

OUASSILA HABI

Anémie de Fanconi
Thérapie génique par les cellules souches hématopoïétiques

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en biologie cellulaire et moléculaire
pour l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph. D.)

DÉPARTEMENT PÉDIATRIE
FACULTÉ DE MÉDECINE UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC CANADA

AVRIL 2008

Résumé

L'anémie de Fanconi (AF) est une pathologie génétique rare (1/350 000 naissances), transmise selon le mode récessif. Son tableau clinique regroupe de nombreuses malformations congénitales, une aplasie médullaire, une pancytopenie et une prédisposition accrue aux cancers. Au plan cellulaire, une mutation sur l'un des treize gènes Fanconi suffit à induire une instabilité chromosomique et une hypersensibilité aux agents pontant l'ADN. La perte de fonction des protéines Fanconi est probablement responsable du défaut d'autorenouvellement des cellules souches hématopoïétiques (CSH) et de l'état pro-apoptotique des progéniteurs médullaires. Les principaux traitements ont une très faible efficacité et induisent de dangereuses complications (toxicité, leucémies). La thérapie génique qui consiste à introduire *ex vivo* dans les CSH, une copie fonctionnelle du gène Fanconi altéré, apparaît ici comme le traitement alternatif le plus prometteur.

Les premiers travaux effectués dans le laboratoire et confirmés pas d'autres, ont montré que la correction génique *ex vivo* est néfaste pour les CSH Fanconi. Une nouvelle approche thérapeutique a été mise en place, consistant à introduire la copie fonctionnelle du gène altéré directement *in vivo*, par injection intra-fémorale (IIF). Cette technique novatrice permet de délivrer le gène dans le milieu natif des CSH, leur évitant le stress induit par la culture. Après l'IIF de virions porteurs du gène *EGFP* (*enhanced green fluorescent protein*), des analyses sanguines mensuelles montrent une augmentation régulière de la fluorescence, confirmant l'efficacité technique du transfert génique *in vivo*. L'étape suivante consistait en l'injection du gène correcteur *FancC*, en fusion avec le marqueur *EGFP* (*FancC-EGFP*), dans des souris *FancC*^{-/-}, *FancA*^{-/-} et sauvages. L'expression sanguine de la protéine FANCC-EGFP confirme la transduction de cellules médullaires. L'efficacité de correction est évaluée lors de tests de survie des souris aux injections intra-péritonéales d'un agent pontant l'ADN : la mitomycine-C (MMC), sur une période de quinze semaines. Ce traitement vise à évaluer l'effet correcteur de la transduction et la fonctionnalité de la protéine transgénique, seules les cellules corrigées seront en mesure de restaurer l'intégrité de leur ADN et de proliférer. La nature des cellules corrigées a été analysée au cours de transplantations successives. Les résultats démontrent que les CSH *FancC*^{-/-} recouvrent, après correction *in vivo*, par le transgène *FancC-EGFP*, une fonctionnalité semblable à celle des sauvages. Les résultats préliminaires obtenus dans le modèle murin aplasique confirment l'efficacité de la correction génique et sont particulièrement encourageants puisqu'ils permettent d'envisager l'IIF comme une nouvelle approche thérapeutique pour le traitement de l'AF.

Abstract

Fanconi anemia (FA) is a genetic disorder characterized by bone marrow failure, congenital anomalies, and a predisposition to malignancy. At the cellular level, a mutation on one of the thirteen Fanconi genes is sufficient to induce chromosomal instability and hypersensitivity to DNA cross-linking agents, such as mitomycin C (MMC). The loss of function of the Fanconi proteins is probably responsible of the self-renewal of hematopoietic stem cells (HSC) and the pro-apoptotic state of progenitors. Success rates of existing treatments are very low and induce dangerous complications (toxicity, leukemia). Gene therapy consists of introducing an *ex-vivo* copy of the functional Fanconi gene into HSC and thus appears to be the most promising alternative treatment.

Early studies showed that genetic *ex vivo* “correction” is harmful for Fanconi HSC. We have developed a new therapeutic approach consisting of directly introducing, *in vivo*, a functional copy of the altered gene by intrafemoral injection (IFI). This novel technique allows delivery of the gene in native HSC surroundings, thus avoiding stress induced by cell culture. After the IFI of viral particles carrying the *EGFP* (*enhanced green fluorescent protein*), a monthly blood analysis of injected mice showed increased levels of fluorescence, confirming an efficient *in vivo* gene transfer.

