, E., Cesana, D., Schmidt, M., Sanvito, F., Bartholomae, C. C., Ranzani, M., Benedicenti, F., Sergi, L. S., Ambrosi, A., Ponzoni, M., *et al.* (2009). The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy. *The Journal of Clinical Investigation* 119, 964-975
- Moses, S. (2002). Historical highlights and unsolved problems in glycogen storage disease type 1. *European Journal of Pediatrics* 161, S2-S9
- Mounier, C., and Posner, B. I. (2006). Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene. *Can J Physiol Pharmacol* 84, 713-724
- Mutel, E., Abdul-Wahed, A., Ramamonjisoa, N., Stefanutti, A., Houberdon, I., Cavassila, S., Pilleul, F., Beuf, O., Gautier-Stein, A., Penhoat, A., *et al.* (in press). Targeted deletion of liver glucose-6 phosphatase mimics glycogen storage disease type 1a including development of multiple adenomas. *J Hepatol*
- Nagl, S., Mayer, W. E., and Klein, J. (1999). Isolation and sequencing of cDNA clones coding for the catalytic unit of glucose-6-phosphatase from two haplochromine cichlid fishes. *DNA Seq* 10, 25-29
- Nagy, A. (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26, 99-109

- Nakai, H., Storm, T. A., and Kay, M. A. (2000). Recruitment of single-stranded recombinant adeno-associated virus vector genomes and intermolecular recombination are responsible for stable transduction of liver in vivo. *J Virol* 74, 9451-9463
- Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M., and Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263-267
- Narisawa, K., Igarashi, Y., Otomo, H., and Tada, K. (1978). A new variant of glycogen storage disease type I probably due to a defect in the glucose-6-phosphate transport system. *Biochem Biophys Res Commun* 83, 1360-1364
- Nguyen, T. H., Bellodi-Privato, M., Aubert, D., Pichard, V., Myara, A., Trono, D., and Ferry, N. (2005). Therapeutic lentivirus-mediated neonatal in vivo gene therapy in hyperbilirubinemic Gunn rats. *Mol Ther* 12, 852-859
- Nguyen, T. H., and Ferry, N. (2004). Liver gene therapy: advances and hurdles. *Gene Ther* 11 Suppl 1, S76-84
- Nguyen, T. H., Oberholzer, J., Birraux, J., Majno, P., Morel, P., and Trono, D. (2002). Highly efficient lentiviral vector-mediated transduction of nondividing, fully reimplantable primary hepatocytes. *Mol Ther* 6, 199-209
- Nonogaki, K. (2000). New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia* 43, 533-549
- Nordlie, R. C., Arion, W. J., and Glende, E. A. (1965). Liver Microsomal Glucose 6-Phosphatase, Inorganic Pyrophosphatase, and Pyrophosphate-Glucose Phosphotransferase. *Journal of Biological Chemistry* 240, 3479-3484
- Nordlie, R. C., Foster, J. D., and Lange, A. J. (1999). Regulation of glucose production by the liver. *Annu Rev Nutr* 19, 379-406
- Nuttall, F., and Gannon, M. (2004). Metabolic response of people with type 2 diabetes to a high protein diet. *Nutrition & Metabolism* 1, 6
- Ockner, R. K., Kaikaus, R. M., and Bass, N. M. (1993). Fatty-acid metabolism and the pathogenesis of hepatocellular carcinoma: review and hypothesis. *Hepatology* 18, 669-676
- Opherk, C., Tronche, F., Kellendonk, C., Kohlmuller, D., Schulze, A., Schmid, W., and Schutz, G. (2004). Inactivation of the glucocorticoid receptor in hepatocytes leads to fasting hypoglycemia and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Mol Endocrinol* 18, 1346-1353
- Owen, O. E., Felig, P., Morgan, A. P., Wahren, J., and Cahill, G. F. (1969). Liver and kidney metabolism during prolonged starvation. *The Journal of Clinical Investigation* 48, 574-583
- Ozen, H. (2007). Glycogen storage diseases: new perspectives. *World J Gastroenterol* 13, 2541-2553
- Pan, C. J., Lei, K. J., Annabi, B., Hemrika, W., and Chou, J. Y. (1998). Transmembrane topology of glucose-6-phosphatase. *J Biol Chem* 273, 6144-6148
- Pan, C. J., Lin, B., and Chou, J. Y. (1999). Transmembrane topology of human glucose 6-phosphate transporter. *J Biol Chem* 274, 13865-13869

- Park, F., Ohashi, K., Chiu, W., Naldini, L., and Kay, M. A. (2000). Efficient lentiviral transduction of liver requires cell cycling in vivo. *Nat Genet* 24, 49-52
- Parker, P., Burr, I., Slonim, A., Ghishan, F. K., and Greene, H. (1981). Regression of hepatic adenomas in type Ia glycogen storage disease with dietary therapy. *Gastroenterology* 81, 534-536
- Penhoat, A., Stefanutti, A., Rajas, F., and Mithieux, G. (2009). Role crucial de la néoglucogénèse intestinale dans le contrôle de l'homéostasie glucidique et énergétique, presented at: Congrès annuel de l'Alfediam (Strasbourg: Diabetes & Metabolism 35, Special Issue 1). ISSN: 1262-3636
- Petersen, K. F., Laurent, D., Rothman, D. L., Cline, G. W., and Shulman, G. I. (1998). Mechanism by which glucose and insulin inhibit net hepatic glycogenolysis in humans. *J Clin Invest* 101, 1203-1209
- Pfeifer, A., Kessler, T., Yang, M., Baranov, E., Kootstra, N., Cheresch, D. A., Hoffman, R. M., and Verma, I. M. (2001). Transduction of liver cells by lentiviral vectors: analysis in living animals by fluorescence imaging. *Mol Ther* 3, 319-322
- Pillot, B., Soty, M., Gautier-Stein, A., Zitoun, C., and Mithieux, G. (2009). Protein feeding promotes redistribution of endogenous glucose production to the kidney and potentiates its suppression by insulin. *Endocrinology* 150, 616-624
- Portha, B., Giroix, M. H., Serradas, P., Gangnerau, M. N., Movassat, J., Rajas, F., Bailbe, D., Plachot, C., Mithieux, G., and Marie, J. C. (2001). beta-cell function and viability in the spontaneously diabetic GK rat: information from the GK/Par colony. *Diabetes* 50 Suppl 1, S89-93
- Postic, C., and Girard, J. (2008). The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes Metab* 34, 643-648
- Previs, S. F., Brunengraber, D. Z., and Brunengraber, H. (2009). Is there glucose production outside of the liver and kidney? *Annu Rev Nutr* 29, 43-57
- Rajas, F., Bruni, N., Montano, S., Zitoun, C., and Mithieux, G. (1999). The glucose-6 phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: regulation of expression in fasted and diabetic rats. *Gastroenterology* 117, 132-139
- Rajas, F., Gautier, A., Bady, I., Montano, S., and Mithieux, G. (2002). Polyunsaturated fatty acyl coenzyme A suppress the glucose-6-phosphatase promoter activity by modulating the DNA binding of hepatocyte nuclear factor 4 alpha. *J Biol Chem* 277, 15736-15744
- Rajas, F., Jourdan-Pineau, H., Stefanutti, A., Mrad, E., Iynedjian, P., and Mithieux, G. (2007). Immunocytochemical localization of glucose 6-phosphatase and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in gluconeogenic tissues reveals unsuspected metabolic zonation. *Histochemistry and Cell Biology* 127, 555-565
- Rake, J. P., Visser, G., Labrune, P., Leonard, J. V., Ullrich, K., and Smit, G. P. (2002). Glycogen storage disease type I: diagnosis, management, clinical course and outcome. Results of the European Study on Glycogen Storage Disease Type I (ESGSD I). *Eur J Pediatr* 161 Suppl 1, S20-34

- Rebouissou, S., Amessou, M., Couchy, G., Poussin, K., Imbeaud, S., Pilati, C., Izard, T., Balabaud, C., Bioulac-Sage, P., and Zucman-Rossi, J. (2009). Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours. *Nature* 457, 200-204
- Rebouissou, S., Bioulac-Sage, P., and Zucman-Rossi, J. (2008). Molecular pathogenesis of focal nodular hyperplasia and hepatocellular adenoma. *J Hepatol* 48, 163-170
- Rebrin, K., Steil, G. M., Mittelman, S. D., and Bergman, R. N. (1996). Causal linkage between insulin suppression of lipolysis and suppression of liver glucose output in dogs. *J Clin Invest* 98, 741-749
- Reddy, S. K., Kishnani, P. S., Sullivan, J. A., Koeberl, D. D., Desai, D. M., Skinner, M. A., Rice, H. E., and Clary, B. M. (2007). Resection of hepatocellular adenoma in patients with glycogen storage disease type Ia. *J Hepatol* 47, 658-663
- Restaino, I., Kaplan, B. S., Stanley, C., and Baker, L. (1993). Nephrolithiasis, hypocitraturia, and a distal renal tubular acidification defect in type 1 glycogen storage disease. *J Pediatr* 122, 392-396
- Roden, M., Stingl, H., Chandramouli, V., Schumann, W. C., Hofer, A., Landau, B. R., Nowotny, P., Waldhausl, W., and Shulman, G. I. (2000). Effects of free fatty acid elevation on postabsorptive endogenous glucose production and gluconeogenesis in humans. *Diabetes* 49, 701-707
- Roesler, W. J. (2000). At the Cutting Edge What is a cAMP response unit? *Molecular and Cellular Endocrinology* 162, 1-7
- Rossetti, L., Giaccari, A., Barzilai, N., Howard, K., Sebel, G., and Hu, M. (1993). Mechanism by which hyperglycemia inhibits hepatic glucose production in conscious rats. Implications for the pathophysiology of fasting hyperglycemia in diabetes. *J Clin Invest* 92, 1126-1134
- Salganik, S. V., Weinstein, D. A., Shupe, T. D., Salganik, M., Pintilie, D. G., and Petersen, B. E. (2009). A detailed characterization of the adult mouse model of glycogen storage disease Ia. *Lab Invest* 89, 1032-1042
- Schmitt, F., Flageul, M., Dariel, A., Pichard, V., Pontes, C. A., Boni, S., Podevin, G., Myara, A., Ferry, N., and Nguyen, T. H. (2010). Transient increase in intrahepatic pressure mediates successful treatment of the Gunn rat with reduced doses of lentiviral vector. *Hum Gene Ther* 21, 1349-1356
- Schmoll, D., Allan, B. B., and Burchell, A. (1996). Cloning and sequencing of the 5' region of the human glucose-6-phosphatase gene: transcriptional regulation by cAMP, insulin and glucocorticoids in H4IIE hepatoma cells. *FEBS Letters* 383, 63-66
- Schmoll, D., Wasner, C., Hinds, C. J., Allan, B. B., Walther, R., and Burchell, A. (1999). Identification of a cAMP response element within the glucose- 6-phosphatase hydrolytic subunit gene promoter which is involved in the transcriptional regulation by cAMP and glucocorticoids in H4IIE hepatoma cells. *Biochem J* 338 (Pt 2), 457-463
- Schuler, M., Dierich, A., Chambon, P., and Metzger, D. (2004). Efficient temporally controlled targeted somatic mutagenesis in hepatocytes of the mouse. *Genesis* 39, 167-172
- Seydewitz, H. H., and Matern, D. (2000). Molecular genetic analysis of 40 patients with glycogen storage disease type Ia: 100% mutation detection rate and 5 novel mutations. *Hum Mutat* 15, 115-116

- Shelly, L. L., Lei, K. J., Pan, C. J., Sakata, S. F., Ruppert, S., Schutz, G., and Chou, J. Y. (1993). Isolation of the gene for murine glucose-6-phosphatase, the enzyme deficient in glycogen storage disease type 1A. *J Biol Chem* 268, 21482-21485
- Shieh, J.-J., Pan, C.-J., Mansfield, B. C., and Chou, J. Y. (2003). A Glucose-6-phosphate Hydrolase, Widely Expressed Outside the Liver, Can Explain Age-dependent Resolution of Hypoglycemia in Glycogen Storage Disease Type 1a. *Journal of Biological Chemistry* 278, 47098-47103
- Shulman, G. I., Liljenquist, J. E., Williams, P. E., Lacy, W. W., and Cherrington, A. D. (1978). Glucose Disposal during Insulinopenia in Somatostatin-Treated Dogs :THE ROLES OF GLUCOSE AND GLUCAGON. *The Journal of Clinical Investigation* 62, 487-491
- Simonelli, F., Maguire, A. M., Testa, F., Pierce, E. A., Mingozi, F., Bennicelli, J. L., Rossi, S., Marshall, K., Banfi, S., Surace, E. M., *et al.* (2010). Gene therapy for Leber's congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration. *Mol Ther* 18, 643-650
- Stafford, J. M., Wilkinson, J. C., Beechem, J. M., and Granner, D. K. (2001). Accessory factors facilitate the binding of glucocorticoid receptor to the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter. *J Biol Chem* 276, 39885-39891
- Stumpel, F., Burcelin, R., Jungermann, K., and Thorens, B. (2001). Normal kinetics of intestinal glucose absorption in the absence of GLUT2: evidence for a transport pathway requiring glucose phosphorylation and transfer into the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11330-11335
- Stumvoll, M., Meyer, C., Perriello, G., Kreider, M., Welle, S., and Gerich, J. (1998). Human kidney and liver gluconeogenesis: evidence for organ substrate selectivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 274, E817-826
- Sun, B., Li, S., Yang, L., Damodaran, T., Desai, D., Diehl, A. M., Alzate, O., and Koeberl, D. D. (2009). Activation of glycolysis and apoptosis in glycogen storage disease type 1a. *Mol Genet Metab* 97, 267-271
- Sun, M. S., Pan, C. J., Shieh, J. J., Ghosh, A., Chen, L. Y., Mansfield, B. C., Ward, J. M., Byrne, B. J., and Chou, J. Y. (2002a). Sustained hepatic and renal glucose-6-phosphatase expression corrects glycogen storage disease type 1a in mice. *Hum Mol Genet* 11, 2155-2164
- Sun, Y., Liu, S., Ferguson, S., Wang, L., Klepcyk, P., Yun, J. S., and Friedman, J. E. (2002b). Phosphoenolpyruvate carboxykinase overexpression selectively attenuates insulin signaling and hepatic insulin sensitivity in transgenic mice. *J Biol Chem* 277, 23301-23307
- Takaki, T., Marron, M. P., Mathews, C. E., Guttmann, S. T., Bottino, R., Trucco, M., DiLorenzo, T. P., and Serreze, D. V. (2006). HLA-A*0201-Restricted T Cells from Humanized NOD Mice Recognize Autoantigens of Potential Clinical Relevance to Type 1 Diabetes. *J Immunol* 176, 3257-3265
- Talente, G. M., Coleman, R. A., Alter, C., Baker, L., Brown, B. I., Cannon, R. A., Chen, Y. T., Crigler, J. F., Jr., Ferreira, P., Haworth, J. C., *et al.* (1994). Glycogen storage disease in adults. *Ann Intern Med* 120, 218-226
- Tam, C. H., Ho, J. S., Wang, Y., Lee, H. M., Lam, V. K., Germer, S., Martin, M., So, W. Y., Ma, R. C., Chan, J. C., and Ng, M. C. (2010). Common polymorphisms in MTNR1B, G6PC2 and GCK

- are associated with increased fasting plasma glucose and impaired beta-cell function in Chinese subjects. *PLoS One* 5, e11428
- Tang, E. D., Nunez, G., Barr, F. G., and Guan, K. L. (1999). Negative regulation of the forkhead transcription factor FKHR by Akt. *J Biol Chem* 274, 16741-16746
- Taylor, L., and Curthoys, N. P. (2004). Glutamine metabolism: Role in acid-base balance*. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 32, 291-304
- Thiel, G., Al Sarraj, J., and Stefano, L. (2005). cAMP response element binding protein (CREB) activates transcription via two distinct genetic elements of the human glucose-6-phosphatase gene. *BMC Mol Biol* 6, 2
- Thorens, B., and Larsen, P. J. (2004). Gut-derived signaling molecules and vagal afferents in the control of glucose and energy homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7, 471-478
- Tordoff, M. G., and Friedman, M. I. (1986). Hepatic portal glucose infusions decrease food intake and increase food preference. *Am J Physiol* 251, R192-196
- Trinh, K. Y., O'Doherty, R. M., Anderson, P., Lange, A. J., and Newgard, C. B. (1998). Perturbation of fuel homeostasis caused by overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in liver of normal rats. *J Biol Chem* 273, 31615-31620
- Troy, S., Soty, M., Ribeiro, L., Laval, L., Migrenne, S., Fioramonti, X., Pillot, B., Fauveau, V., Aubert, R., Viollet, B., *et al.* (2008). Intestinal gluconeogenesis is a key factor for early metabolic changes after gastric bypass but not after gastric lap-band in mice. *Cell Metab* 8, 201-211
- van Schaftingen, E., and Gerin, I. (2002). The glucose-6-phosphatase system. *Biochem J* 362, 513-532
- Vander Kooi, B. T., Onuma, H., Oeser, J. K., Svitek, C. A., Allen, S. R., Vander Kooi, C. W., Chazin, W. J., and O'Brien, R. M. (2005). The Glucose-6-Phosphatase Catalytic Subunit Gene Promoter Contains Both Positive and Negative Glucocorticoid Response Elements. *Mol Endocrinol* 19, 3001-3022
- Vander Kooi, B. T., Streeper, R. S., Svitek, C. A., Oeser, J. K., Powell, D. R., and O'Brien, R. M. (2003). The Three Insulin Response Sequences in the Glucose-6-phosphatase Catalytic Subunit Gene Promoter Are Functionally Distinct. *Journal of Biological Chemistry* 278, 11782-11793
- Vasileva, A., and Jessberger, R. (2005). Precise hit: adeno-associated virus in gene targeting. *Nat Rev Micro* 3, 837-847
- Veiga-da-Cunha, M., Gerin, I., Chen, Y.-T., de Barsy, T., de Lonlay, P., Dionisi-Vici, C., Fenske, C. D., Lee, P. J., Leonard, J. V., Maire, I., *et al.* (1998). A Gene on Chromosome 11q23 Coding for a Putative Glucose- 6-Phosphate Translocase Is Mutated in Glycogen-Storage Disease Types Ib and Ic. *The American Journal of Human Genetics* 63, 976-983
- Veiga-da-Cunha, M., Gerin, I., Chen, Y. T., Lee, P. J., Leonard, J. V., Maire, I., Wendel, U., Vikkula, M., and Van Schaftingen, E. (1999). The putative glucose 6-phosphate translocase gene is mutated in essentially all cases of glycogen storage disease type I non-a. *Eur J Hum Genet* 7, 717-723

- Visser, G., Rake, J., Labrune, P., Leonard, J., Moses, S., Ullrich, K., Wendel, U., Groenier, K., and Smit, P. (2002a). Granulocyte colony-stimulating factor in glycogen storage disease type 1b. Results of the European Study on Glycogen Storage Disease Type 1. *European Journal of Pediatrics* *161*, S83-S87
- Visser, G., Rake, J. P., Fernandes, J., Labrune, P., Leonard, J. V., Moses, S., Ullrich, K., and Smit, G. P. (2000). Neutropenia, neutrophil dysfunction, and inflammatory bowel disease in glycogen storage disease type 1b: results of the European Study on Glycogen Storage Disease type 1. *J Pediatr* *137*, 187-191
- Visser, G., Rake, J. P., Kokke, F. T., Nikkels, P. G., Sauer, P. J., and Smit, G. P. (2002b). Intestinal function in glycogen storage disease type 1. *J Inherit Metab Dis* *25*, 261-267
- Wahren, J., and Ekberg, K. (2007). Splanchnic regulation of glucose production. *Annu Rev Nutr* *27*, 329-345
- Wang, J., Xie, J., Lu, H., Chen, L., Hauck, B., Samulski, R. J., and Xiao, W. (2007). Existence of transient functional double-stranded DNA intermediates during recombinant AAV transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 13104-13109
- Wang, Y., Inoue, H., Ravnskjaer, K., Viste, K., Miller, N., Liu, Y., Hedrick, S., Vera, L., and Montminy, M. (2010). Targeted disruption of the CREB coactivator *Crtc2* increases insulin sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *107*, 3087-3092
- Wang, Y., Oeser, J. K., Yang, C., Sarkar, S., Hackl, S. I., Hasty, A. H., McGuinness, O. P., Paradee, W., Hutton, J. C., Powell, D. R., and O'Brien, R. M. (2006). Deletion of the Gene Encoding the Ubiquitously Expressed Glucose-6-phosphatase Catalytic Subunit-related Protein (UGRP)/Glucose-6-phosphatase Catalytic Subunit-beta Results in Lowered Plasma Cholesterol and Elevated Glucagon. *Journal of Biological Chemistry* *281*, 39982-39989
- Watford, M. (2005). Is the small intestine a gluconeogenic organ. *Nutr Rev* *63*, 356-360
- Weinstein, D. A., Correia, C. E., Conlon, T., Specht, A., Verstegen, J., Onclin-Verstegen, K., Campbell-Thompson, M., Dhaliwal, G., Mirian, L., Cossette, H., *et al.* (2010). Adeno-associated virus-mediated correction of a canine model of glycogen storage disease type 1a. *Hum Gene Ther* *21*, 903-910
- Weinstein, D. A., Somers, M. J. G., and Wolfsdorf, J. I. (2001). Decreased urinary citrate excretion in type 1a glycogen storage disease. *The Journal of Pediatrics* *138*, 378-382
- Wilson, J. M. (2001). Adenovirus-mediated gene transfer to liver. *Advanced Drug Delivery Reviews* *46*, 205-209
- Wolf, G. (2006). Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-[beta] pathway. *Kidney Int* *70*, 1914-1919
- Wolfsdorf, J. I., and Weinstein, D. A. (2003). Glycogen storage diseases. *Rev Endocr Metab Disord* *4*, 95-102
- Wong, G. K. Y., and Chiu, A. T. (2010). Gene therapy, gene targeting and induced pluripotent stem cells: Applications in monogenic disease treatment. *Biotechnology Advances* *28*, 715-724
- Xu, L., Gao, C., Sands, M. S., Cai, S. R., Nichols, T. C., Bellinger, D. A., Raymer, R. A., McCorquodale, S., and Ponder, K. P. (2003). Neonatal or hepatocyte growth factor-