We then injected the *FancC* gene in fusion with the EGFP (*FancC-EGFP*) into *FancC^{-/-}*, *FancA^{-/-}* and WT mice. The expression of the FANCC-EGFP protein in peripheral blood confirmed transduction of bone marrow cells.

The efficiency of correction was then evaluated by a 15 week intra-peritoneal MMC injection. Because only corrected cells could repair their DNA and proliferate, this treatment aimed to evaluate the “correcting” effect of the transduction and the proper functioning of the transgenic protein. In addition, MMC resistance coupled with detection of the transgene in secondary recipients suggests transduction and phenotypic correction of long-term repopulating stem cells.

These results indicate that HSC *FancC^{-/-}* regain a function similar to WT cells after *in vivo FancC-EGFP* correction. Preliminary results obtained in an aplastic murine model confirm genetic correction and are encouraging thus suggesting that IFI could be a potential new treatment for FA.

Remerciements

Je remercie très sincèrement toutes les personnes qui m'ont soutenue, encouragée et entourée de leur affection, tout au long de mes études de doctorat. Merci à tous ceux qui ont fait de ce séjour un merveilleux souvenir.

En premier lieu, merci à ma famille, merci Maman, Papa, Chéfia, Kamila et Foued, pour votre amour indéfectible et votre soutien inconditionnel, malgré ces milliers de kilomètres. J'ai également une pensée particulière pour mes premières amarres québécoises, Florence et Jacques Breton, qui m'ont entourée de leur amitié et de leur bienveillance, pendant toute la durée de mon séjour, en Amérique du Nord.

Je remercie ma directrice de thèse le Dr Madeleine Carreau, de m'avoir reçue dans son laboratoire et permis de travailler sur un sujet aussi novateur, le Dr Lesveque pour son aide en matière informatique et ses multiples suggestions expérimentales. J'adresse conjointement mes remerciements aux Drs Edward Wiliam Khandjian et Yves Labelle pour leurs compétences, leurs conseils avisés, le temps qu'ils m'ont accordé et nos nombreuses discussions qui ont contribué à mon cheminement humain et scientifique. Je remercie le Directeur de Programme de biologie cellulaire et moléculaire, le Dr Michel Vincent, pour sa disponibilité, son soutien, ses conseils et sa bienveillance, tout au long de mes études doctorales. Je remercie également tous les membres de mon comité aviseur et particulièrement les Drs Real Lemieux et Robert Faure pour leurs corrections pertinentes et leurs critiques constructives.

Je n'oublie pas toutes les personnes qui ont gravité autour de moi et qui occupent une place particulière. D'une part, Justin Dupuis pour son soutien technique et moral, sa présence, son enthousiasme, ses conseils avisés, sa sagesse toute acadienne et son fameux gâteau au fromage. D'autre part, Nancy Messier, dont la compréhension n'a d'égale que la sympathie. Je conserve de merveilleux souvenirs des moments que nous avons partagés, les voyages, les glissades d'eau, les tournées gastronomiques, les bonbons qui piquent et surtout les tomates cerise. Je pense également à mes collègues et amis de laboratoire, Valérie Bourdages, Matthieu Lafrance, Manel Ben Aissa, Rahima Ziane et Christian Lessard, merci pour vos oreilles, vos mains et pour nos moments de complicité. Merci à Marie-Chantal Delisle et Chantal Godin, pour leur support technique et leur bonne humeur. Enfin, je remercie aussi tous mes amis qui m'ont encouragée et soutenue, Yasmina, Lamia, Israël, Yasmin, Zécuro, Phil, Laeticia, Annie, Christine, Doria, Sonia, Sérena, Valérie « Chocolat », Boubou et plusieurs autres. Merci de m'avoir donné la force et la volonté de continuer.

Je dois aussi remercier les organismes qui ont pourvu à mon financement et à celui des mes travaux, tout au long de mon doctorat, la Fondation de la recherche sur les maladies infantiles, le centre de recherche Saint François d'Assise et les Fonds de recherche en santé du Québec. Enfin, je remercie la faculté de Médecine de l'Université Laval, pour ses encouragements successifs, manifestés à travers les prix qui m'ont été remis.