- potentiated adult gene therapy with a retroviral vector results in therapeutic levels of canine factor IX for hemophilia B. *Blood* *101*, 3924-3932
- Yabaluri, N., and Bashyam, M. D. (2010). Hormonal regulation of gluconeogenic gene transcription in the liver. *J Biosci* *35*, 473-484
- Yiu, W. H., Lee, Y. M., Peng, W. T., Pan, C. J., Mead, P. A., Mansfield, B. C., and Chou, J. Y. (2010a). Complete normalization of hepatic G6PC deficiency in murine glycogen storage disease type Ia using gene therapy. *Mol Ther* *18*, 1076-1084
- Yiu, W. H., Mead, P. A., Jun, H. S., Mansfield, B. C., and Chou, J. Y. (2010b). Oxidative stress mediates nephropathy in type Ia glycogen storage disease. *Lab Invest* *90*, 620-629
- Yiu, W. H., Pan, C. J., Mead, P. A., Starost, M. F., Mansfield, B. C., and Chou, J. Y. (2009). Normoglycemia alone is insufficient to prevent long-term complications of hepatocellular adenoma in glycogen storage disease type Ib mice. *J Hepatol* *51*, 909-917
- Yiu, W. H., Pan, C. J., Ruef, R. A., Peng, W. T., Starost, M. F., Mansfield, B. C., and Chou, J. Y. (2008). Angiotensin mediates renal fibrosis in the nephropathy of glycogen storage disease type Ia. *Kidney Int* *73*, 716-723
- Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhbass, U., Montagnier, L., and Charneau, P. (2000). HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* *101*, 173-185
- Zingone, A., Hiraiwa, H., Pan, C. J., Lin, B., Chen, H., Ward, J. M., and Chou, J. Y. (2000). Correction of glycogen storage disease type 1a in a mouse model by gene therapy. *J Biol Chem* *275*, 828-832
- Zucman-Rossi, J., Jeannot, E., Nhieu, J. T., Scoazec, J. Y., Guettier, C., Rebouissou, S., Bacq, Y., Letteurtre, E., Paradis, V., Michalak, S., *et al.* (2006). Genotype-phenotype correlation in hepatocellular adenoma: new classification and relationship with HCC. *Hepatology* *43*, 515-524
- Zufferey, R., Donello, J. E., Trono, D., and Hope, T. J. (1999). Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* *73*, 2886-2892

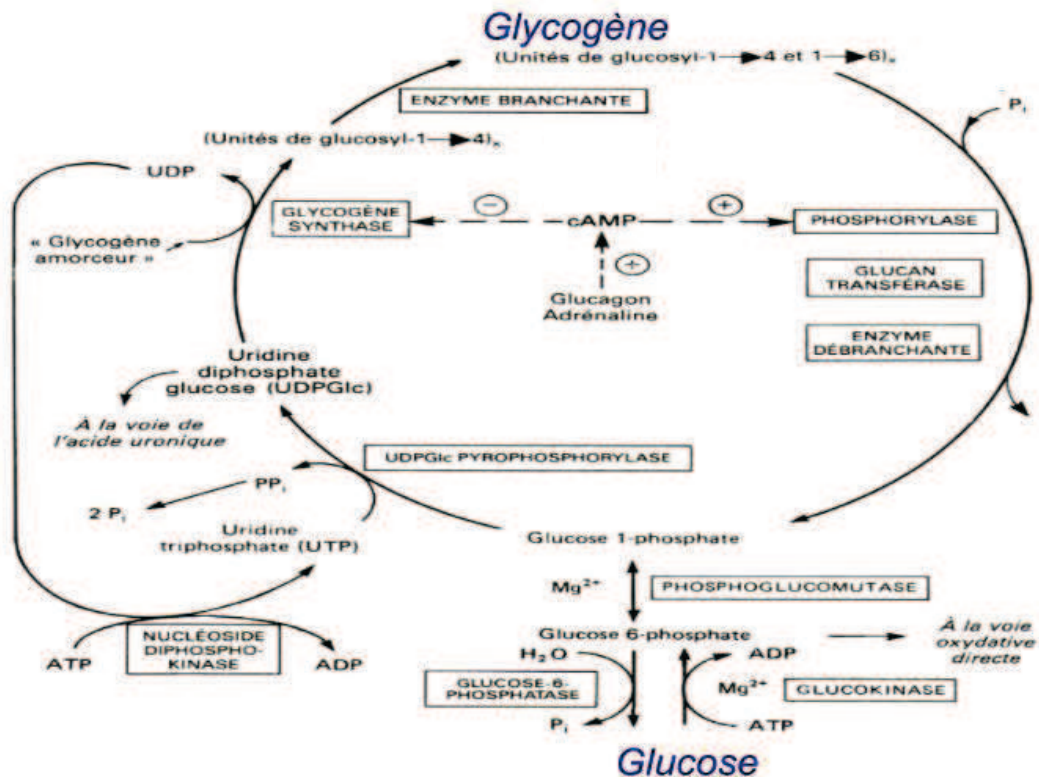


Figure 1 : La glycogénolyse

La dégradation du glycogène résulte de l'action double de l'AMPc sur : 1) l'activation de la glycogène phosphorylase et 2) l'inhibition de la glycogène synthase.

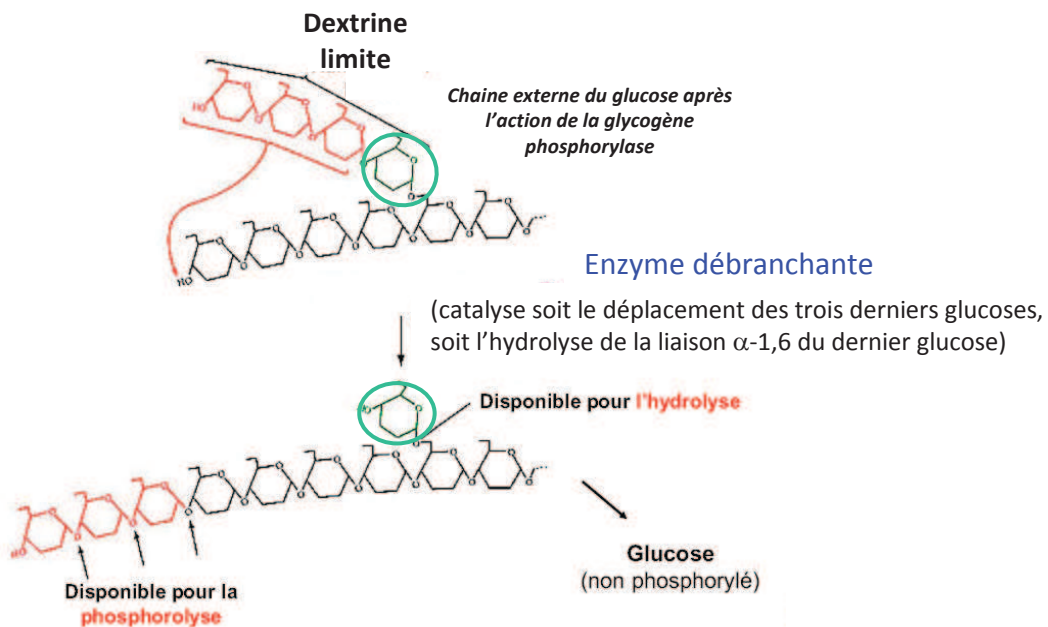


Figure 2 : Action de l'enzyme débranchante dans la glycogénolyse

Au niveau des dextrines limites, l'enzyme débranchante transfère 3 résidus glucose (en rouge) sur la chaîne linéaire, qui deviennent disponibles pour la glycogène phosphorylase, puis le dernier résidu glucose de la ramification (en vert) est hydrolysé en glucose non phosphorylé.

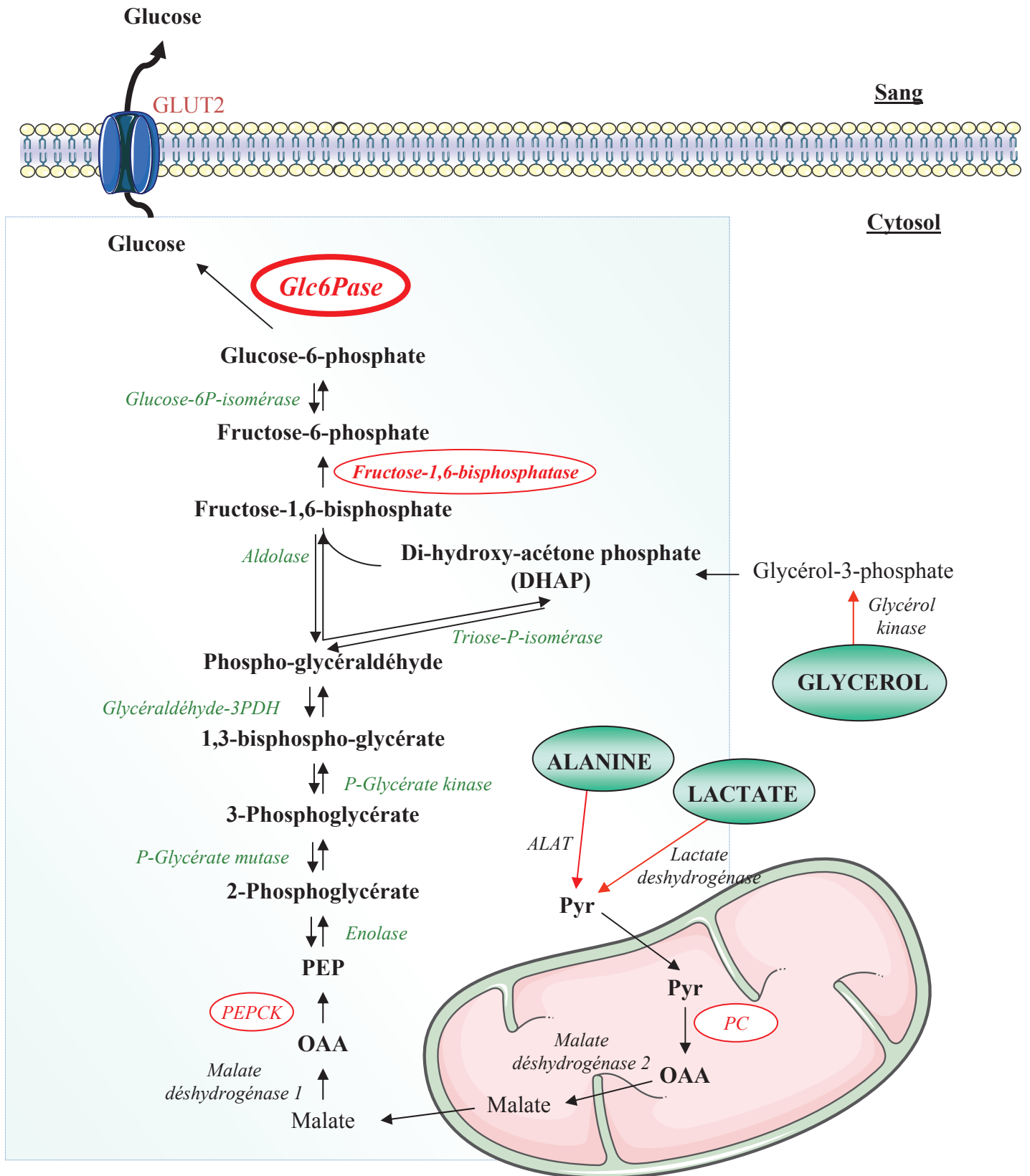


Figure 3 : La néoglucogénèse à partir du lactate, alanine et glycérol

Les enzymes communes à la glycolyse sont indiquées en vert. Les enzymes clés de la néoglucogénèse : la G6Pase, la fructose-1,6-bisphosphatase, la PECK et la pyruvate carboxylase (PC) sont entourées en rouge. L'alanine et le lactate entrent dans la néoglucogénèse au niveau du pyruvate alors que le glycérol entre au niveau du DHAP. Le glucose est libéré par le transporteur Glut2 dans la circulation sanguine.

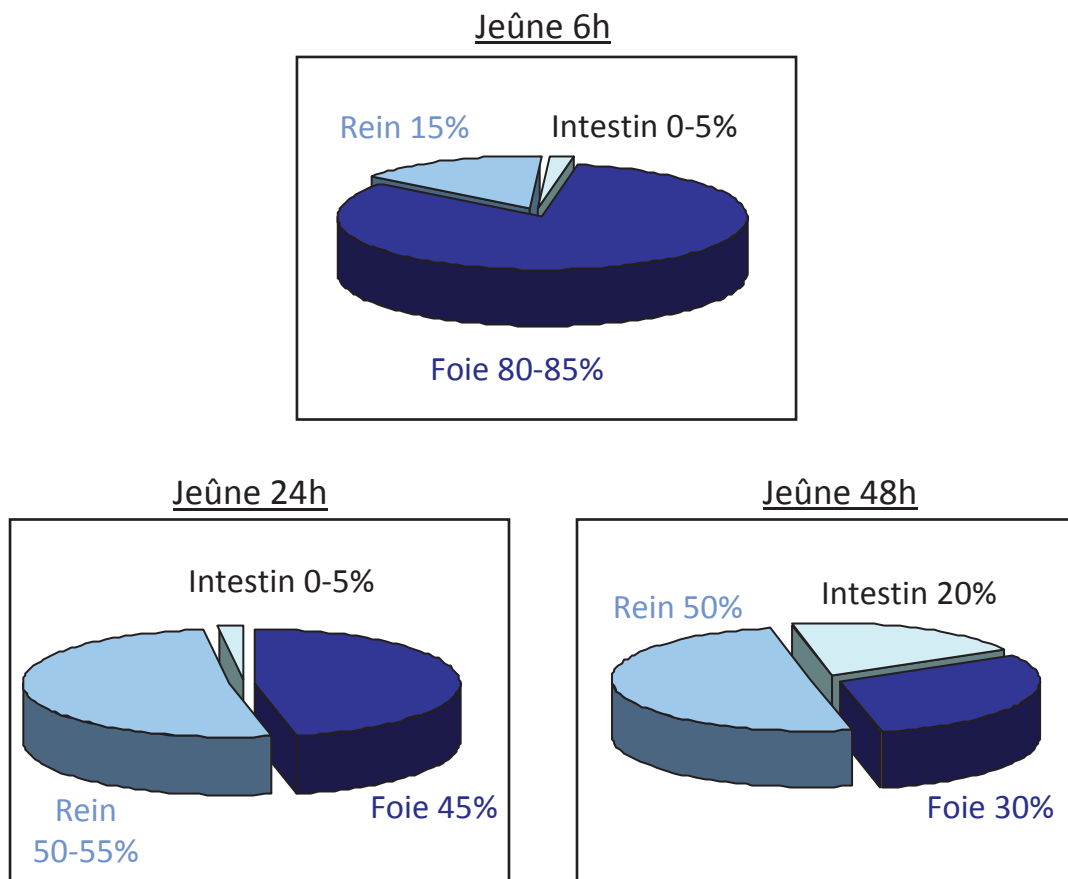


Figure 4 : Estimation de la contribution respective des trois organes néoglucogéniques dans la production endogène de glucose au cours du jeûne

Les données ont été obtenues chez le rat, après 6, 24 et 48 heures de jeûne (données du laboratoire).

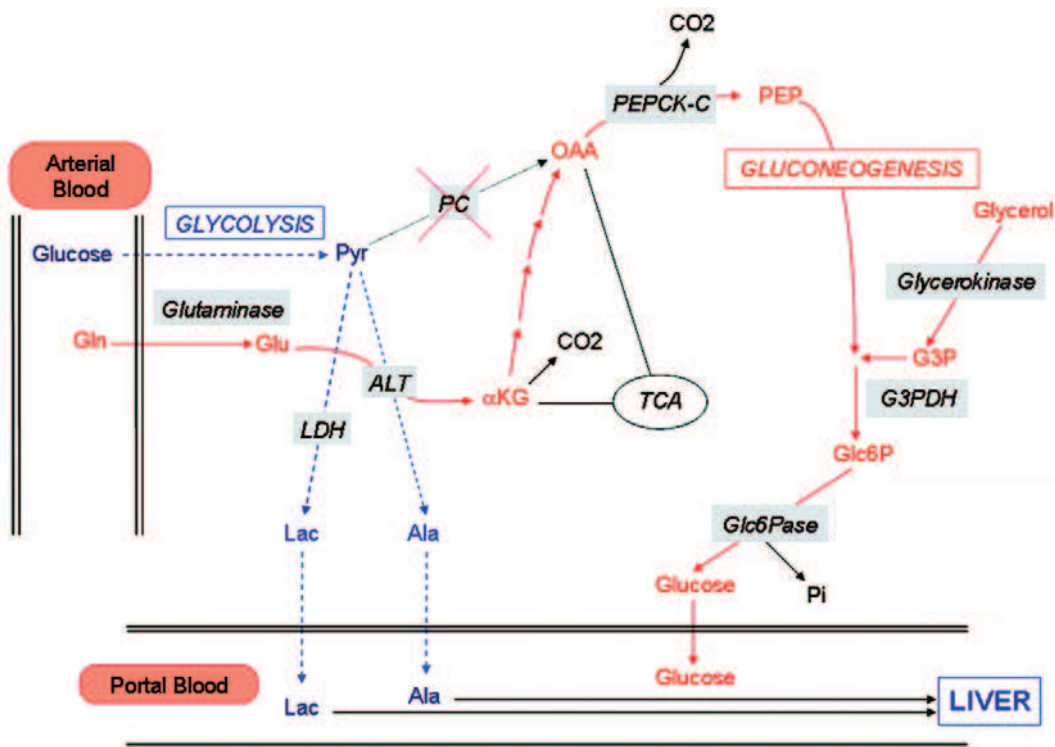


Figure 5 : Néoglucogénèse intestinale et production de précurseurs néoglucogéniques pour le foie

La néoglucogénèse intestinale (en rouge) utilise la glutamine et le glycérol comme substrats. La **glutaminase** est une enzyme nécessaire à la formation du glutamate, qui après transamination est transformé en α -cétoglutarate (α -KG) qui entre dans le cycle de Krebs (TCA). L'oxaloacétate est détourné du TCA lorsque la PEPCK-c est induite pour la synthèse du glucose. Le glycérol entre dans la voie de néoglucogénèse au niveau du Di-hydroxy- acétone phosphate par action successive des enzymes glycérol kinase et glycérol-3-phosphate déshydrogénase (G3PDH).

De plus, le couplage entre l'utilisation du glutamate et du pyruvate (issu de la glycolyse) par l'alanine aminotransférase (ALT) et l'activité faible de la pyruvate carboxylase intestinale permet la production d'alanine et de lactate, précurseurs de la NGG hépatique. (d'après Mithieux *et al.*, 2004)

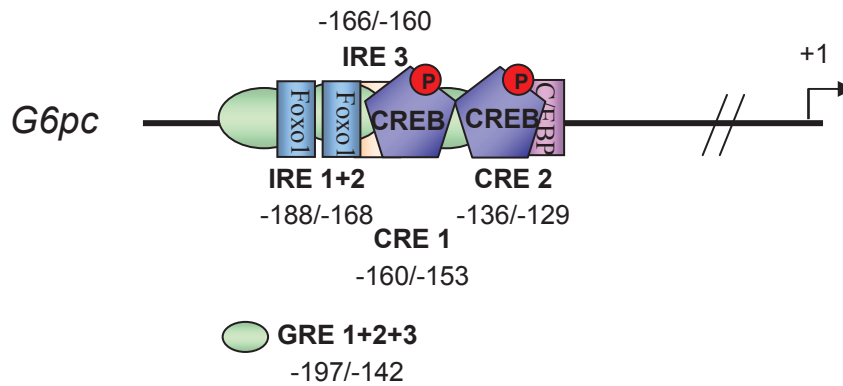


Figure 6A : Localisation des éléments de réponse aux hormones sur le promoteur *G6pc*

CRE 1/2 : « cAMP response element » 1 et 2 où peut se fixer, notamment P-CREB.

IRE 1/2/3 : « Insulin Response Element » 1, 2 et 3. En présence d'insuline, les facteurs Foxo1 sont phosphorylés et se dissocient des IRE 1+2.

GRE 1/2/3 : « Glucocorticoid Response Element » 1, 2, 3 où se fixent les Glucocorticoid Receptor en présence d'un ligand.

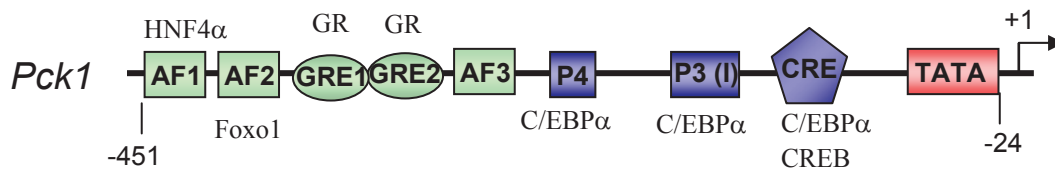


Figure 6B : Localisation des unités de réponse aux hormones sur le promoteur *Pck1*

Éléments impliqués dans l'unité de réponse aux glucocorticoïdes

Éléments impliqués dans l'unité de réponse à l'AMPc

Les noms inscrits à l'intérieur des rectangles correspondent aux éléments cis identifiés. Les noms inscrits au dessus, ou en dessous, correspondent aux protéines liant les sites respectifs.

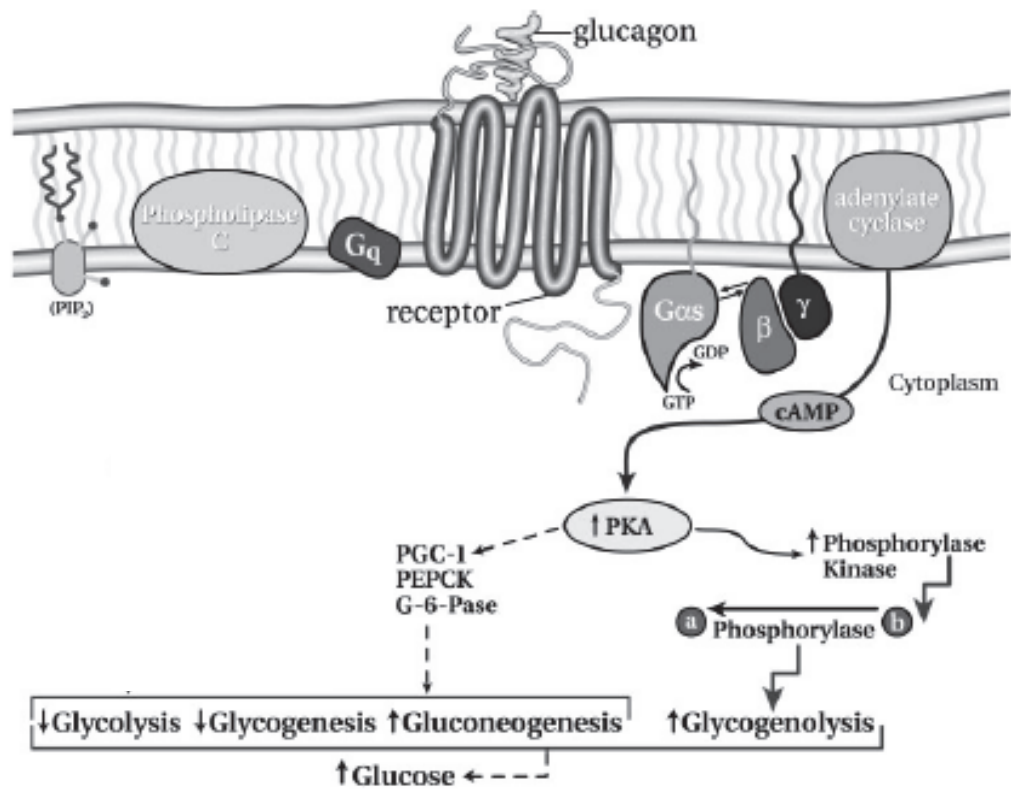
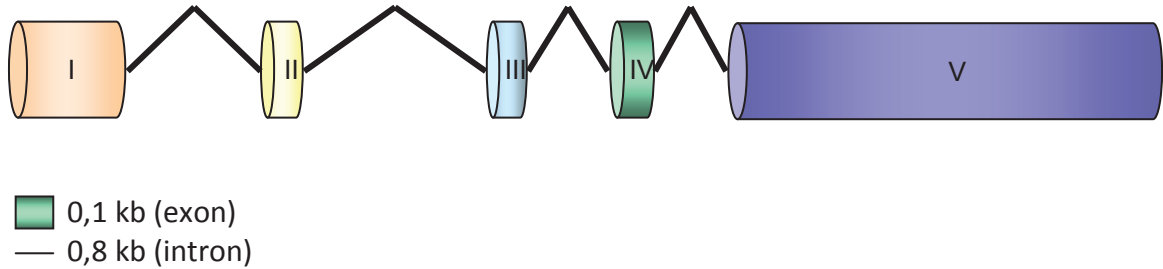


Figure 7 : Signalisation intracellulaire du glucagon

Après fixation du glucagon à son récepteur, l'activation de l'adénylate cyclase entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc et une activation de la PKA conduisant à l'augmentation de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse et une diminution parallèle de la glycolyse et de la glycogénèse (Adapté de Jiang *et al.*, 2003)

A : Schéma du gène *G6PC* chez l'homme



B : Structure de la protéine G6PC

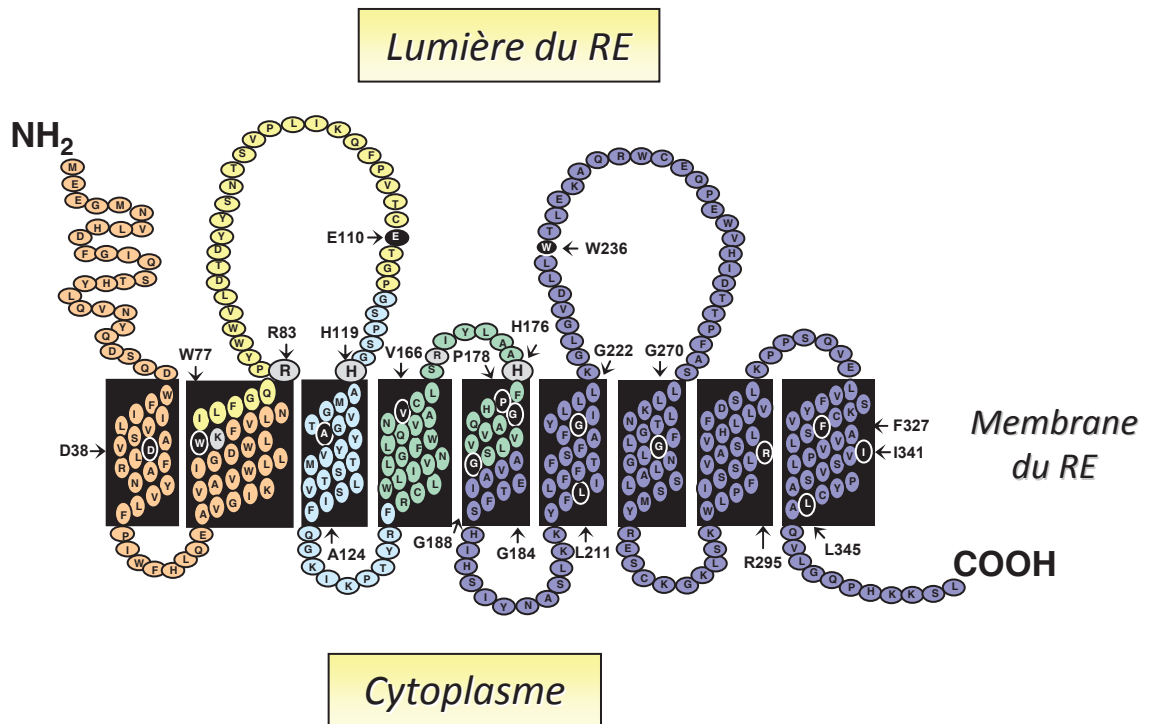
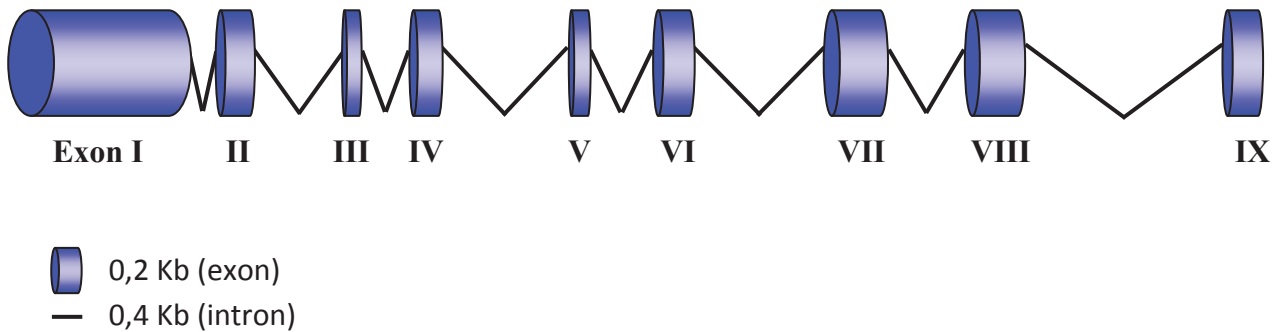


Figure 8 : Représentation du gène et de la structure de la protéine G6PC

(A) Schéma du gène *G6PC* humain. Chaque exon est représenté par un cylindre d'une couleur donnée. Les introns sont représentés par les traits. (B) Représentation de la structure de la protéine G6PC. Les acides aminés codés par chacun des exons sont représentés par la même couleur que l'exon. Les acides aminés en noir représentent les acides aminés touchés par des mutations faux-sens dans la GSD 1. Les acides aminés impliqués dans le site actif de la G6PC sont représentés par les cercles gris. (Adapté de Pan *et al.*, 1998)

A : Schéma du gène *Slc37a4* (G6PT) chez l'homme



B : Structure de la protéine G6PT

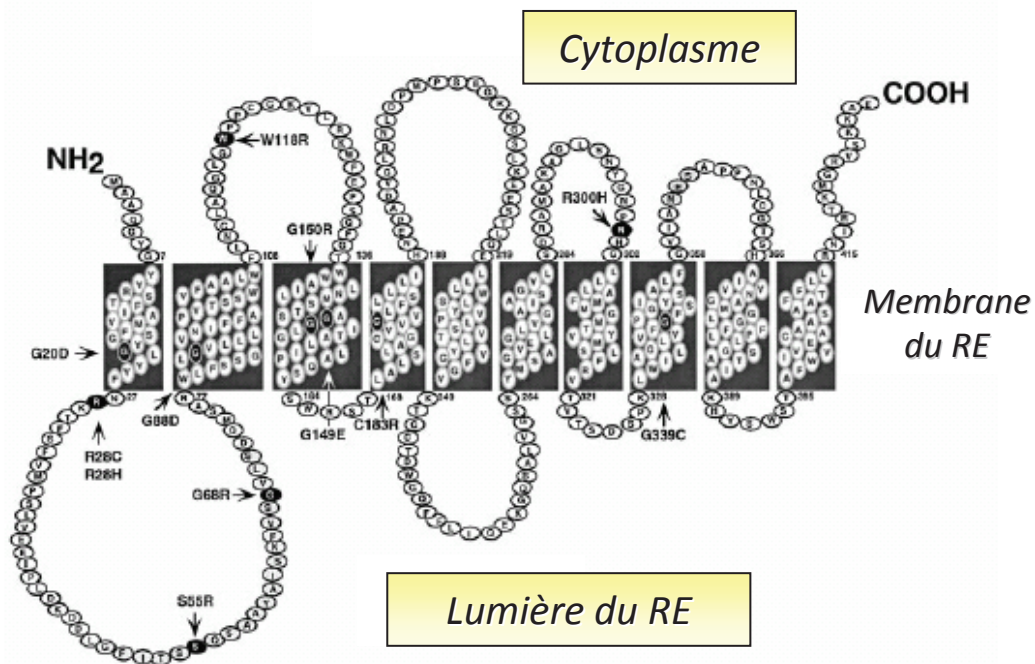
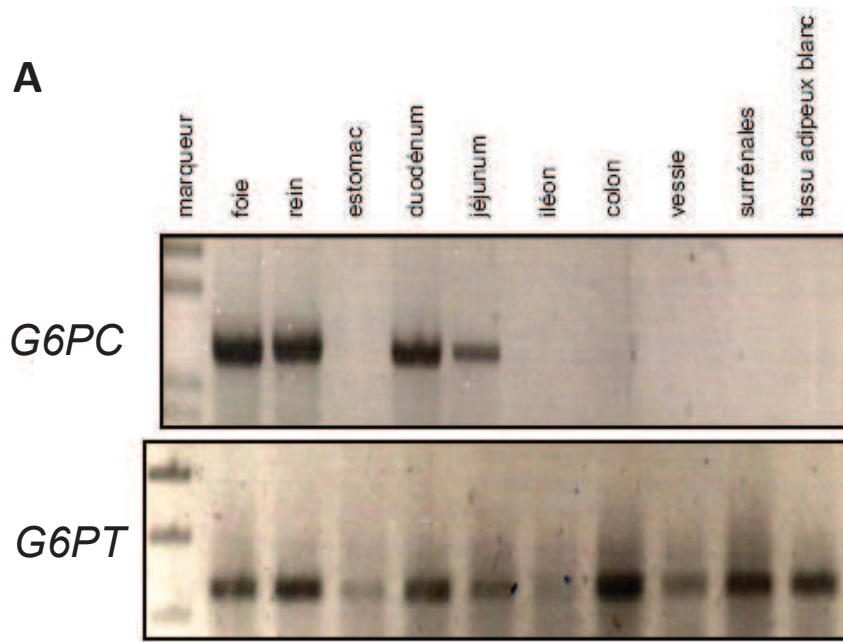


Figure 9 : Représentation du gène et de la structure de la protéine G6PT

(A) Schéma du gène *Slc37a4* humain. Chaque exon est représenté par un cylindre coloré. Les introns sont représentés par les traits. (B) Représentation de la structure de la protéine G6PT. Les acides aminés en noir représentent les acides aminés touchés par des mutations faux-sens dans la GSD 1. (D'après Pan *et al.*, 1999)



B

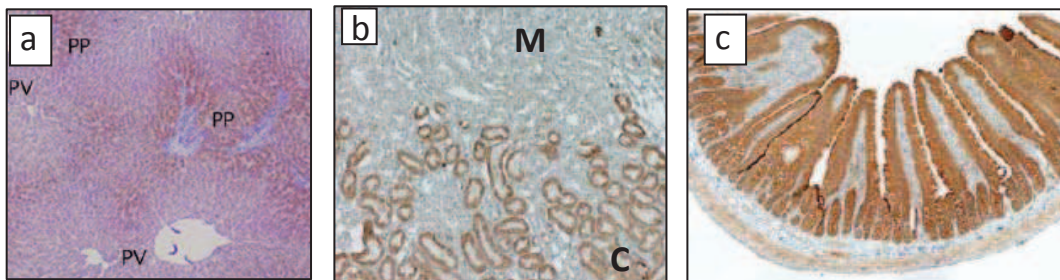


Figure 10 : Expression tissulaire des gènes du système G6Pase

(A) Analyse par RT-PCR des gènes *G6PC* et *G6PT* à partir des ARNm extraits de différents tissus. (B) Immunodétection de la G6PC dans le foie (a), le rein (b) et le duodénum (c) de rat. La présence de la G6PC est détectée par une révélation à la peroxydase. Au contact de l'enzyme, le substrat chromogène forme un produit coloré marron (PP) Périportal ; (PV) Périveineux ; (C) Zone corticale ; (M) Zone médullaire (D'après Rajas *et al.*, 2007)

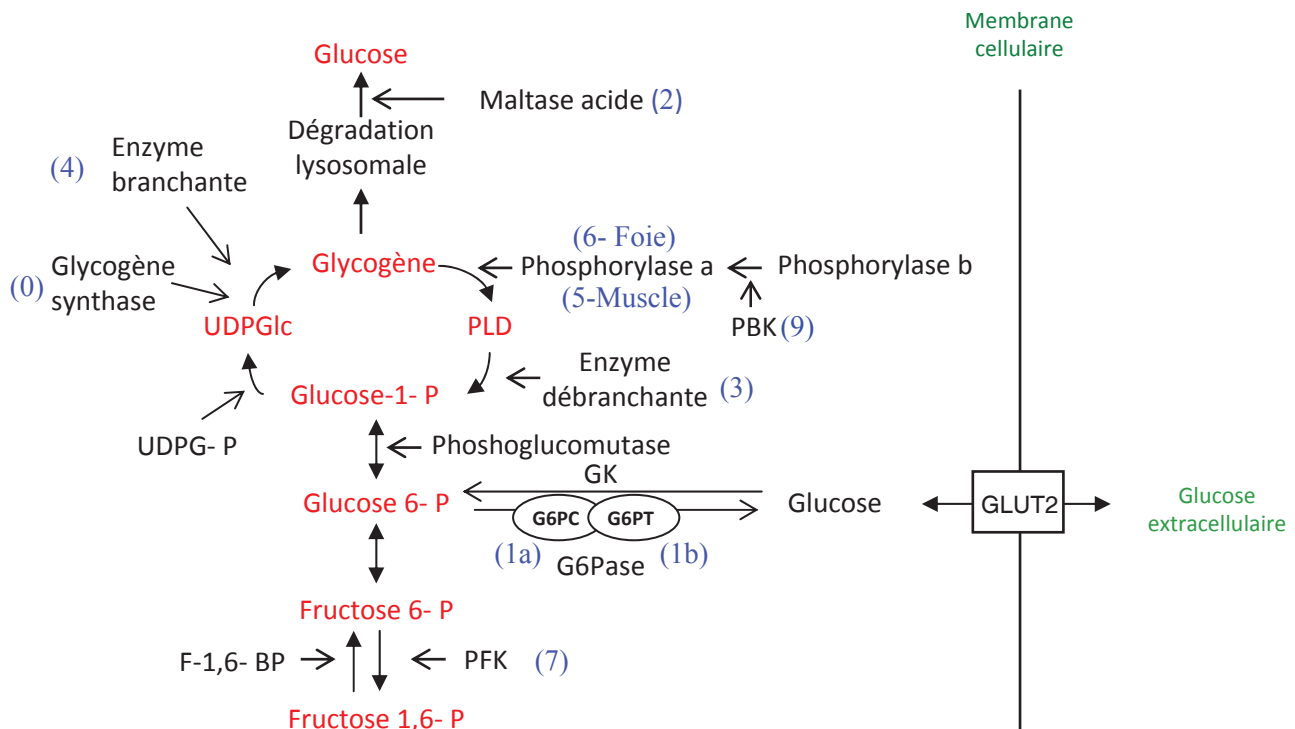


Figure 12 : Métabolisme du glycogène et glycogénoses

Une mutation dans le gène codant les principales enzymes du métabolisme du glycogène entraîne une GSD. Le numéro correspondant au type de GSD est indiqué en bleu par un chiffre arabe entre parenthèse, les métabolites sont indiqués en rouge et les enzymes en noir.