*On ne va jamais aussi loin
que quand on ne sait pas où l'on va
C.C.*

*Tant que les lions n'auront pas leur propre historien,
les histoires de chasse continueront à glorifier le chasseur.
Proverbe africain*

Table des matières

RÉSUMÉ	I
ABSTRACT	II
REMERCIEMENTS	III
TABLE DES MATIÈRES	5
LISTE DES TABLEAUX.....	11
LISTE DES FIGURES.....	12
ABRÉVIATIONS	14
ABRÉVIATIONS RELATIVES AU CYCLE CELLULAIRE	15
CHAPITRE I.....	16
INTRODUCTION	16
1- MALADIE FANCONI.....	16
1-1 Description et caractéristiques cliniques.....	16
1-1-1 Incidences et prévalences	16
1-1-2 Description clinique	17
1-1-2-a Anomalies cellulaires.....	17
1-1-2-b Anomalies staturales.....	19
1-1-2-c Anomalies fonctionnelles.....	21
1-2 Des origines moléculaires au diagnostic de la maladie	22
1-2-1 Origines moléculaires de la maladie.....	22
1-2-2 Diagnostic de la maladie	24
1-2-3 L'aplasie médullaire	27
1-3 Rôles des protéines Fanconi	28
1-3-1 Carte d'identité des protéines Fanconi	28
1-3-2 Des rôles difficiles à cerner	34
1-4 Les traitements de l'anémie de Fanconi.....	37
1-4-1 Transfusions, cytokines et facteurs de croissance	37
1-4-2- Les traitements hormonaux	40
1-4-3 Les transplantations.....	42
1-4-3-a Allogreffes de moelle osseuse.....	42
1-4-3-b Autres stratégies de correction.....	46
1-4-4 La thérapie génique	47
1-4-4-a Principe de la thérapie génique	47
1-4-4-b Difficultés de la thérapie génique	48
2-1 Description et caractéristiques	49
2-1-1 Ontogénie des cellules souches hématopoïétiques	49
2-1-2 Caractéristiques des cellules souches hématopoïétiques	50
2-1-2-a Les cellules souches.....	52
2-1-2-b Les cellules progénitrices	55

2-1-2-c Les cellules précurseurs	55
2-1-2-d Les cellules matures.....	56
2-2 <i>Marqueurs des cellules souches hématopoïétiques</i>	57
2-3 <i>Le vecteur viral idéal</i>	61
2-3-1 Ses caractéristiques.....	61
2-3-2 Sa nature	62
2-4 <i>Les modèles Fanconi</i>	65
2-4-1 Les avantages du modèle murin	65
2-4-2 Une phénotypie très discutable.....	69
3- HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE	71
3-1 <i>Problématique</i>	71
3-1 <i>Hypothèse de recherche</i>	71
3-3 <i>Objectifs de recherche</i>	71
CHAPITRE II	73
LA THÉRAPIE GÉNIQUE <i>IN VIVO</i>	73
AVANT-PROPOS.....	73
1- INTRODUCTION	73
2- MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	74
2-1 <i>Techniques de biologie cellulaire</i>	74
2-1-1 Culture cellulaire	74
2-1-2 Transfection lentivirale.....	74
2-1-3 Transduction lentivirale.....	75
2-1-4 Cytométrie de flux.....	77
2-1-4-a Principe	77
2-1-4-b Procédure pour une acquisition sans marquage.....	78
2-1-4-c Procédure pour une acquisition avec un marquage externe.....	79
2-1-4-d Procédure pour une acquisition avec un marquage interne	80
1-2 <i>Techniques de biologie moléculaire</i>	80
1-2-1 Préparation d'ADN.....	80
1-2-2 Digestions enzymatiques.....	81
1-2-3 Électrophorèse	82
1-2-4 Transformation de bactéries compétentes	83
1-2-4-a Préparation de cellules compétentes DH5 α	83
1-2-4-b Transformation de cellules compétentes DH5 α	83
1-2-5 Polymerase chain reaction (PCR).....	84
1-3 <i>Expérimentations animales</i>	84
1-3-1 Thérapie génique in vivo par injection intraveineuse (IV).....	84
1-3-2 Thérapie génique in vivo par injection intra-fémorale	84
1-3-3 Procédures de suivi du transgène	85
1-3-4 Test de survie à la MMC in vivo	87
1-3-5 Tests clonogéniques	87
1-3-6 <i>Transplantation de moelle osseuse</i>	88
1-3-6-a Purification des cellules	88
1-3-6-b Transplantation médullaire.....	89
1-3-7 <i>Nécropsie et analyses histologiques</i>	90
2- RÉSULTATS	90
2-1- <i>Modalité de conservation des surnageants</i>	90
2-2- <i>Transduction par injection intraveineuse</i>	93