UDPGlc : Uridine diphosphate glucose ; PLD : Dextrine limite de la phosphorylase ; GLUT2 : Glucose transporteur 2 ; PFK : Phosphofruktokinase ; F-1,6-BP : Fructose-1,6-bisphosphatase ; (GK) Glucokinase ; (UDPG-P) UDP Glucose pyrophosphorylase ; (PBK) Phosphorylase b kinase

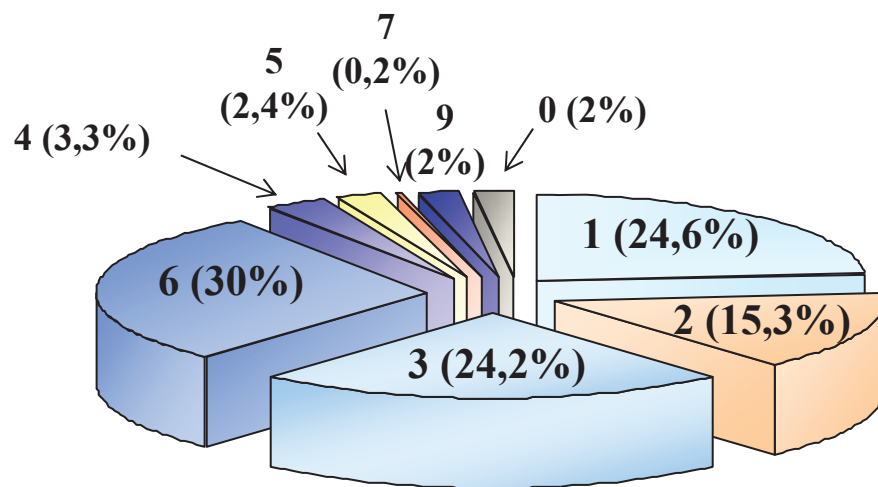


Figure 13 : Prévalence des différentes glycogénoses

Les glycogénoses hépatiques sont représentées en bleu-violet et les glycogénoses musculaires sont représentés en jaune-orangé. Le type de GSD est représenté par un chiffre arabe et sa prévalence est indiquée entre parenthèse.

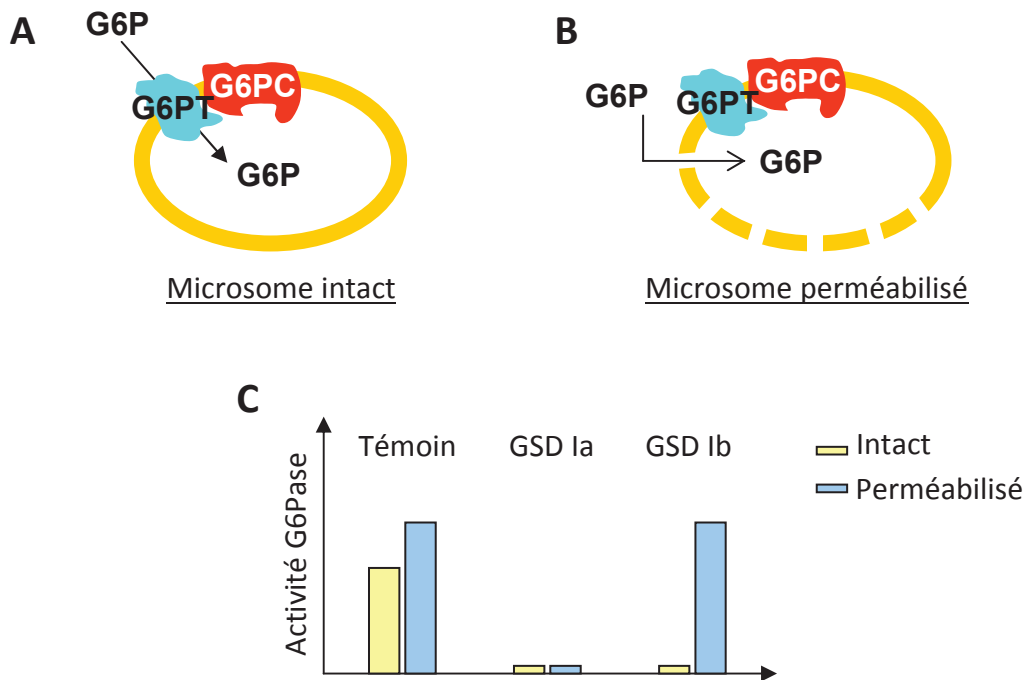


Figure 14 : Relation entre structure du micrososome et activité G6Pase

Le G6P est transporté par la G6PT vers la lumière du réticulum endoplasmique avant d'être hydrolysé par la G6PC dans un micrososome intact (A) alors qu'il peut entrer et être hydrolysé directement dans un micrososome perméabilisé (B).

Chez les patients GSD Ia, l'activité G6Pase est nulle dans les deux situations alors que chez les patients GSD Ib, l'activité G6Pase est restaurée dans une situation où les microsomes sont perméabilisés (C).

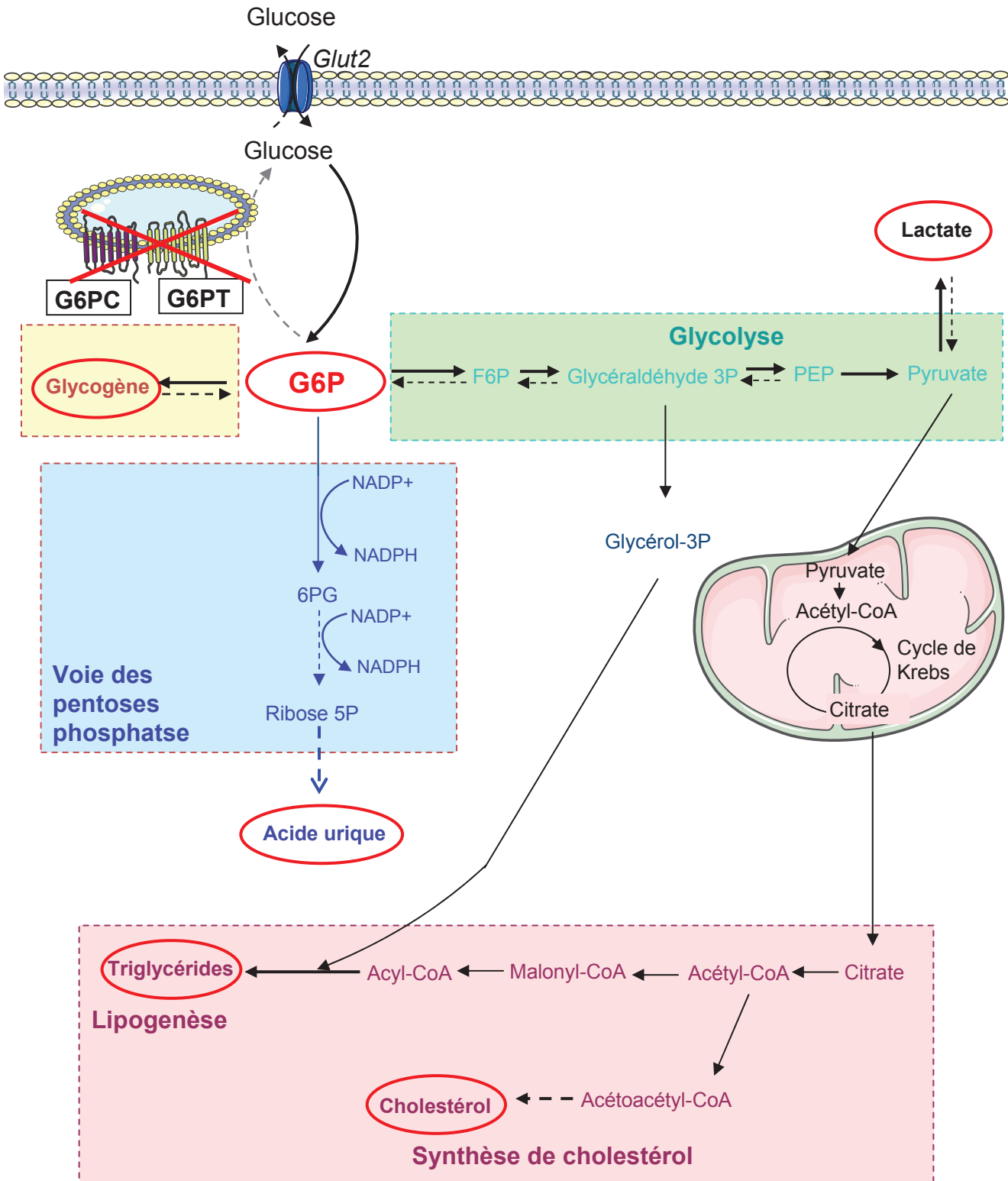


Figure 15 : Voies métaboliques activées en absence de glucose-6 phosphatase

En absence d'activité G6Pase, l'accumulation de G6P au sein de l'hépatocyte entraîne l'activation des voies de synthèse de glycogène, de la glycolyse, de la lipogenèse, de la synthèse de cholestérol et des pentoses phosphates. (Adapté de Postic *et al.*, 2007)

PEP: Phosphoénol pyruvate; 6PG: 6-phosphogluconolactone

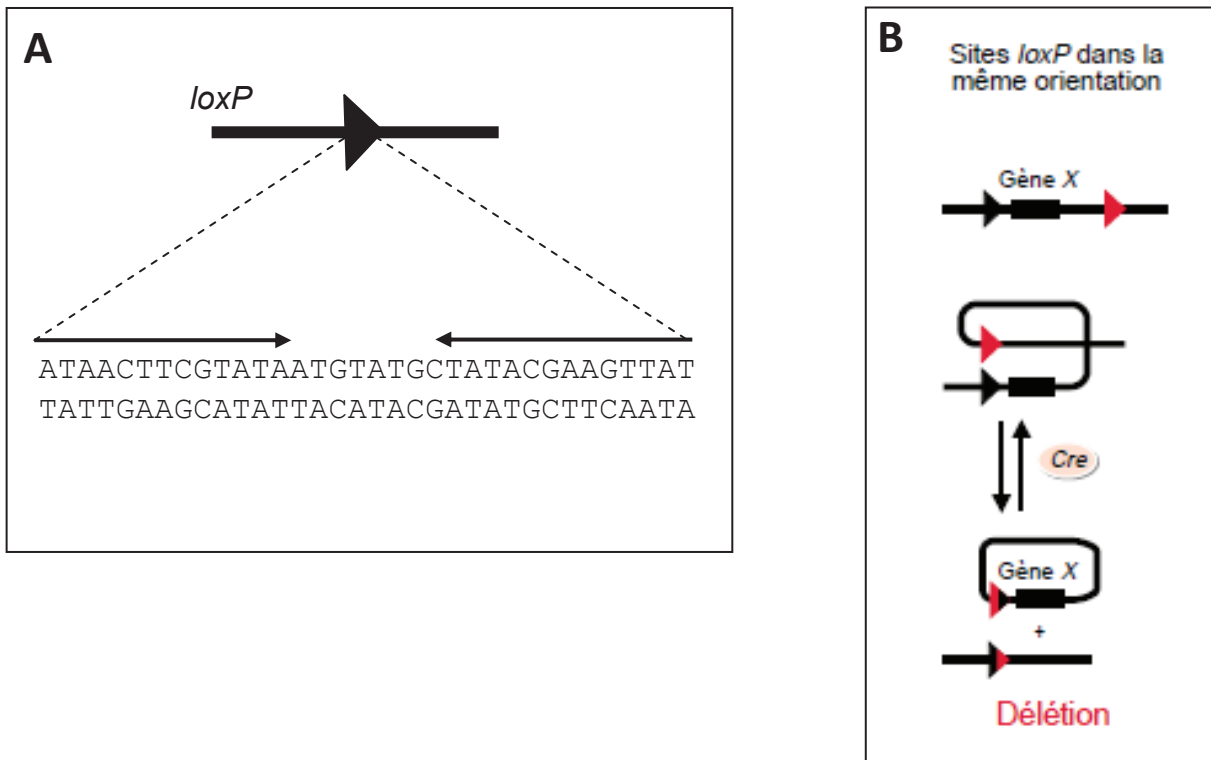


Figure 16 : Le système CRE-LOX

(A) Séquence du site *loxP*, symbolisé par un triangle noir et (B) Réaction de la recombinase en présence de deux sites *LoxP* dans la même orientation (d'après Babinet & Cohen-Tannoudji, 2000)

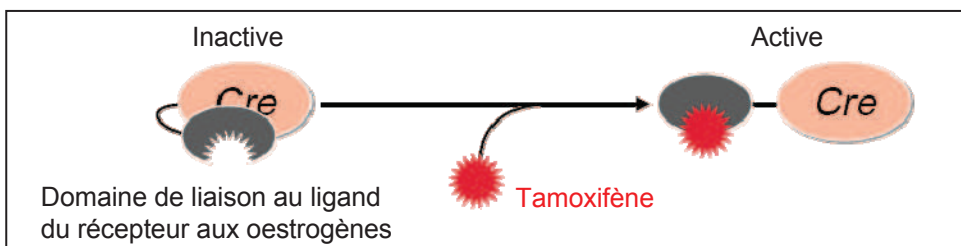
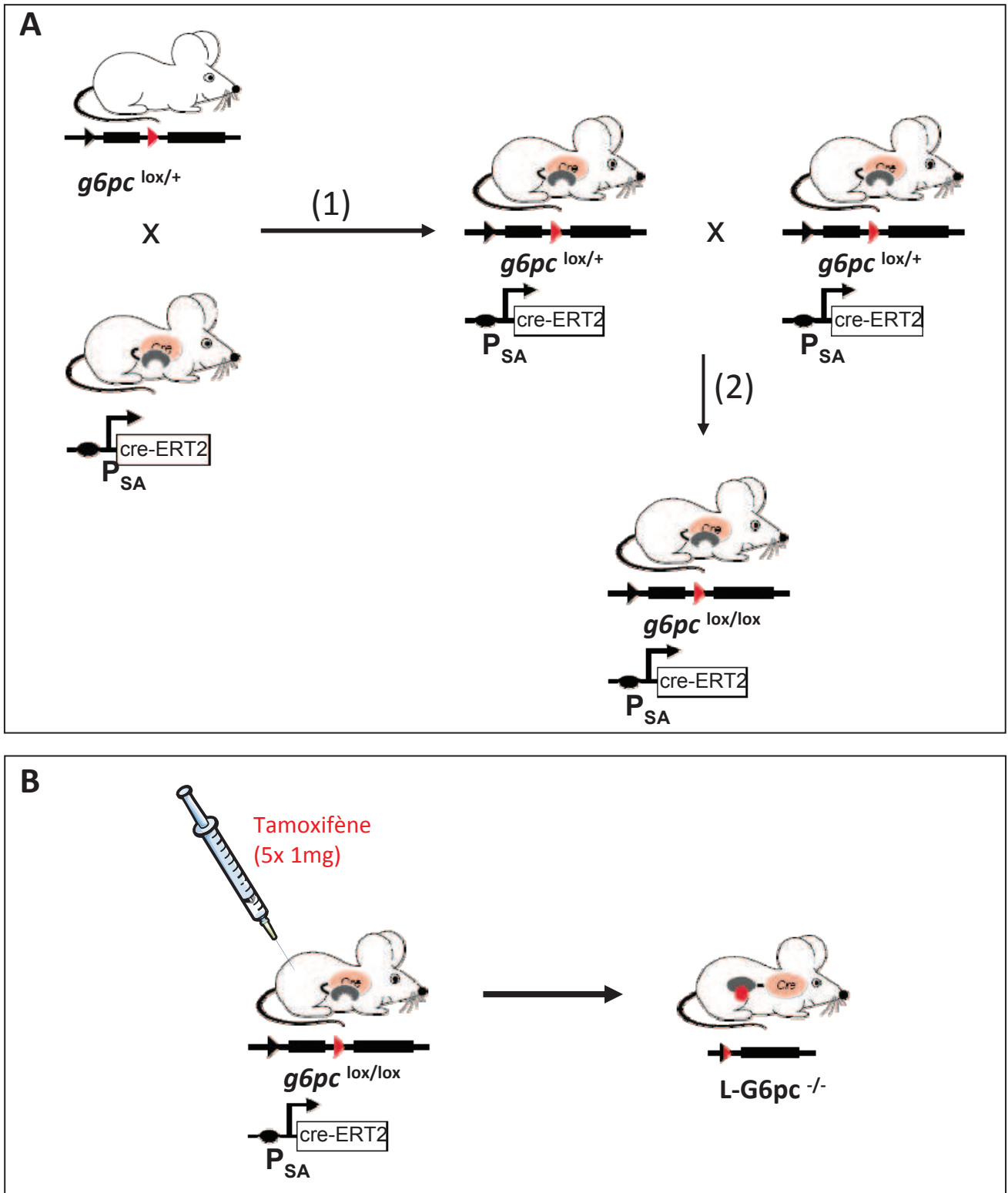


Figure 17 : La recombinase Cre-ERT2

Le tamoxifène se lie au domaine de liaison du récepteur aux oestrogènes de la Cre-ERT2 inactive, induisant un changement de conformation de la protéine et sa translocation au niveau du noyau (d'après Babinet & Cohen-Tannoudji, 2000)



	<i>Génome</i>	<i>Capacité de clonage</i>	<i>Cellules cibles</i>	<i>Expression du transgène</i>	<i>Intégration</i>	<i>Immunité pré-existante</i>
Adénovirus	ADNdb	36 kb	en division/ quiescentes	Stable dans cellules quiescentes	Non	Oui
Oncorétrovirus	ARNsb	8kb	en division	Stable	Oui	Non
AAV	ADNsb	4,7kb	en division/ quiescentes	Stable dans cellules quiescentes	Possible	Oui
Lentivirus	ARNsb	8kb	en division/ quiescentes	Stable	Oui	Non

Tableau 1 : Caractéristiques des vecteurs viraux

ADNdb= ADN double brin ; ADNsb= ADN simple brin

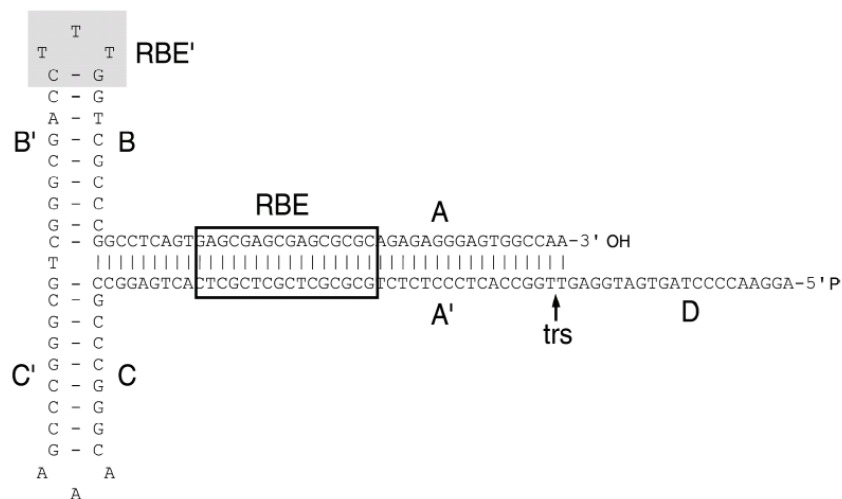


Figure 19 : Structure secondaire d'une ITR

Une ITR est composée de séquences palindromiques, repliées en forme de T. La région RBE lie les protéines nécessaires à la réplication et le site trs est le lieu où se produit la coupure de l'ADN lors de la réplication pour libérer les structure simple brin. (D'après Goncalves, 2005)

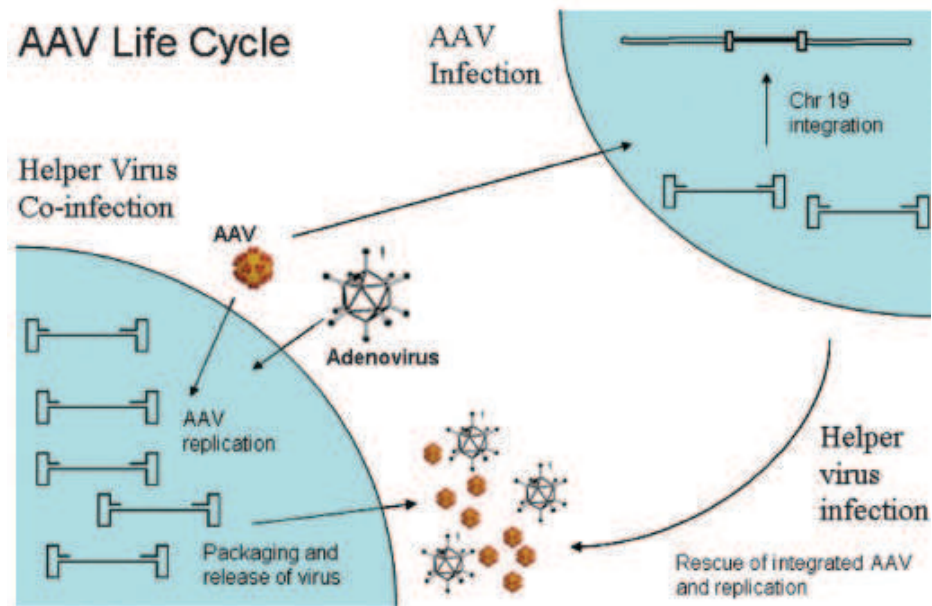


Figure 20 : Cycle viral des AAV

Les AAV se répliquent uniquement en présence d'une co-infection avec un adénovirus. Il y a alors réplication du génome, expression des gènes viraux et production de virions. En absence d'adénovirus, l'AAV va s'intégrer dans le chromosome 19 et reste latent. Une nouvelle infection par un virus « helper » peut déclencher à nouveau le cycle viral. (D'après Daya *et al.*, 2008)

<i>Tissus</i>	<i>Sérotypes optimaux</i>
Foie	AAV8, AAV9
Muscle squelettique	AAV1, AAV7, AAV6, AAV8, AAV9
Système Nerveux Central	AAV5, AAV4 et AAV 1
Œil	AAV4 et AAV5
Poumons	AAV9
Cœur	AAV8
Rein	AAV2
Pancréas	AAV8

Tableau 2 : Tropisme des principaux sérotypes

Présentation des sérotypes les plus adaptés pour la transduction de différents tissus (d'après Wu *et al.*, 2006)

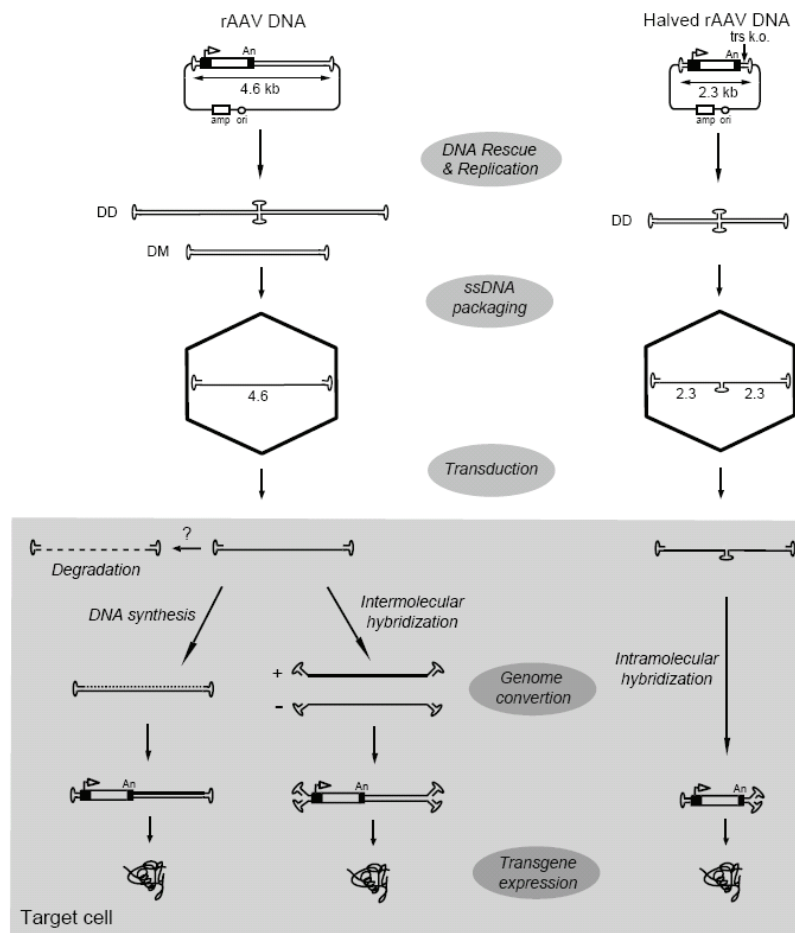


Figure 21 : Comparaison de la génération et de la transduction des AAV simple brin (sb) et scAAV

A gauche : la réplication de l'ADN des AAVsb permet la formation d'intermédiaires répliatifs sous forme de duplexes monomériques (DM) et de duplexes dimériques (DD). Après action d'une endonucléase au niveau des différents ITR, le génome sb est encapsidé. Dans le noyau de la cellule transduite, le génome sb peut soit être dégradé soit être converti en double brin (synthèse du brin complémentaire ou hybridation inter-moléculaire).

A droite: Sur la base du même modèle de réplication, les intermédiaires répliatifs sont générés sous forme de DD comportant une ITR mutée au centre de leur structure. L'endonucléase peut agir uniquement au niveau des ITR sauvages des extrémités pour générer des génomes dimériques répétés inversés qui sont encapsidés. Dans la cellule, la libération de ce génome entraîne une hybridation intramoléculeire et donc à la formation rapide et autonome de structures doubles brins pouvant être transcrites. (D'après Goncalves, 2005)

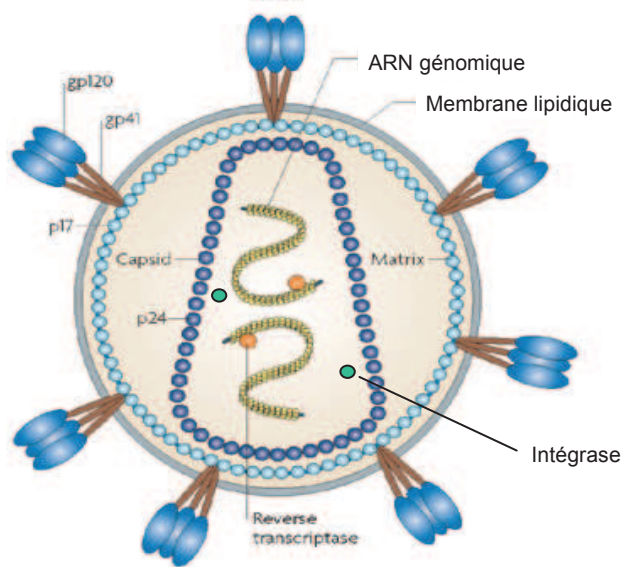


Figure 22 : Structure d'un virion HIV-1

Les particules virales sont sphériques, d'environ 100nm de diamètre et possèdent une bicouche lipidique membranaire entourant une capsid qui renferme deux molécules d'ARN génomique associées en duplex ainsi que différentes enzymes virales (d'après Karlsson Hedestam *et al.*, 2008)

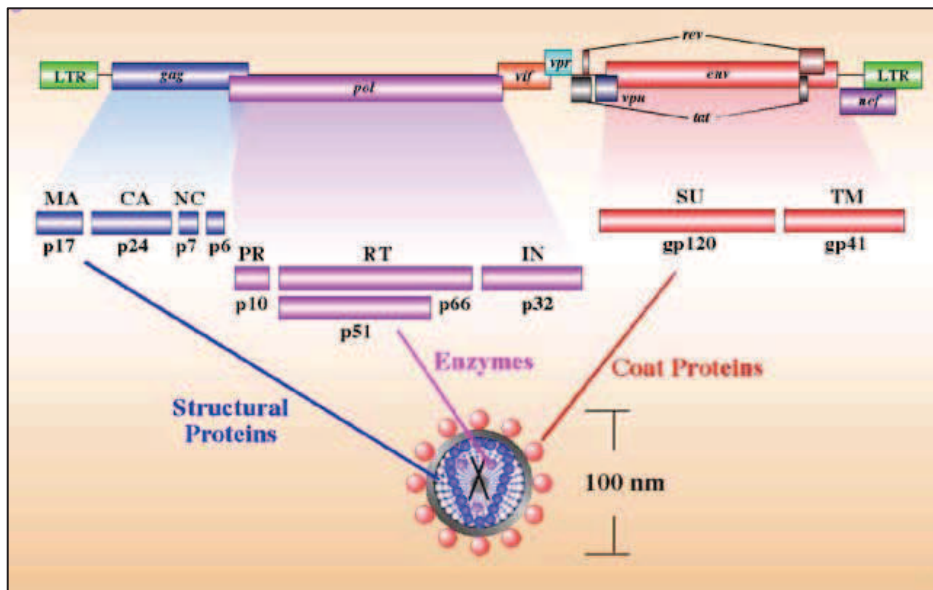


Figure 23 : Structure génomique du HIV-1

Représentation du génome HIV-1 et les différentes protéines produites à partir des gènes de structure *gag* (bleu), *pol* (violet) et *env* (rouge). Les gènes de régulation et accessoires sont également représentés. (D'après <http://www.stanford.edu/group/virus/retro/2005gongishmail/HIV.html>)

MA : Matrice ; CA : Capside ; NC : Nucléocapside ; PR : Protéase ; RT : Reverse Transcriptase ; IN : Intégrase ; SU : Glycoprotéine de surface ; TM : protéine transmembranaire

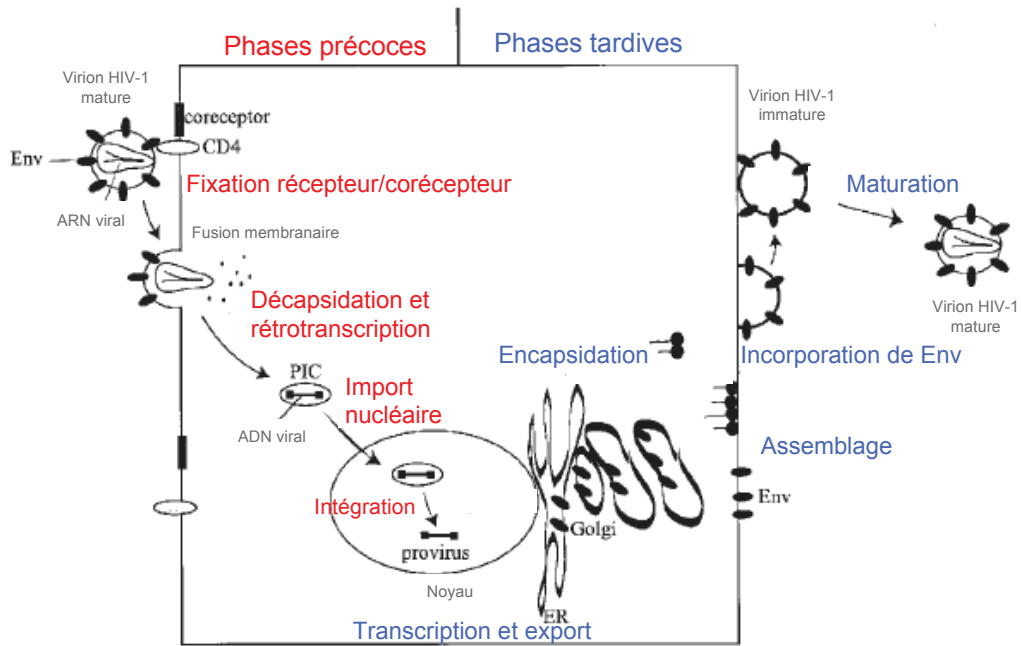


Figure 24 : Représentation du cycle répliatif du HIV-1

En Rouge : étapes précoces, en bleu : étapes tardives (D'après Freed, 2001)

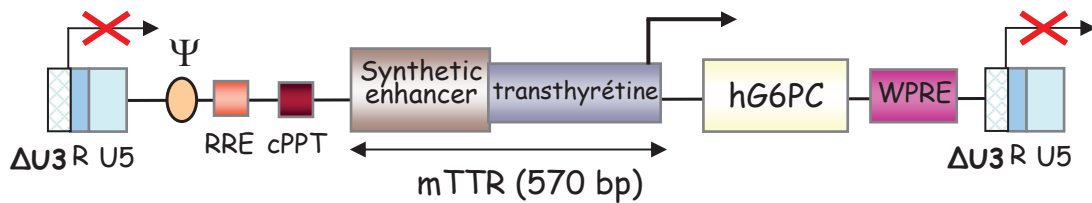


Figure 25 : Schéma du vecteur lentiviral HIV-mTTR-hG6PC

La flèche indique le site d'initiation et direction de la transcription

La flèche barrée indique l'absence d'initiation de la transcription à partir des LTR à cause de la délétion dans la région U3 du promoteur et « enhancers » viraux.

Ψ : Séquence d'encapsidation.

RRE : Séquence liant la protéine Rev.

cPPT : région « Polypurine Tract » centrale.

mTTR : promoteur foie-spécifique composé du promoteur murin de la transthyréline fusionné à des « enhancers » hépatiques synthétiques.

hG6PC : Transgène G6PC humain.

WPRE : Woodchuck Hepatitis virus posttranscriptional Regulatory Element.

ΔU3RU5 : Région du LTR avec un U3 délété des séquences promotrices et enhancers (vecteur self-inactivating SIN).

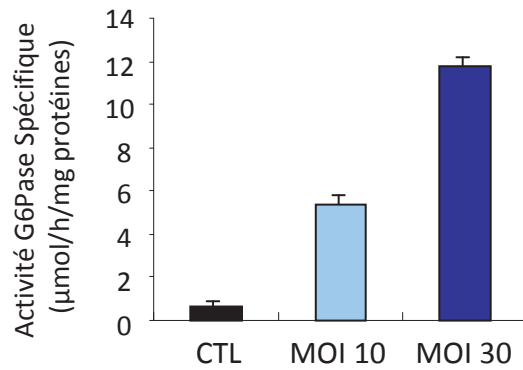


Figure 26 : Détermination de l'activité G6Pase des cellules HepG2 transduites par le lentivirus HIV-mTTR-hG6PC

L'activité enzymatique G6Pase a été déterminée dans les cellules HEPG2 témoins non transduites (barre noire), les cellules HEPG2 transduites par le vecteur mTTR-hG6PC à une MOI 10 (barre bleu claire) et à une MOI 30 (barre bleu foncée).

Les résultats sont représentés sous la forme de moyenne \pm SEM (n=3).

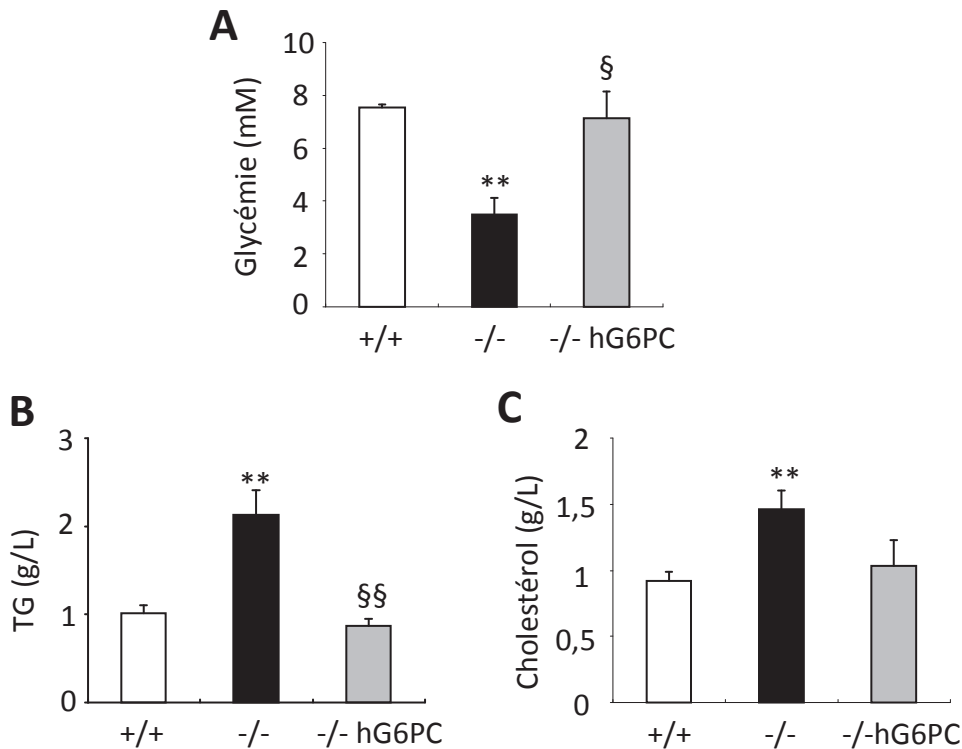


Figure 27 : Paramètres plasmatiques des souris L-G6pc^{-/-} traitées par le vecteur lentiviral HIV-mTTR-hG6PC

(A) Glucose, (B) triglycérides, (C) cholestérol total des souris L-G6pc^{+/+} (barres blanches), L-G6pc^{-/-} non traitées (barres noires) et L-G6pc^{-/-} traitées par les lentivirus mTTR-hG6PC (barres grises).

Les données ont été obtenues 3 semaines après l'induction de la déficience par traitement au tamoxifène, soit 6 semaines après l'injection systémique des lentivirus mTTR-hG6PC, chez des souris euthanasiées après 6h de jeûne.

Les résultats sont représentés sous la forme moyenne \pm SEM (L-G6pc^{+/+} : n=3 ; L-g6pc^{-/-} : n=6 ; L-G6pc^{-/-} hG6PC : n=3)

** Significativement différent des souris L-G6pc^{+/+} (Test Mann & Whitney, p<0,01)

§ et §§ Significativement différent des souris L-G6pc^{-/-} non traitées (Test Mann & Whitney, p<0,05 et p<0,01)

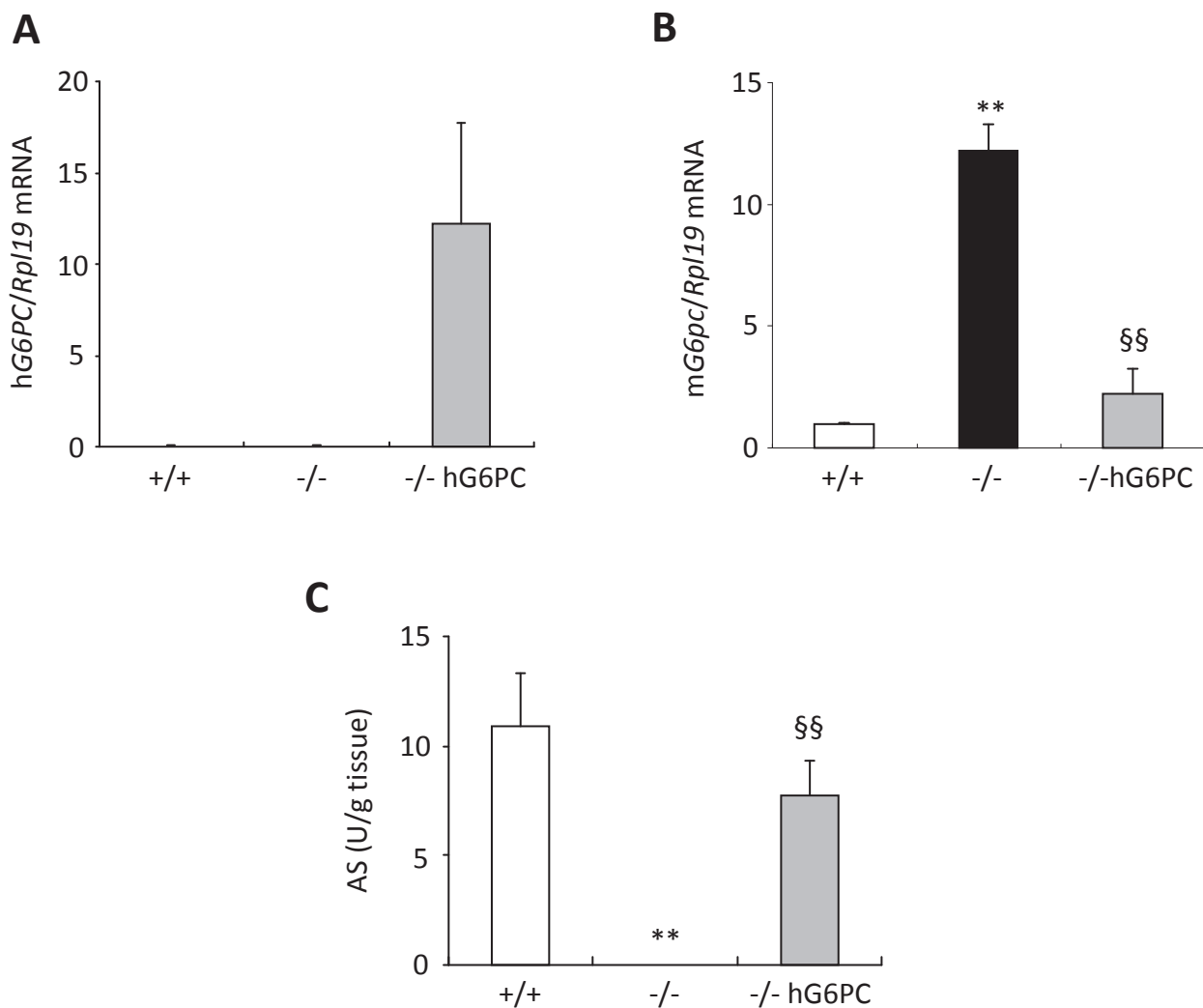


Figure 29 : Analyse de l'expression du gène *G6pc* dans le foie des souris traitées par le vecteur lentiviral HIV-mTTR-hG6PC

(A et B) Les niveaux d'ARNm *G6pc* humain (A) et murin (B) ont été déterminés par RT-qPCR dans le foie des souris L-*G6pc*^{+/+}, L-*G6pc*^{-/-} et L-*G6pc*^{-/-} traitées par les lentivirus mTTR-hG6PC. Les résultats ont été normalisés par rapport à l'expression du gène *Rp19*. (C) L'activité G6Pase hépatique a été déterminée à la Vmax de l'enzyme.