2-3- Transduction par injection intra-fémorale	93
2-3-1 Évaluation de l'efficacité technique de l'IIF	93
2-3-1-a Expression sanguine du transgène	94
2-3-1-b Expression médullaire du transgène	95
2-3-2 Évaluation de la correction génique par injection intra-fémorale	98
2-3-2-a Expression sanguine du transgène dans les souris primaires	99
2-3-2-b Expression médullaire du transgène dans les souris primaires	100
La moelle totale de souris primaires injectées non traitées à la MMC ont	103
fait l'objet de transplantations secondaires (TR1). Les souris secondaires.....	103
sont sacrifiées 7 mois plus tard et utilisées dans le cadre de transplantations.....	103
tertiaires (TR2).....	103
2-3-3 Transplantation secondaire de moelle totale de souris 1 ^{aires} complémentées.....	104
2-3-3-a Expression sanguine du transgène dans les souris secondaires.....	104
2-3-3-b Estimation de la survie des souris secondaires	105
2-3-3-c Test clonogénique sur la moelle totale de souris secondaires	106
2-3-3-d Expression médullaire du transgène dans les souris secondaires	108
2-3-4 Transplantations tertiaires de moelle totale de souris secondaires	111
2-3-4-a Expression sanguine du transgène dans les souris tertiaires	111
2-4 TRANSDUCTION PAR INJECTION INTRA-FÉMORALE ET TRAITEMENT À LA MMC.....	113
2-4-1 Évaluation de la correction génique par IIF et traitement.....	113
2-4-1-a Expression sanguine du transgène dans les souris primaires MMC- traitées.....	113
2-4-1-b Estimation de la survie des souris primaires MMC-traitées	118
2-4-1-c Expression médullaire du transgène dans les souris primaires MMC-traitées	120
2-4-1-d Coupes histologiques de sternum de souris primaires MMC-traitées.....	125
2-4-2 Transplantations secondaires de moelle totale de souris 1 ^{aires} MMC-traitées	127
2-4-2-a Expression sanguine du transgène dans les souris secondaires.....	127
2-4-2-b Expression médullaire du transgène dans les souris secondaires	131
2-3-6-c Test clonogénique sur la moelle totale de souris secondaires	132
2-4-3 Transplantations tertiaires de moelle totale de souris secondaires	134
2-4-3-a Expression sanguine du transgène dans les souris tertiaires	135
2-4-3-b Test de survie des souris tertiaires	137
3- THÉRAPIE GÉNIQUE PAR CORRECTION <i>IN VIVO</i> -DISCUSSION	137
3-1 L'administration sanguine, une veine tentative	137
3-2 Les injections intra-fémorales : parcours d'un transgène	138
3-2-1 De l'expression à l'activité biologique.....	138
3-2-2 Correction phénotypique à court terme	140
3-2-3 Correction phénotypique à long terme	142
3-2-4 Disparition du marqueur GFP	143
3-2-5 Les avantages immédiats.....	148
4- THÉRAPIE GÉNIQUE PAR CORRECTION <i>IN VIVO</i> -CONCLUSION.....	149
CHAPITRE III	152
LA THÉRAPIE GÉNIQUE <i>IN VIVO</i> DANS UN MODÈLE APLASIQUE.....	152
AVANT-PROPOS.....	152
1- INTRODUCTION	152
2- MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	153
2-1 Techniques de biologie moléculaire.....	153
2-1-1 Immunobuvardage : préparation des échantillons	153
2-1-2 Immunobuvardage : séparation par gels SDS-PAGE	153