Les données ont été obtenues 3 semaines après l'induction de la déficience par traitement au tamoxifène, soit 6 semaines après l'injection systémique des lentivirus mTTR-hG6PC, chez des souris euthanasiées après 6h de jeûne.

Les résultats sont représentés sous la forme moyenne \pm SEM (L-*G6pc*^{+/+} : n=3 ; L-*G6pc*^{-/-} : n=5 ; L-*G6pc*^{-/-} hG6PC : n=3)

** Significativement différent des souris L-*G6pc*^{+/+} (Test Mann & Whitney, p<0,01)

§§ Significativement différent des souris L-*G6pc*^{-/-} non traitées (Test Mann & Whitney, p<0,01)

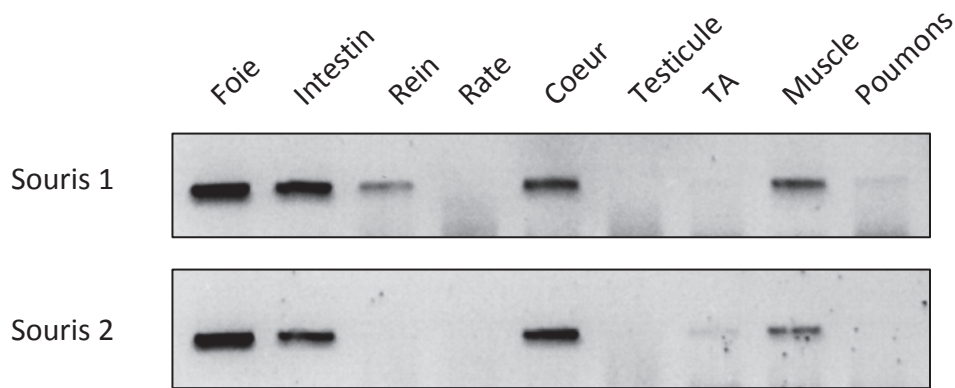


Figure 30 : Analyse de la dissémination du transgène par PCR

L'ADNg a été préparé dans différents organes de deux souris L-G6pc^{-/-} injectées avec le vecteur lentiviral mTTR-hG6PC, 3 semaines après le traitement. La présence de l'ADNc hG6PC a été détectée par PCR.

TA= Tissu Adipeux épидидymaire

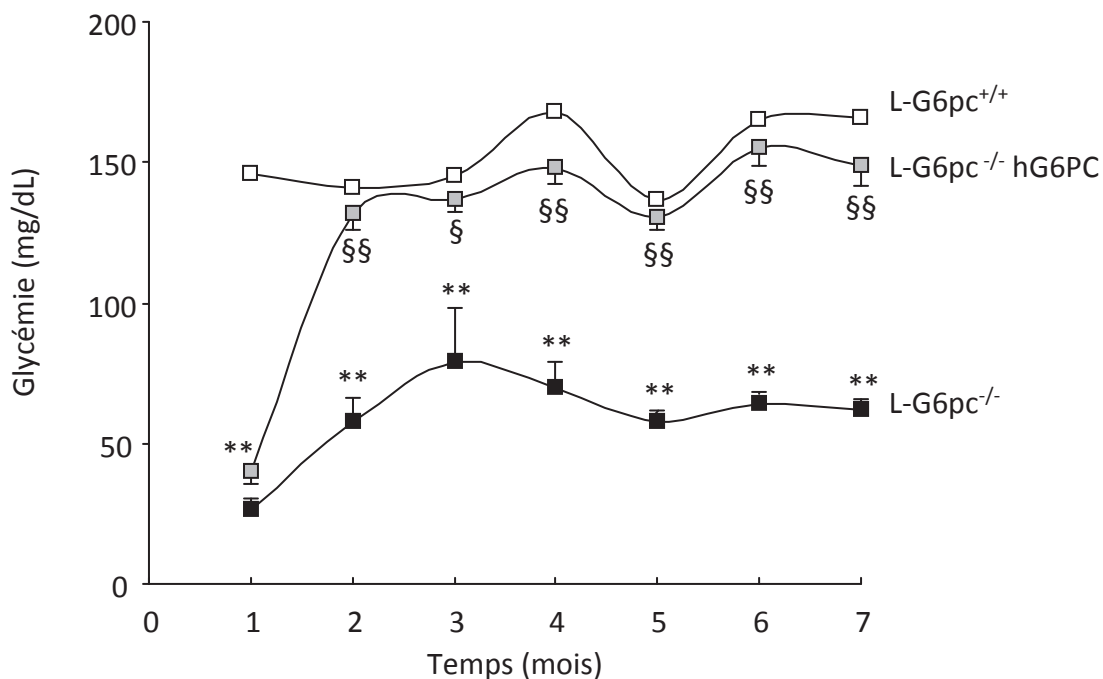


Figure 31 : Suivi sur 7 mois des glycémies chez les souris L-G6pc^{-/-} traitées par le vecteur lentiviral HIV-mTTR-hG6PC, mises à jeun pendant 6 heures

La glycémie est suivie une fois par mois chez les souris L-G6pc^{+/+} (carrés blancs, L-G6pc^{-/-} non traitées (carrés noirs) et L-G6pc^{-/-} traitées par le vecteur lentiviral mTTR-hG6PC (carrés gris).

Les données ont été obtenues à partir d'un mois après l'induction de la déficience par traitement au tamoxifène. Les résultats sont représentés sous la forme moyenne \pm SEM (L-G6pc^{+/+} : n=1 ; L-g6pc^{-/-} : n=2 ; L-G6pc^{-/-} hG6PC : n=5)

** Significativement différent des souris L-G6pc^{+/+} (Test Mann & Whitney, p<0,01)

§ et §§ Significativement différent des souris L-G6pc^{-/-} non traitées (Test Mann & Whitney, p<0,05 et p<0,01, respectivement)

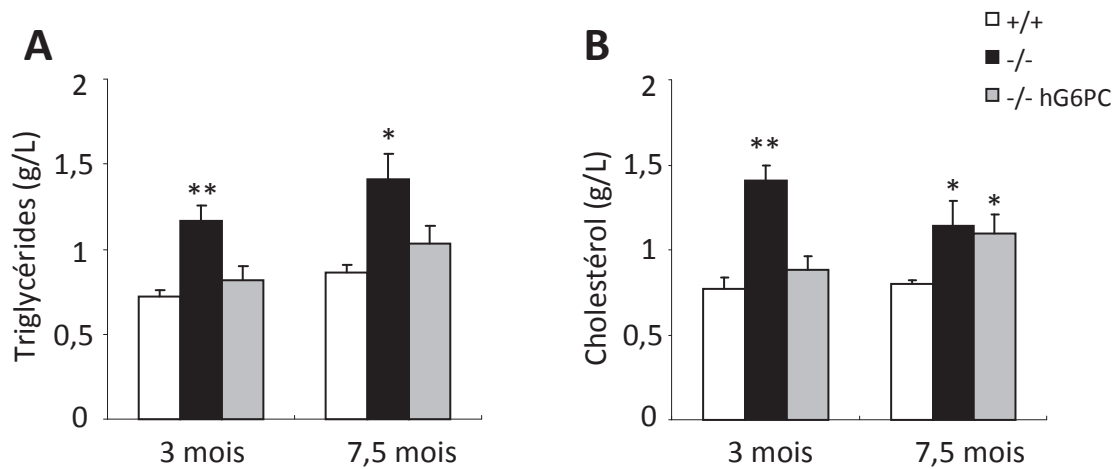


Figure 32 : Suivi sur 7½ mois des paramètres plasmatiques des souris L-G6pc^{-/-} traitées par le vecteur lentiviral

Les triglycérides (A) et le cholestérol total (B) ont été déterminés après 6 heures de jeune chez les souris L-G6pc^{+/+} (barres blanches, L-G6pc^{-/-} non traitées (barres noires) et L-G6pc^{-/-} traitées par le vecteur lentiviral mTTR-hG6PC (barres grises).

Les données ont été obtenues 3 mois et 7½ mois après l'induction de la déficience par traitement au tamoxifène. Les résultats sont représentés sous la forme moyenne ± SEM (L-G6pc^{+/+} : n=6 ; L-g6pc^{-/-} : n=2 ; L-G6pc^{-/-} hG6PC : n=5)

** Significativement différent des souris L-G6pc^{+/+} (Test Mann & Whitney, p<0,01)



Figure 33 : Schéma du vecteur scAAV mTTR-hG6PC

3'ITR : séquence terminale inversée répétée 3' de l'AAV

5'ITRΔTRS : séquence terminale inversée répétée 5' déléetée du motif de résolution terminale (trs) de l'AAV

mTTR : promoteur foie-spécifique, promoteur de la transthyrétine murine fusionnée à un enhancer hépatique synthétique

polyA BGH : Signal de polyadénylation du gène de l'hormone de croissance humaine

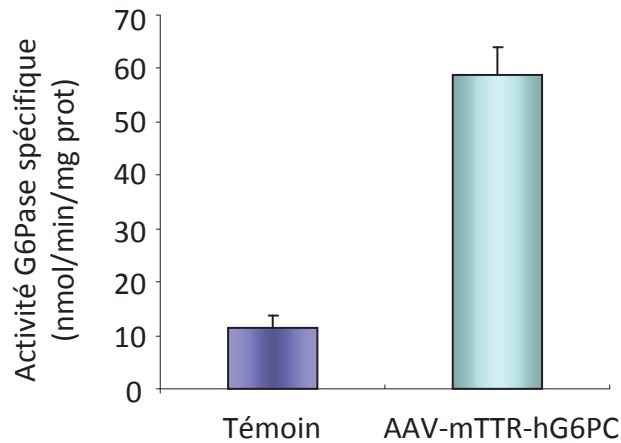


Figure 34 : Détermination de l'activité G6Pase des cellules HepG2 transfectées par le plasmide scAAV-mTTR-hG6PC

L'activité enzymatique G6Pase a été déterminée dans les cellules HepG2 témoins non transfectées (barre violette) et les cellules HepG2 transfectées par 5µg d'ADN plasmidique scAAV-mTTR-hG6P (barre bleue claire)

Les résultats sont représentés sous la forme de moyenne ± SEM (n=3)

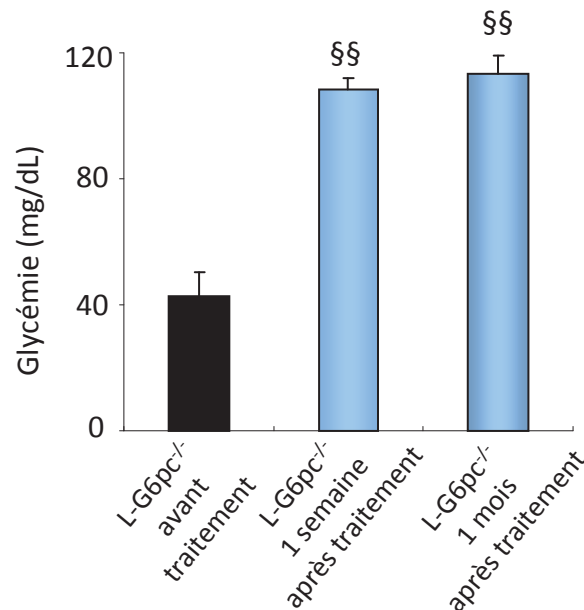


Figure 35 : Suivi de la glycémie chez les souris L-G6pc^{-/-} avant et après le traitement par le vecteur scAAV-mTTR-hG6PC mises à jeun pendant 6 heures

La glycémie a été suivie 1 semaine avant, 1 semaine après et 1 mois après l'injection systémique des vecteurs scAAV2/8-mTTR-hG6PC (dose de 1,5x10¹¹Vg/kg), chez les souris L-G6pc^{-/-}.

Les résultats sont représentés sous la forme moyenne ± SEM (n=4)

§§ Significativement différent des souris L-G6pc^{-/-} non traitées (Test Mann & Whitney, p<0,01)

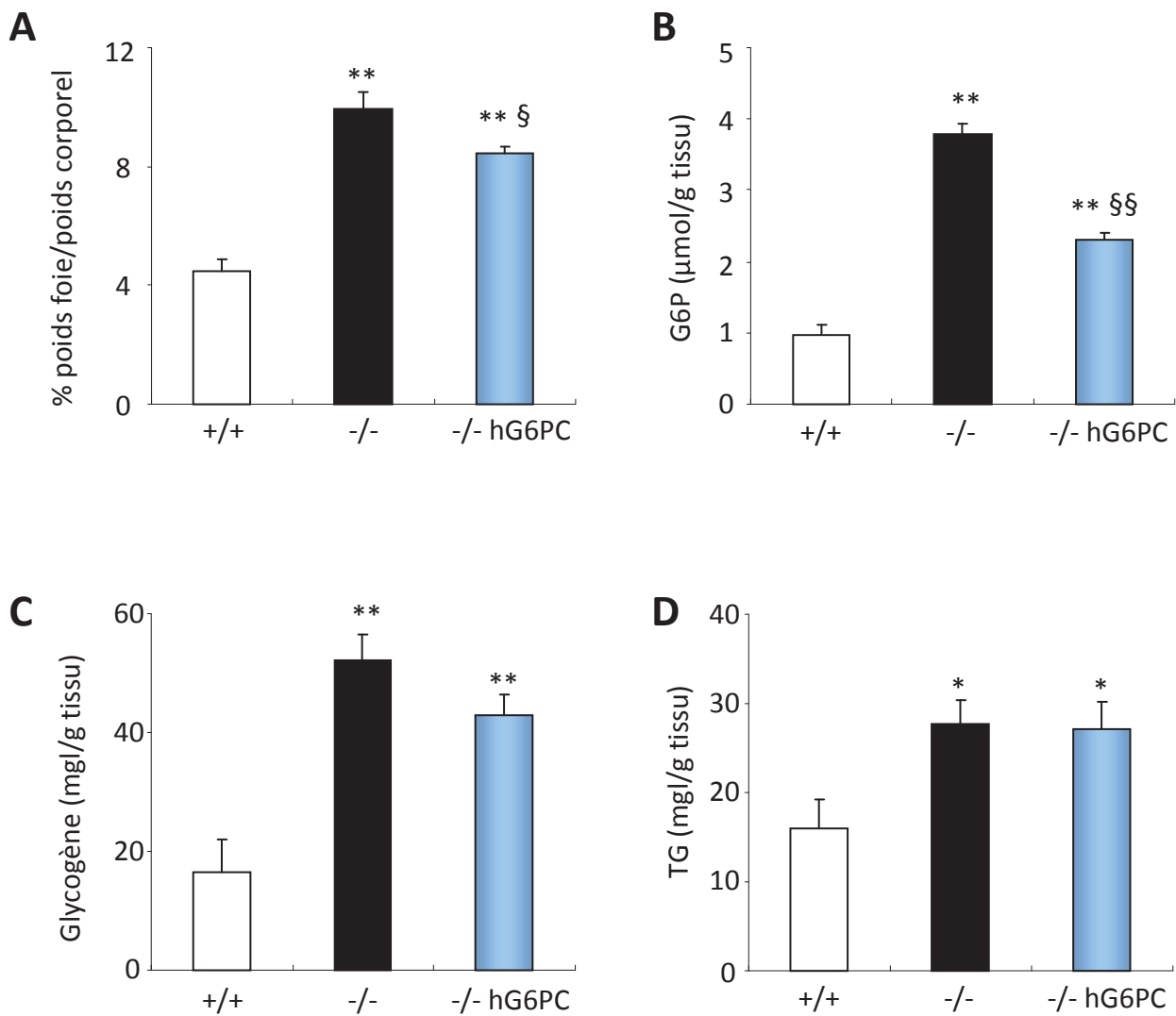


Figure 36 : Paramètres métaboliques hépatiques des souris L-G6pc^{-/-} traitées par le vecteur scAAV- mTTR-hG6PC

(A) % du poids du foie sur le poids corporel, (B-D) Contenu hépatique en G6P (B), en glycogène (C) et en triglycérides (D) des souris L-G6pc^{+/+} (barres blanches), des souris L-G6pc^{-/-} non traitées (barres noires) et des souris L-G6pc^{-/-} traitées par les scAAV- mTTR-hG6PC à la dose de $1,5 \times 10^{11}$ Vg/kg (barres bleues).

Les données ont été obtenues 1 mois après l'administration systémique des vecteurs. Les résultats sont représentés sous la forme moyenne \pm SEM (L-G6pc^{+/+} : n=4, L-G6pc^{-/-} non traitées : n=5 ; L-G6pc^{-/-} traitées : n=4)

* et ** Significativement différent des souris L-G6pc^{+/+} (Test Mann & Whitney, p<0,05 et p<0,01)

§ et §§ Significativement différent des souris L-G6pc^{-/-} non traitées (Test Mann & Whitney, p<0,05 et p<0,01)

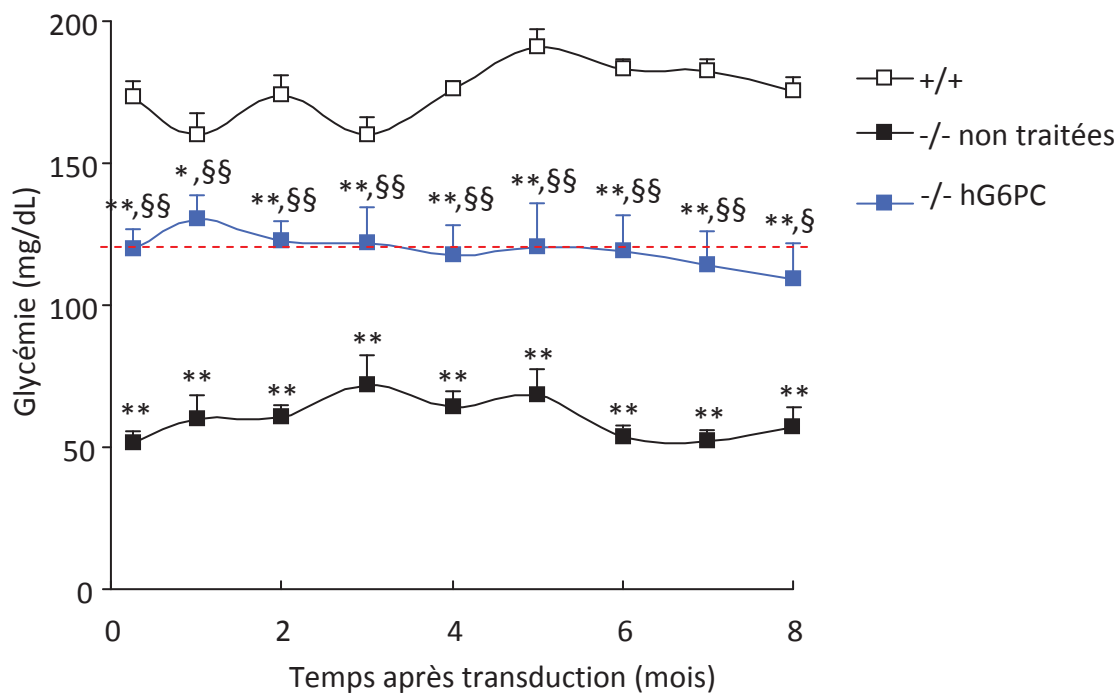


Figure 37 : Suivi sur 8 mois des glycémies chez les souris L-G6pc^{-/-} traitées par le vecteur scAAV-mTTR-hG6PC, mises à jeun pendant 6 heures

La glycémie est suivie une fois par mois, après 6 heures de jeûne, chez les souris L-G6pc^{+/+} (carrés blancs, L-G6pc^{-/-} non traitées (carrés noirs) et L-G6pc^{-/-} traitées par le vecteur scAAV-mTTR-hG6PC à la dose de 6x10¹¹Vg/kg (carrés bleus).