2-1-3 Immunobuvardage : transfert par électrobuvar dage	154
2-1-4 Immunobuvardage : immunorévél ation des protéines.....	155
2-2 Expériment ations animales	155
3-RÉSULTATS	158
3-1 INJECTION INTRA-FÉMORALE ET CORRECTION GÉNIQUE DES SOURIS APLASIQUES.....	158
3-1-1 Traitement aplasiant & cohortes.....	158
3-1-2 Expression sanguine du transgène dans les souris (PT-NT).....	158
3-1-3 Expression médullaire du transgène dans les souris (PT-NT).....	160
3-1-4 Test clonogénique sur les CSH (PT-NT).....	161
3-1-5 Transplantations secondaires.....	163
3-1-5-a Expression sanguine du transgène dans les souris secondaires.....	163
3-2- Injection intra-fémorale et correction génique des souris aplasiques traitées.....	164
3-2-1 Expression médullaire du transgène dans les souris (PT-T).....	164
3-2-1-a Survie des souris (PT-T).....	166
3-2-3 Expression médullaire du transgène	169
3-2-4 Test clonogénique des CSH (PT-T).....	170
3-2-5 Examen des coupes histologiques de sternum de souris (PT-NT) et (PT-T).....	172
3-2-6 Transplantations secondaires de souris (PT-T)	175
3-2-6-a Survie post-transplantation secondaire à partir de CSH (PT-T)	175
3-2-6-b Expression sanguine du transgène dans les souris secondaires	176
3-2-6-c Expression de la protéine transgénique.....	177
4- THÉRAPIE GÉNIQUE <i>IN VIVO</i> DANS LE MODÈLE APLASIQUE-DISCUSSION	181
5- THÉRAPIE GÉNIQUE <i>IN VIVO</i> DANS LE MODÈLE APLASIQUE-CONCLUSION.....	183
CHAPITRE VI	188
PERSPECTIVES	188
BIBLIOGRAPHIE	192
CULTURE <i>IN VITRO</i> & CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES.....	215
1- INTRODUCTION	215
2- MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	216
2-1- Techniques de biologie cellulaire.....	216
2-1-1 Prélèvement des cellules de la moelle osseuse.....	216
Ces informations ont déjà fait l'objet d'une description à la section 1-3-6-a	216
2-1-2 Purification des CSH.....	216
2-2-1-a Séparation par colonne négative	216
2-2-1-b Séparation par colonne positive.....	217
2-1-3 Transduction et culture in vitro des CSH	219
2-1-4 Transplantation de moelle osseuse	219
2-1-5 Suivi de la modulation de l'expression génique.....	220
2-2- Techniques de biologie moléculaire	220
2-2-1 PCR en temps réel - Principe.....	220
2-2-2 PCR en temps réel - Procédure.....	223
2-2-2-a Extraction de l'ARN total	223
2-2-2-b Reverse transcription-PCR (RT-PCR).....	224
2-2-2-c Lancement du Q-PCR	224
3- RÉSULTATS	225
3-1 Survie cellulaire après la culture in vitro	226

3-2- Modulation de l'expression génique, après culture in vitro	226
3-2-1 Expression du transcrit CtBP1, dans les CSH après culture in vitro	227
3-2-2 Expression des transcrits Notch-1 et Hes1, dans les CSH après culture in vitro.....	228
3-2-3 Expression du transcrit HoxB4, dans les CSH après culture in vitro	231
3-2-4 Expression du transcrit cycline D1, dans les CSH après culture in vitro	232
3-2-4-a Expression du transcrit cycline D1, dans les cellules CD34 ⁻ après culture	232
3-2-4-b Expression du transcrit cycline D1, dans les cellules CD34 ⁺ après culture.....	233
3-2-5 Expression du transcrit FancA, dans les CSH après culture in vitro	235
3-2-5-a Expression du transcrit FancA dans les cellules CD34 ⁻ après culture	235
3-2-5-b Expression du transcrit FancA dans les cellules CD34 ⁺ après culture.....	236
3-2-6 Expression du transcrit FancF, dans les CSH après culture in vitro.....	237
3-2-6-a Expression du transcrit FancF dans les cellules CD34 ⁻ après culture.....	237
3-2-6-b Expression du transcrit FancF dans les cellules CD34 ⁺ après culture	239
3-3 Capacité des CSH à répondre au stimulus, lors de la culture in vitro.....	240
3-3-1 Expression du transcrit Notch-1 dans les CSH stimulées lors de culture in vitro	241
3-3-1-a Expression du transcrit Notch-1 dans les cellules Lin-Thy1.2-	241
3-3-1-b Expression du transcrit Notch-1 dans les cellules CD34 ⁺	242
3-3-2 Expression du transcrit Hes1 dans les CSH stimulées lors d'une culture in vitro....	242
3-3-2-a Expression du transcrit Hes1 dans les cellules Lin-Thy1.2-	242
3-3-2-b Expression du transcrit Hes1 dans les cellules CD34 ⁺	244
3-3-3 Expression du transcrit p21 dans les CSH stimulées lors d'une culture in vitro	244
3-3-3-a Expression du transcrit p21 dans les cellules Lin-Thy1.2-	244
3-3-3-b Expression du transcrit p21 dans les cellules CD34 ⁺	245
3-3-4 Expression du transcrit cycline D1 dans les CSH stimulées lors de culture in vitro.....	246
3-3-4-a Expression du transcrit cycline D1 dans les cellules Lin-Thy1.2-	246
3-3-4-b Expression du transcrit cycline D1 dans les cellules CD34 ⁺	247
3-3-5 Expression du transcrit cycline D2 dans les CSH stimulées lors de culture in vitro	247
3-3-5-a Expression du transcrit cycline D2 dans les cellules Lin-Thy1.2-	247
3-3-5-b Expression du transcrit cycline D2 dans les cellules CD34 ⁺	248
3-3-6 Expression du transcrit c-myc dans les CSH stimulées lors d'une culture in vitro..	249
3-3-6-a Expression du transcrit c-myc dans les cellules Lin-Thy1.2-	249
3-3-6-b Expression du transcrit c-myc dans les cellules CD34 ⁺	250
4-DISCUSSION	251
4-1 La culture in vitro fragilise les CSH Fanconi.....	251
4-2 La culture in vitro module l'expression génique.....	251
4-3 Capacité des CSH à répondre au stimulus, lors de la culture in vitro.....	254
5-CONCLUSION	261
CHAPITRE VI.....	262
ANNEXE 2	262
CTBP-1 ET HES-1 DANS LES CELLULE SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES.....	262
1- INTRODUCTION	262
2- MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	263
2-1 Polymerase chain reaction (PCR)	263
2-2 L'ARN interférent.....	264
2-2-1 Principe.....	264
2-2-2 Préparation des structures.....	265
2-2-1-a Appariement des brins shARN	265

2-2-2-b Digestion enzymatique	266
2-2-2-c Électrophorèse.....	266
2-2-2-d Purification sur gel des produits de digestion.....	267
2-2-2-e Ligation.....	268
2-2-2-f Transformation des bactéries compétentes.....	268
2-2-3 Préparation des ADN plasmidiques.....	269
2-2-4 Transfection des ARNi.....	270
2-2-4-a Transfection des shARN	270
2-2-4-b Transfection des Stealth.....	270
2-3 Immunofluorescence	271
2-4 Survie cellulaire	272
3- RÉSULTATS-DISCUSSION	273
3-1 Résultats-Discussion relative à la protéine CtBP1	273
3-1-1 ARN interférent et profil d'expression de CtBP1 : validation des constructions.....	273
3-1-2 Estimation de l'expression CtBP1, après traitement par les shARN.....	274
3-1-3 Estimation de l'expression CtBP1, après traitement par les Stealth.....	275
3-1-4 CtBP1 et résistance à la MMC	278
3-1-5 Expression du transcrit CtBP1, dans les cellules souches hématopoïétiques.....	281
3-1 Résultats-Discussion relative à la protéine Hes-1	283
3-2-1 Hes1 et résistance à la MMC.....	283
3-2-2 Expression du transcrit Hes1, dans les cellules souches hématopoïétiques	284
4- CONCLUSION.....	286
BIBLIOGRAPHIE.....	287

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : SYNDROME MALFORMATIF ASSOCIÉ À LA MALADIE DE FANCONI.....	19
TABLEAU 2 : LES 13 GROUPES DE COMPLÉMENTATION DE L'ANÉMIE DE FANCONI	23
TABLEAU 3 : PROPORTIONS RELATIVES DES CSH CHEZ LA SOURIS	61
TABLEAU 4 : MODÈLES MURINS DE L'ANÉMIE DE FANCONI	66
TABLEAU 5 : SÉQUENCE EXPÉRIMENTALE POUR LES SOURIS IIF NON TRAITÉES.....	103
TABLEAU 6 : RÉPARTITION DES SOURIS PRIMAIRES AU COURS DES TRANSPLANTATIONS	127
TABLEAU 7 : SÉQUENCE EXPÉRIMENTALE POUR LES SOURIS IIF ET TRAITÉES.....	130
TABLEAU 8 : RÉPARTITION DES SOURIS APLASIQUES AU COURS DES TRANSPLANTATIONS...	158
TABLEAU 9 : SÉQUENCE EXPÉRIMENTALE POUR LES CSH DE SOURIS (PT-T)	163