Les données ont été obtenues dès la première semaine après l'administration systémique des vecteurs. Les résultats sont représentés sous la forme moyenne ± SEM (L-G6pc^{+/+} : n=8 ; L-g6pc^{-/-} non traitées: n=3 ; L-G6pc^{-/-} hG6PC : n=5)

* et ** Significativement différent des souris L-G6pc^{+/+} (Test Mann & Whitney, p<0,05 et p<0,01)

§ et §§ Significativement différent des souris L-G6pc^{-/-} non traitées (Test Mann & Whitney, p<0,05 et p<0,01)

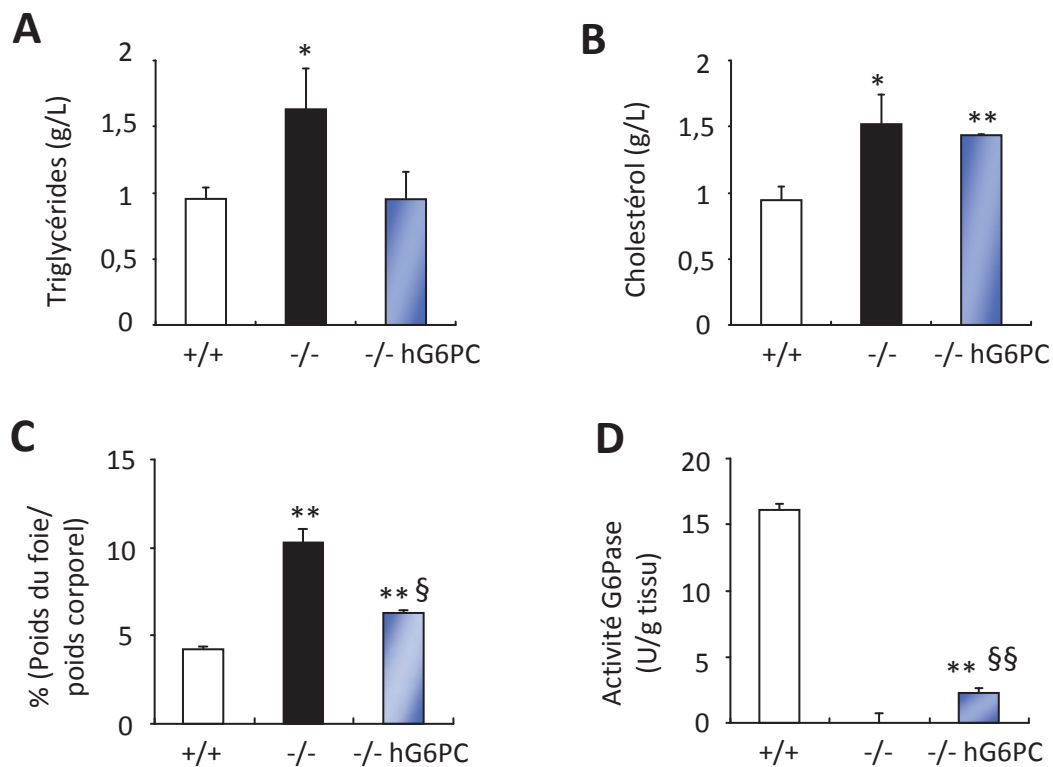


Figure 38 : Paramètres plasmatiques et hépatiques des souris L-G6pc^{-/-} traitées par le vecteur scAAV-mTTR-hG6PC

(A) Triglycérides plasmatique, (B) cholestérol plasmatique, (C) Poids du foie par rapport au poids corporel (%) et (D) activité G6Pase hépatique des souris L-G6pc^{+/+} (barres blanches), L-G6pc^{-/-} non traitées (barres noires) et L-G6pc^{-/-} traitées par le vecteur scAAV- mTTR-hG6PC à la dose de 6x10¹¹Vg/kg (barres bleues). Les données ont été obtenues 8½ mois après l'administration systémique des vecteurs à la dose de 6x10¹¹Vg/kg, chez des souris, après 6h de jeûne.

Les résultats sont représentés sous la forme moyenne ± SEM (L-G6pc^{+/+} : n=5 ; L-g6pc^{-/-} : n=3 ; L-G6pc^{-/-} hG6PC : n=4)

* et ** Significativement différent des souris L-G6pc^{+/+} (Test Mann & Whitney, p<0,05 et p<0,01)

§ et §§ Significativement différent des souris L-G6pc^{-/-} non traitées (Test Mann & Whitney, p<0,05 et p<0,01)

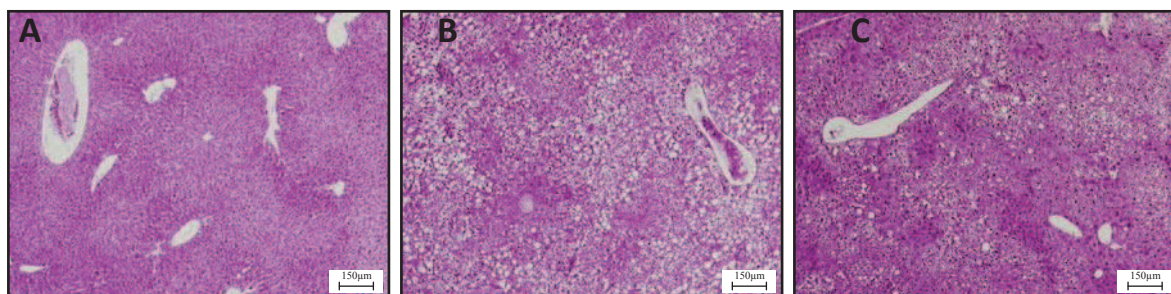


Figure 39 : Histologie du foie des souris L-G6pc^{+/+}, L-G6pc^{-/-} et L-G6pc^{-/-} traitées

Coloration H&E (Hématoxyline et Eosine) des foies des souris L-G6pc^{+/+} (A), L-G6pc^{-/-} non traitées (B) et L-G6pc^{-/-} traitées par le vecteur scAAV- mTTR-hG6PC à la dose de 6x10¹¹Vg/kg (C).

Les données ont été obtenues 8½ mois après l'administration systémique des vecteurs, chez les souris euthanasiées après 6h de jeûne.

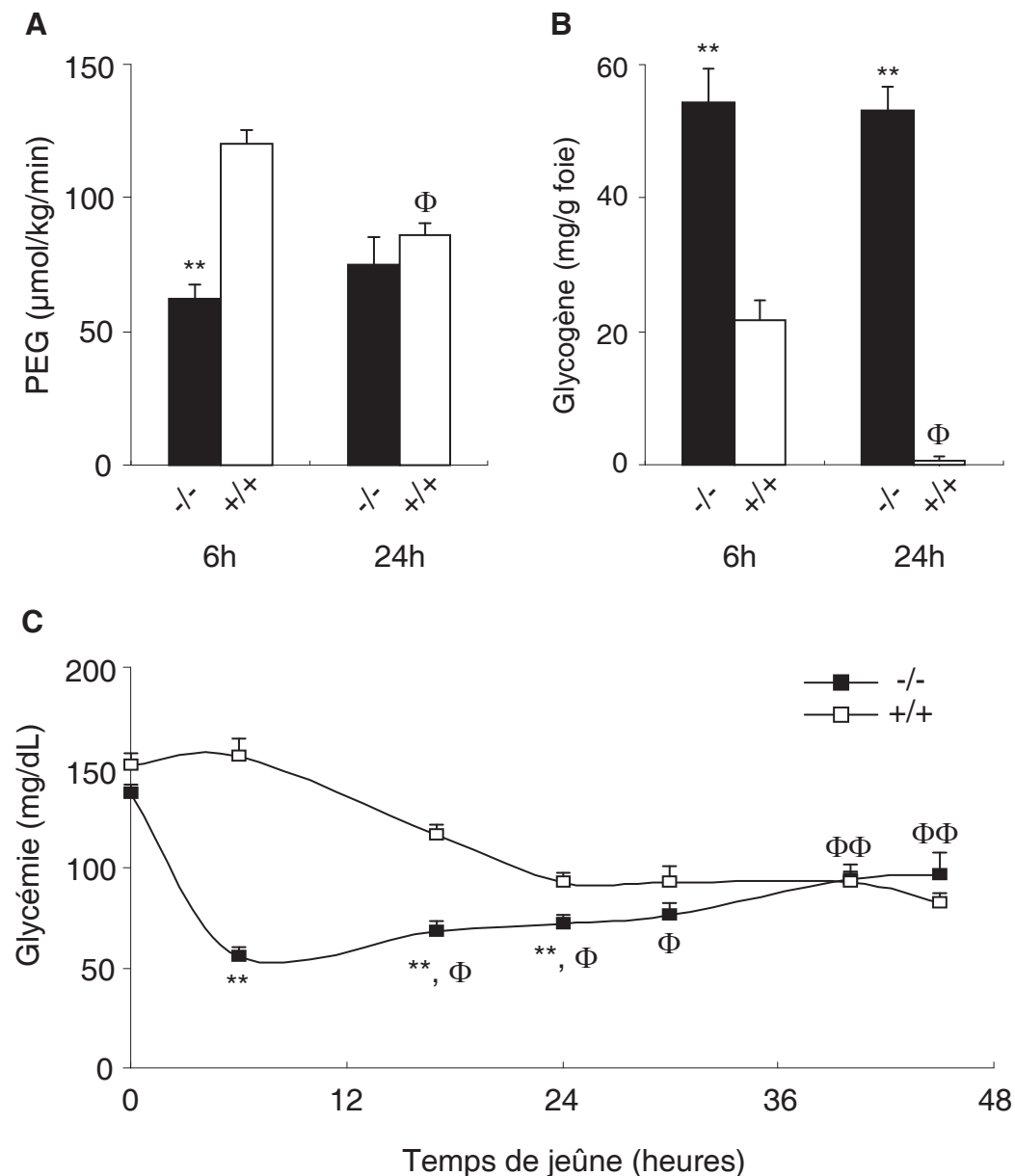


Figure 40 : La production hépatique de glucose n'est pas cruciale pour le contrôle de la glycémie au cours du jeûne prolongé

(A) La PEG des souris L-G6pc^{+/+} (barres blanches) et L-G6pc^{-/-} (barres noires) a été déterminée après 6h et 24h de jeûne (n=6 souris par groupe). (B) Le contenu en glycogène des foies des souris L-G6pc^{+/+} et L-G6pc^{-/-} a été déterminé après 6h et 24h de jeûne. (C) La glycémie des souris L-G6pc^{+/+} et L-G6pc^{-/-} a été déterminée après 0, 6, 16, 24, 30, 40 et 45 heure de jeûne. Les souris ont un accès libre à l'eau pendant le jeûne. Les données ont été obtenues 5 semaines après l'induction de la déficience. Les résultats sont représentés sous la forme de moyenne ± SEM.

** Significativement différent des souris L-G6pc^{+/+} (Test Mann & Withney, p<0,01)

Φ et ΦΦ Significativement différent de la valeur à 6h de jeûne dans chaque groupe (Test Mann & Withney, p<0,05 et p<0,01, respectivement)

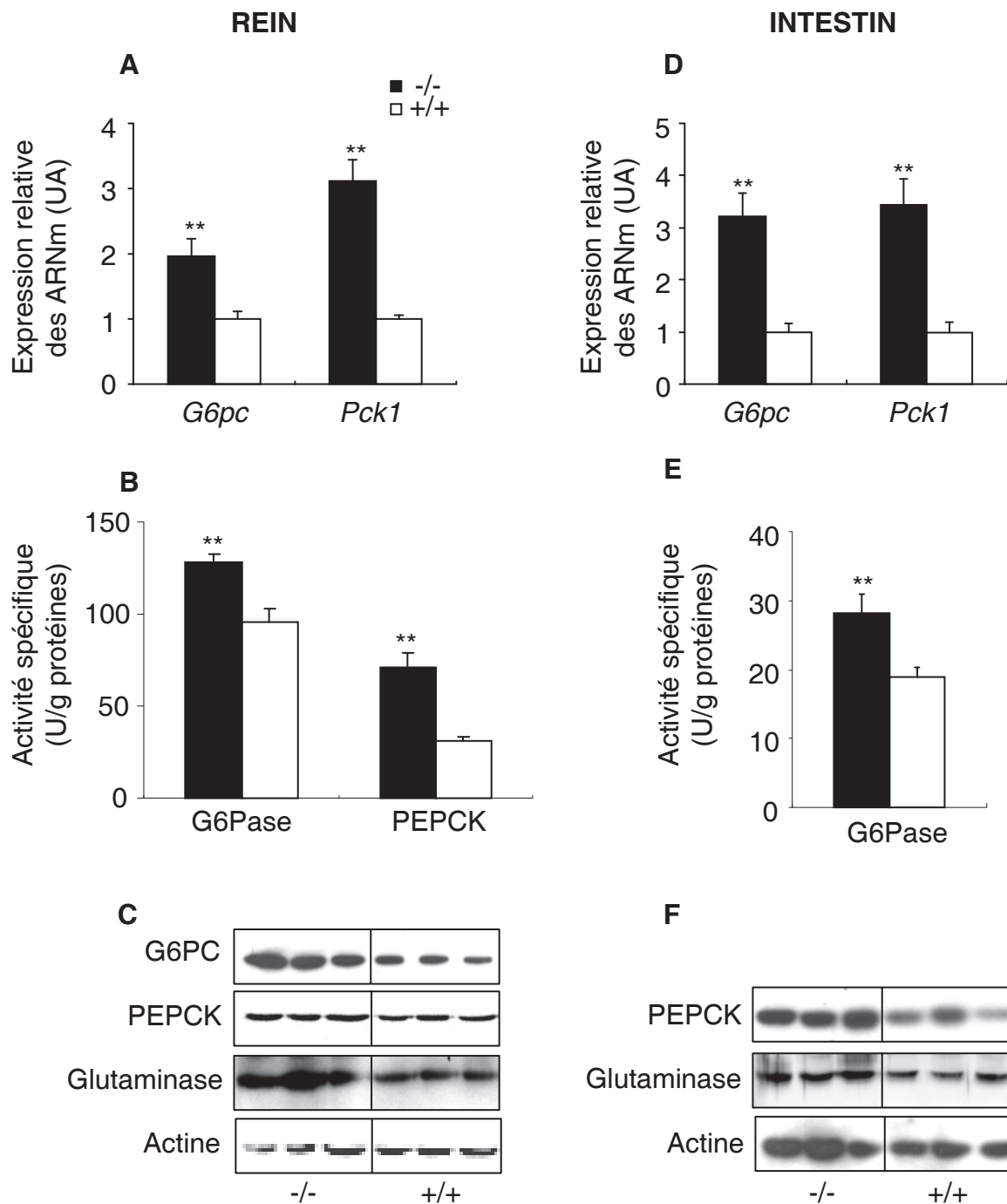


Figure 41 : Analyse des principales enzymes néoglucogéniques dans le rein (A-C) et l'intestin (D-F) des souris L-G6pc^{-/-} mises à jeun pendant 6 heures

(A & D) ARNm des gènes *G6pc* et *Pck1*, normalisés avec l'ARNm du Gène *Rpl19*, (B & E) Activités spécifiques G6Pase et PEPCK des souris L-G6pc^{+/+} (barres blanches) et L-G6pc^{-/-} (barres noires) (C & F) Analyse par western blot des protéines G6PC, PEPCK et Glutaminase chez les souris L-G6pc^{-/-} et L-G6pc^{+/+} (n=3). L'Actine est illustrée comme contrôle de charge.

Les données ont été obtenues 5 semaines après l'induction de la déficience, chez les souris mises à jeun 6 heures. Les résultats sont représentés sous la forme de moyenne ± SEM (n=6)

** Significativement différent des souris L-G6pc^{+/+} (Test Mann & Withney, p<0,01)

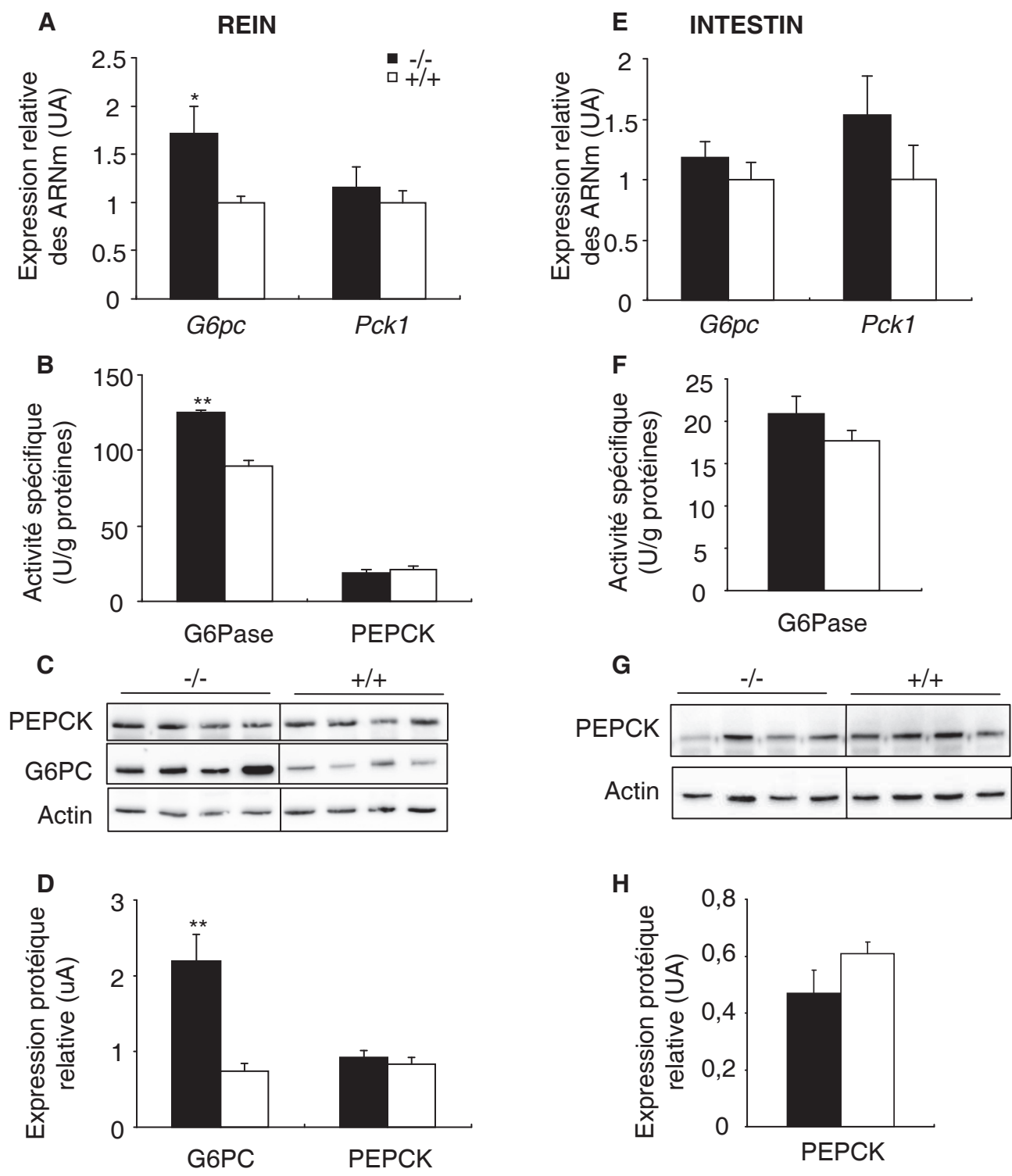


Figure 42 : Analyse des principales enzymes néoglucogéniques dans le rein (A-D) et l'intestin (E-G) des souris L-G6pc^{-/-} nourries

(A & E) ARNm des gènes *G6pc* et *Pck1*, normalisés avec l'ARNm du Gène *Rpl19* (B & F) Activités spécifiques G6Pase et PEPCK (C & G) Analyse par western blot des protéines G6PC et PEPCK chez les souris L-G6pc^{-/-} et L-G6pc^{+/+} (n=4). L'Actine est illustrée comme contrôle de charge (D & H) Quantification des western blots illustrés en C et G. Les données ont été obtenues 5 semaines après l'induction de la déficience, chez les souris L-G6pc^{+/+} (barres noires) et L-G6pc^{-/-} (barres blanches) nourries. Les résultats sont représentés sous la forme de moyenne ± SEM (n=6)