ANNEXES

TABLEAU 1: SÉQUENCES DES OLIGONUCLÉOTIDES UTILISÉS POUR LA Q-PCR.	221
--	-----

Liste des figures

FIGURE 1 : LES DEUX PREMIERS PATIENTS DU PÉDIATRE GUIDO FANCONI ⁵	16
FIGURE 2 : PREMIÈRES OBSERVATIONS CLINIQUES RÉALISÉES PAR GUIDO FANCONI	18
FIGURES 3 : MALFORMATIONS STATURALES LES PLUS FRÉQUENTES CHEZ LES PATIENTS FANCONI	20
FIGURE 4 : CASSURES CHROMOSOMIQUES INDUITES PAR L'EXPOSITION À LA MMC.....	24
FIGURE 5: FIGURES CHROMOSOMIQUES ATYPIQUES APRÈS EXPOSITION AUX AGENTS PONTANT. ...	26
FIGURE 6: SÉQUENCE DE MOBILISATION DES PROTÉINES DE LA VOIE FANCONI.....	32
FIGURE 7: ÉCHANGES CHROMOSOMIQUES EN RÉPONSE AUX DOMMAGES INTERCALANT	36
FIGURE 8: HIÉRARCHIE DES CSH MÉDULLAIRES ET DE LEURS DESCENDANTS.....	51
FIGURES 9: MODÈLES DE DIVISIONS DES CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES	54
FIGURE 10: MARQUEURS DE DIFFÉRENCIATION DES CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES	59
FIGURE 11: PHÉNOTYPES DANS LE MODÈLE MURIN DE L'ANÉMIE DE FANCONI.....	67
FIGURE 12: CARYOTYPE DE FIBROBLASTES DE SOURIS FANCONI TRAITÉS À LA MMC	68
FIGURE 13: REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU SYSTÈME DE VECTEURS LENTIVIRAUX.....	76
FIGURE 14 : PROCÉDURES DE SUIVI DU TRANSGÈNE APRÈS UNE INJECTION INTRA-FÉMORALE	86
FIGURE 15 : TRAITEMENT DES SURNAGEANTS LENTIVIRAUX ET TRANSDUCTION DE HeLa	91
FIGURE 16 : TRAITEMENT DES SURNAGEANTS LENTIVIRAUX - TRANSDUCTION DES CELLULES LT.	92
FIGURE 17 : EXPRESSION SANGUINE DU TRANSGÈNE <i>EGFP</i> APRÈS CHIRURGIE FÉMORALE.....	94
FIGURE 18 : EXPRESSION MÉDULLAIRE ⁹⁶ DU TRANSGÈNE <i>EGFP</i> SELON LE GÉNOTYPE	96
FIGURE 19 : EXPRESSION MÉDULLAIRE DU TRANSGÈNE <i>EGFP</i> EN FONCTION DU FÉMUR.....	97
FIGURE 20 : EXPRESSION SANGUINE DU TRANSGÈNE <i>FANCC-EGFP</i> APRÈS IIF	99
FIGURE 21 : PROFIL DES CELLULES MÉDULLAIRES DES SOURIS IIF NON TRAITÉES	101
FIGURE 22 : PROPORTION DES DIFFÉRENTES LIGNÉES CELLULAIRES DANS SOURIS SECONDAIRES	102
FIGURE 23 : EXPRESSION SANGUINE DU TRANSGÈNE DANS LES SOURIS SECONDAIRES	104
FIGURE 24 : TEST DE CLONOGENIQUE SUR LA MOELLE TOTALE DE SOURIS SECONDAIRES	107
FIGURES 25 : EXPRESSION DU TRANSGÈNE DANS LES ORGANES LYMPHOÏDES DE SOURIS 2 ^{AIRES}	109
FIGURE 26 : EXPRESSION SANGUINE DU TRANSGÈNE DANS LES SOURIS TERTIAIRES	112
FIGURE 27 : EXPRESSION SANGUINE DU TRANSGÈNE DANS SOURIS COMPLÉMENTÉES TRAITÉES ..	114
FIGURE 28: MODULATION DE L'EXPRESSION SANGUINE DU TRANSGÈNE <i>FANCC-EGFP</i>	117
FIGURE 29 : COURBES DE SURVIE DES SOURIS COMPLÉMENTÉES ET MMC-TRAITÉES	119
FIGURES 30: EXPRESSION DU TRANSGÈNE DANS LES ORGANES LYMPHOÏDES DE SOURIS	121
IIF ET TRAITÉES À LA MMC.....	121
FIGURE 31 : EXPRESSION DU TRANSGÈNE DANS LES LIGNÉES CELLULAIRES MÉDULLAIRES.....	122
FIGURE 32 : PCR <i>EGFP</i> SUR L'ADN GÉNOMIQUE DES ORGANES LYMPHOÏDES.....	124
FIGURE 33 : COUPES HISTOLOGIQUES DU STERNUM DE SOURIS INJECTÉES TRAITÉES OU NON.....	126
FIGURE 34 : EXPRESSION SANGUINE DU TRANSGÈNE DANS SOURIS SECONDAIRES	128
FIGURE 35 : EXPRESSION DU TRANSGÈNE DANS LES DIFFÉRENTES LIGNÉES SANGUINES.....	129
FIGURES 36 : EXPRESSION DU TRANSGÈNE DANS LES ORGANES LYMPHOÏDES DE SOURIS 2 ^{AIRES}	131
FIGURE 37 : TEST CLONOGENIQUE SUR LES CELLULES MÉDULLAIRES DE SOURIS SECONDAIRES ..	133
FIGURE 38 : EXPRESSION SANGUINE DU TRANSGÈNE DANS LES SOURIS TERTIAIRES	136
FIGURE 39 : PROCÉDURES DE SUIVI DU TRANSGÈNE APRÈS IIF DANS UN MODÈLE APLASIQUE.....	157
FIGURE 40 : EXPRESSION SANGUINE DU TRANSGÈNE DANS LES SOURIS APLASIQUES	159
FIGURE 41 : PROFIL D'EXPRESSION MÉDULLAIRE DU TRANSGÈNE DANS LES SOURIS INJECTÉES ...	160
FIGURE 42 : TEST CLONOGENIQUE DES CSH MÉDULLAIRE DE SOURIS APLASIQUES	162
FIGURE 43 : EXPRESSION SANGUINE DU TRANSGÈNE DANS LES SOURIS SECONDAIRES	163
FIGURE 44 : EXPRESSION SANGUINE DU TRANSGÈNE DANS LES SOURIS APLASIQUES TRAITÉES....	165