** Significativement différent des souris L-G6pc^{+/+} (Test Mann & Withney, p<0,01)

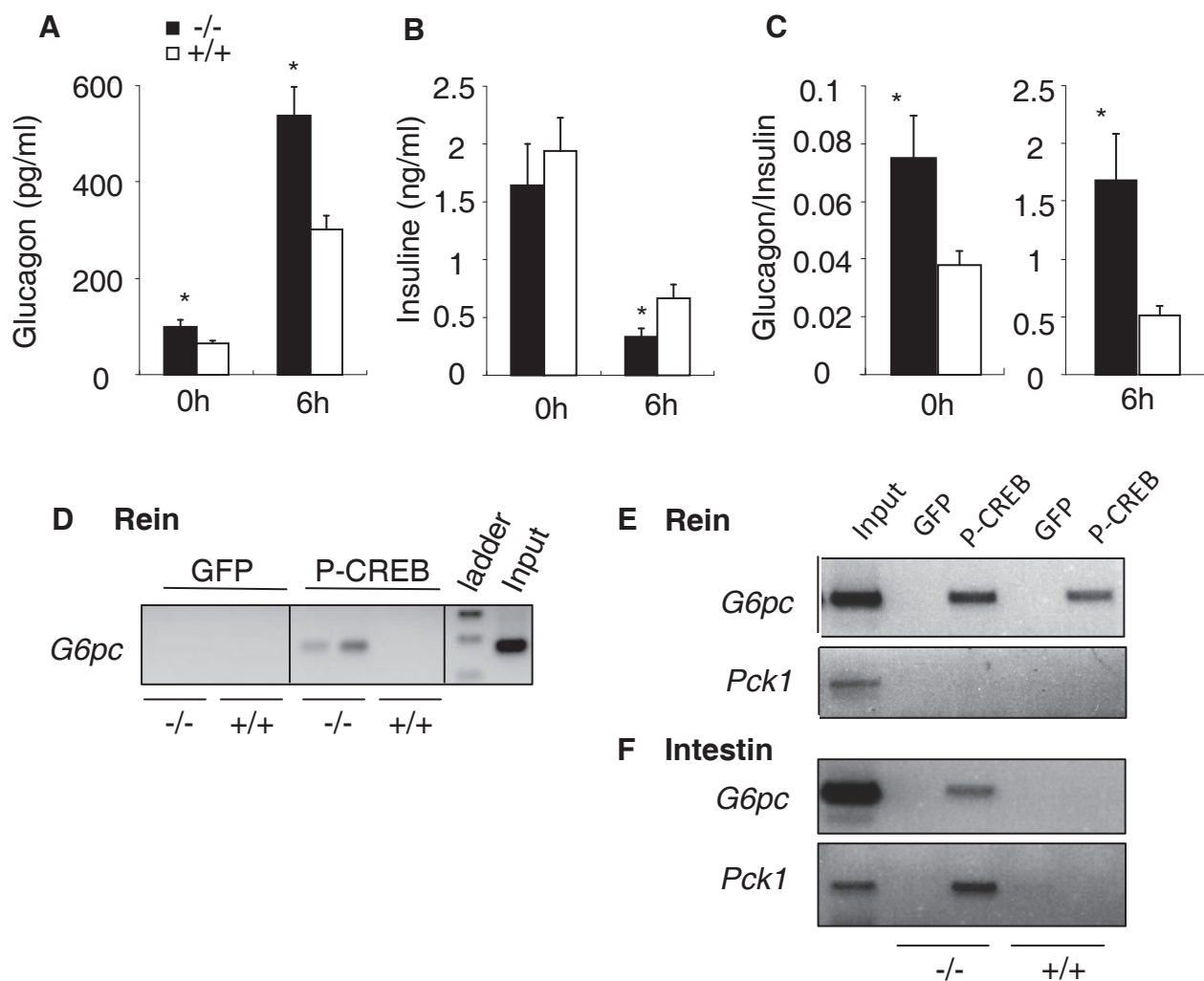


Figure 43 : Le glucagon régule l'expression des gènes dans le rein et l'intestin des souris L-G6pc^{-/-}

(A) Glucagon plasmatique (B) insuline plasmatique (C) ratio glucagon/insuline des souris L-G6pc^{-/-} (barres noires) et L-G6pc^{+/+} nourries et mises à jeun 6h. Les résultats sont représentés sous la forme de moyenne ± SEM (n=6). (D-F) La fixation de P-CREB sur les promoteurs des gènes *G6pc* et *Pck1* a été analysé par ChIP dans les reins (D-E) ou l'intestin (F) des souris nourries (D) ou mises à jeun 6h(E & F)

* Significativement différent des souris L-G6pc^{+/+} (Test Mann & Withney, p<0,05)

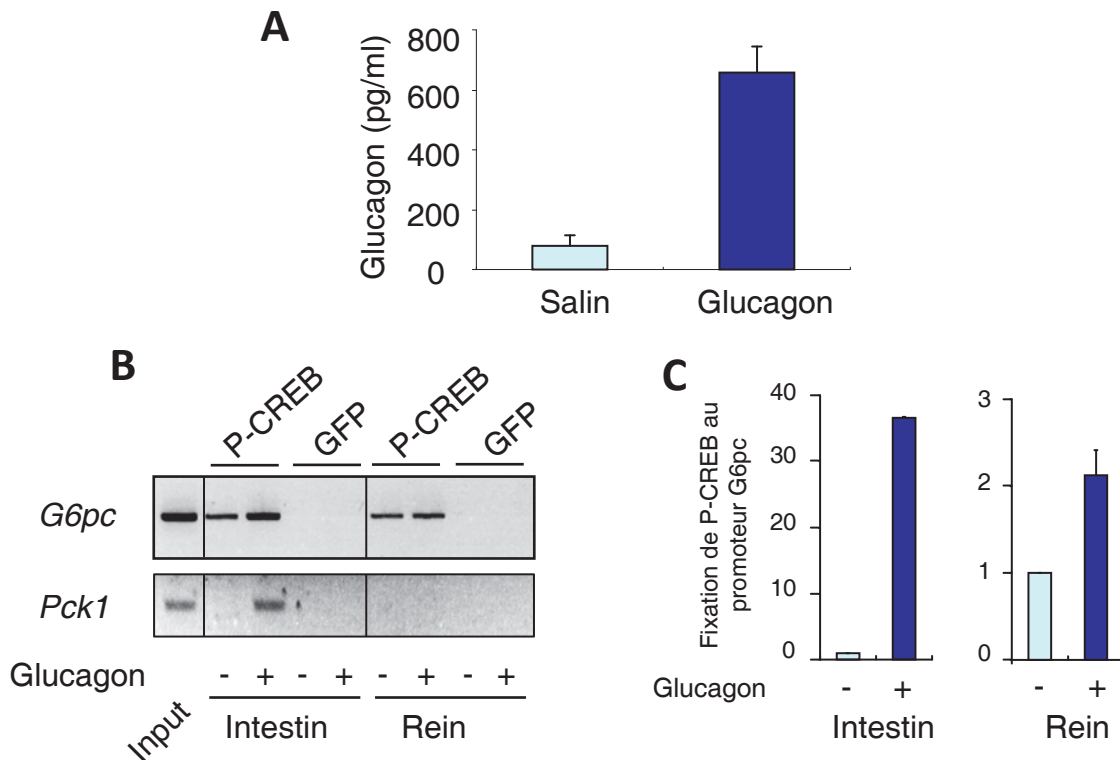


Figure 44 : Le glucagon induit la liaison de P-CREB dans les reins et l'intestin de souris L-G6pc^{+/+}

(A) Taux de glucagon plasmatique des souris témoins (Salin ; barre bleue turquoise) et des souris injectées (i.p.) avec 200 ng/g de glucagon (Glucagon; barre bleue foncée). (B) La fixation de P-CREB sur les promoteurs *G6pc* et *Pck1* a été analysée par ChIP dans le rein et l'intestin de souris 30 minutes après l'injection de salin ou de glucagon. (C) Quantification (PCR quantitative) du fragment proximal du promoteur *G6pc* sur lequel P-CREB est fixé, dans l'intestin et le rein chez des souris avec ou sans injection de glucagon. Les résultats sont exprimés en fonction de la quantité d'ADN mesurée en absence de glucagon.

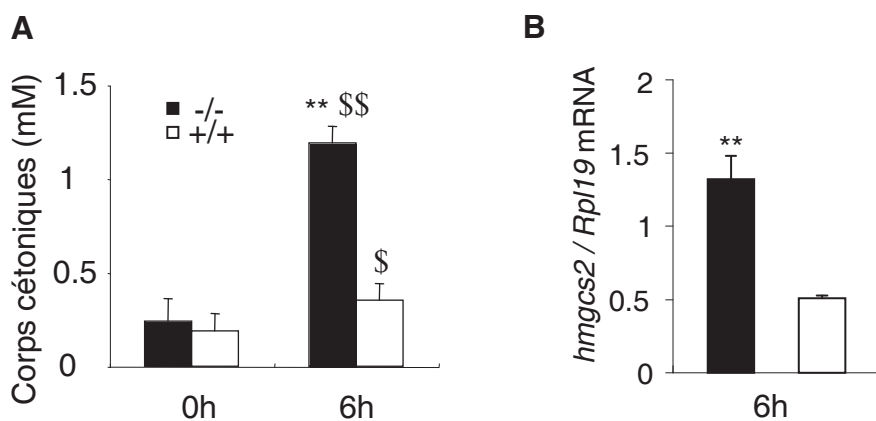


Figure 45 : Induction de la cétonogénèse chez les souris L-G6pc^{-/-} mises à jeun 6 heures

(A) Le taux de corps cétoniques plasmatiques a été déterminé chez les souris L-G6pc^{-/-} (barres noires) et L-G6pc^{+/+} (barres blanches), nourries ou mises à jeun 6h. (B) ARNm *Hmgcs2*, normalisé avec l'ARNm *Rp19* des souris mises à jeun 6h. Les résultats sont représentés sous la forme de moyenne \pm SEM (n=6)

** Significativement différent des souris L-G6pc^{+/+} (Test Mann & Withney, p<0,01)

\$ et \$\$ Significativement différent de la valeur nourrie dans chaque groupe (Test Mann & Withney, p<0,05 et p<0,01, respectivement)

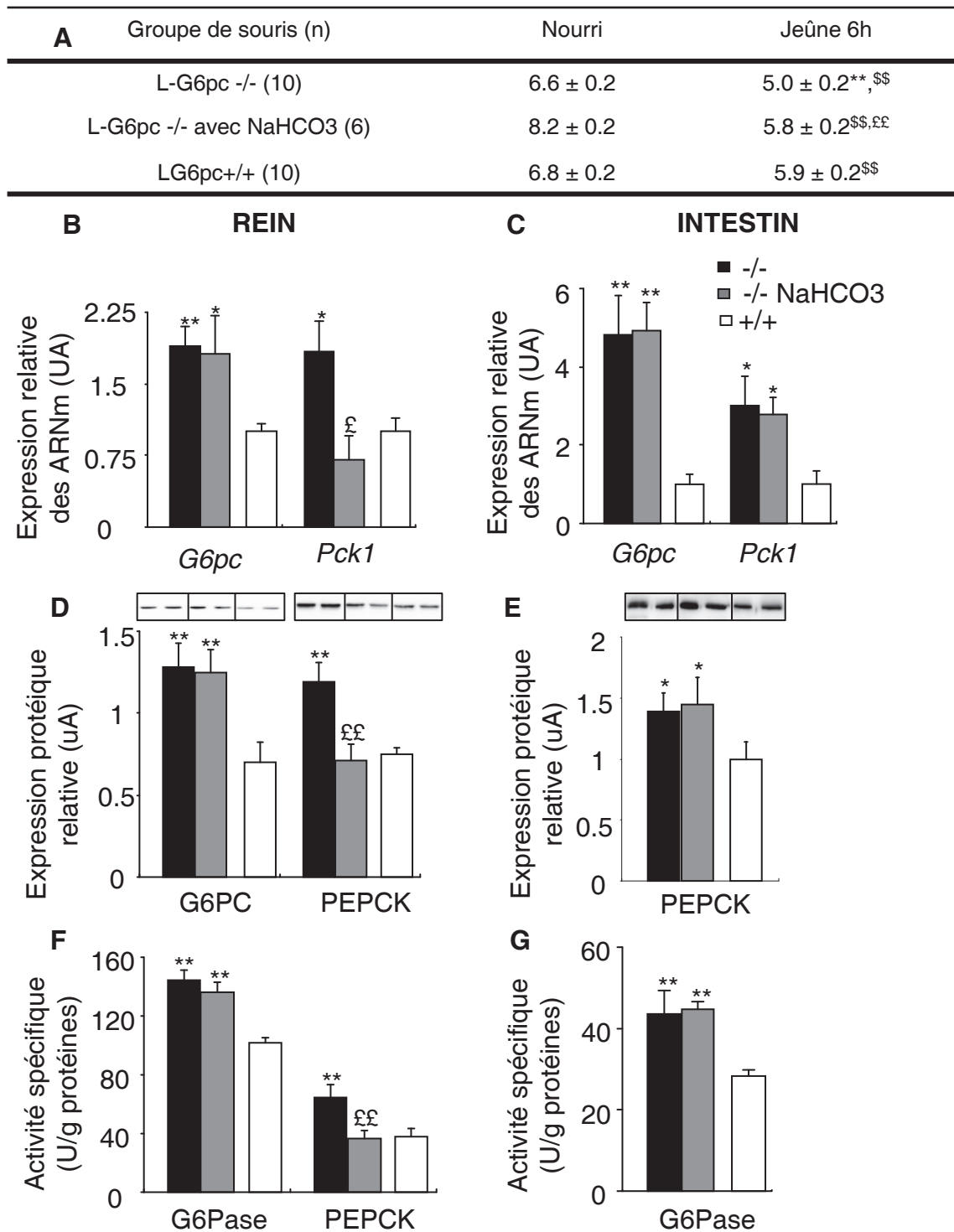


Figure 46 : La néoglucogénèse rénale des souris L-G6pc^{-/-} est régulée par l'acidose

(A) Suivi du pH urinaire des souris L-G6pc^{-/-} (barres noires), L-G6pc^{-/-} traitées avec 0,28M de NaHCO₃ dans l'eau de boisson (barres grises) et L-G6pc^{+/+} (barres blanches) à l'état nourri ou mises à jeun 6 heures. (B-C) ARNm des gènes *G6pc* et *Pck1*, normalisés avec l'ARNm du Gène *Rpl19* dans le rein (B) ou l'intestin (C) des souris mises à jeun 6h. (D-E) Analyse par western-blot et quantification des protéines G6PC et PEPCK dans le rein (D) ou l'intestin (E). (F-G) Détermination des activités enzymatiques G6Pase et PEPCK dans le rein (F) ou l'intestin (G). Les données sont représentées sous la forme moyenne ± SEM (n=5-6 souris/groupe).

** Significativement différent des souris L-G6pc^{+/+} (p<0,01) ^{\$\$} de la valeur à l'état nourri dans chaque groupe (p<0,01) et ^{££} des souris L-G6pc^{-/-} sans traitement NaHCO₃ (p<0,01)

	L-G6pc ^{-/-}	L-G6pc ^{+/+}
Nombre de souris	6	6
Glucose (mM)	3,4 ± 0,2 **	7,2 ± 0,3
Insuline (ng/ml)	0,35 ± 0,02 **	0,67 ± 0,07
Glucagon (pg/ml)	552 ± 50 **	302 ± 28
Corticostérone (ng/ml)	191 ± 19 **	71 ± 10
Noradrénaline (ng/ml)	0,43 ± 0,06	0,43 ± 0,03
Adrénaline (ng/ml)	0,36 ± 0,10	0,36 ± 0,04
Cholestérol total (g/L)	1,33 ± 0,09 **	0,89 ± 0,04
Triglycérides (g/L)	1,42 ± 0,10 **	0,78 ± 0,03
Acides gras libres (mM)	1,07 ± 0,09 **	0,69 ± 0,06
Glycérol (mg/dL)	4,3 ± 0,2	4,2 ± 0,3
Lactate	5,5 ± 0,5 **	3,5 ± 0,3
Alanine (µmol/L)	336 ± 34 **	224 ± 18
Glutamine (µmol/L)	538 ± 16 *	618 ± 26

Tableau 3 : Paramètres plasmatiques des souris L-G6pc^{-/-} et L-G6pc^{+/+}, mises à jeun 6 heures

Les données ont été déterminées 5 semaines après l'induction de la déficience, chez les souris L-G6pc^{-/-} et L-G6pc^{+/+} mises à jeun 6 heures. Les résultats sont représentés sous la forme de moyenne ± SEM (n=6).

* et ** Significativement différent des souris L-G6pc^{+/+} (Test Mann & Withney, p<0,05 et p<0,01, respectivement).

RESUME en français

La glycogénose de type 1a (GSD1a) est une maladie métabolique rare liée à une absence d'activité glucose-6 phosphatase (G6Pase). La G6Pase est une enzyme clé de la production endogène de glucose (EGP) catalysant l'hydrolyse du G6P en glucose avant sa libération dans le sang. Cette fonction est restreinte au foie, aux reins et à l'intestin. La GSD1a est caractérisée par des hypoglycémies chroniques, une hépatomégalie associée à une stéatose hépatique et une néphromégalie. A plus long-terme, la plupart des patients développent des adénomes.

Un modèle murin de GSD 1a existe mais les souris ne survivent pas après le sevrage. Nous avons donc généré un modèle original de GSD1a, en invalidant le gène de la sous-unité catalytique de la G6Pase spécifiquement dans le foie, grâce à une stratégie CRE-LOX inducible (souris L-G6pc^{-/-}).

Dans ce travail, nous avons montré que les souris L-G6pc^{-/-} sont viables et reproduisent parfaitement la pathologie hépatique de la GSD1a, y compris le développement d'adénomes hépatiques après 9 mois d'invalidation. La viabilité des souris nous a permis de débiter des traitements par thérapie génique ciblant le foie à l'aide de vecteurs lentiviraux et AAV.

La survie de ces souris, qui ne peuvent pas produire du glucose par le foie, repose la question du rôle relatif de la production hépatique de glucose dans la régulation de la glycémie. Nous avons montré que les souris L-G6pc^{-/-} sont capables de réguler leur glycémie, même au cours d'un jeûne prolongé. Ce maintien de l'homéostasie glucidique est dû à une induction rapide de la néoglucogénèse rénale et intestinale, principalement par un mécanisme dépendant du glucagon.

TITRE en anglais

Characterization of a new mouse model of glycogen storage disease type 1a: from glucose homeostasis to gene therapy

RESUME en anglais

Glycogen storage disease type 1a (GSD1a) is a rare metabolic disorder due to an absence of glucose-6 phosphatase (G6Pase) activity. G6Pase is the key enzyme of endogenous glucose production (EGP) and catalyzes the last step before the glucose release into the bloodstream. This function to produce glucose is restricted to the liver, the kidneys and the intestine. GSD1a is characterized by chronic hypoglycemia, hepatomegaly associated with hepatic steatosis and nephromegaly. The long-term complications of G6Pase deficiency include hepatocellular adenomas.

The available animal model of GSD1a rarely survive over three months of age and the study of mechanisms of hepatocellular adenomas development cannot be investigated. So, we generated an original mouse model of GSD1a with a liver-specific invalidation of catalytic subunit of G6Pase gene by an inducible CRE-LOX strategy (L-G6pc^{-/-} mice).

In this work, we demonstrated that L-G6pc^{-/-} were viable and totally reproduced the liver pathology of GSD1a, including the late development of hepatocellular adenomas. Then, we have begun liver gene therapy treatment using lentiviral and AAV vectors to correct the hepatic pathology.

Finally, concerning glucose homeostasis, we have demonstrated that L-G6pc^{-/-} were able to regulate blood glucose, during prolonged fast, even in the absence of hepatic glucose production. Rapidly, L-G6pc^{-/-} mice were able to induce renal and intestinal gluconeogenesis thanks to a key role of glucagon and the development of a metabolic acidosis. These results provide evidence that the major role of the liver for EGP during fasting requires re-examination.

DISCIPLINE : Physiologie et métabolisme

MOTS-CLES : glycogénose, glucose-6 phosphatase, production endogène de glucose, néoglucogénèse, glucagon, acidose métabolique, stéatose, adénomes hépatiques, thérapie génique, lentivirus, AAV

KEY WORDS : glycogen storage disease, glucose-6 phosphatase, endogenous glucose production, gluconeogenesis, glucagon, metabolic acidosis, hepatocellular adenomas, liver gene therapy, lentivirus, AAV

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

INSERM U855, Nutrition et Cerveau, Faculté de médecine Laennec, Bat B, 1^{er} étage, rue Guillaume Paradin, 69372 LYON Cedex 08