FIGURE 45 : SURVIE DES ANIMAUX APLASIQUES TRAITÉS À LA MMC	167
FIGURE 46 : PROFIL D'EXPRESSION DES LIGNÉES CELLULAIRES DANS UNE SOURIS LEUCÉMIQUE .	168
FIGURE 47 : TEST CLONOGENIQUE DE CELLULES DE MOELLE TOTALE DE SOURIS (PT-T).....	170
FIGURE 48 : COUPES HISTOLOGIQUES DU STERNUM DE SOURIS PRIMAIRES	172
FIGURE 49 : COUPES HISTOLOGIQUES DU STERNUM D'UNE SOURIS PRIMAIRE NON CORRIGÉE	174
FIGURE 50 : SURVIE POST-TRANSPLANTATION DES SOURIS RECEVEUSES D'UNE MOELLE (PT-T) .	176
FIGURE 51 : ANALYSE SANGUINE DES SOURIS SECONDAIRES	177
FIGURE 52 : EXPRESSION DE LA PROTÉIQUE TRANSGÉNIQUE DANS LES SOURIS (PT).....	178
FIGURE 53 : EXPRESSION PROTÉIQUE TRANSGÉNIQUE DANS LES SOURIS SECONDAIRES.....	180

ANNEXE 1

FIGURE 1 : EXPRESSION DU TRANSCRIT <i>CtBP1</i> APRÈS CULTURE <i>IN VITRO</i>	228
FIGURES 2 : EXPRESSION DES TRANSCRITS <i>NOTCH-1</i> ET <i>HES1</i> APRÈS CULTURE <i>IN VITRO</i>	229
FIGURE 3 : EXPRESSION DU TRANSCRIT <i>HOXB4</i> APRÈS CULTURE <i>IN VITRO</i>	231
FIGURE 4 : EXPRESSION DU TRANSCRIT <i>CYCLINE D1</i> APRÈS CULTURE <i>IN VITRO</i> DES CD34-.....	233
FIGURE 5 : EXPRESSION DU TRANSCRIT <i>CYCLINE D1</i> APRÈS CULTURE <i>IN VITRO</i> DES CD34+	234
FIGURE 6 : EXPRESSION DU TRANSCRIT <i>FANCA</i> APRÈS CULTURE <i>IN VITRO</i> DES CD34-.....	235
FIGURE 7 : EXPRESSION DU TRANSCRIT <i>FANCA</i> APRÈS CULTURE <i>IN VITRO</i> DES CD34+.....	237
FIGURE 8 : EXPRESSION DU TRANSCRIT <i>FANCF</i> APRÈS CULTURE <i>IN VITRO</i> DES CD34-.....	238
FIGURE 9 : EXPRESSION DU TRANSCRIT <i>FANCF</i> APRÈS CULTURE <i>IN VITRO</i> DES CD34+.....	239
FIGURE 10 : EXPRESSION DU TRANSCRIT <i>NOTCH-1</i> APRÈS STIMULATION PAR WNT3A.....	241
FIGURE 11 : EXPRESSION DU TRANSCRIT <i>HES1</i> APRÈS STIMULATION PAR WNT3A	243
FIGURE 12 : EXPRESSION DU TRANSCRIT <i>p21</i> APRÈS STIMULATION PAR WNT3A	245
FIGURE 13 : EXPRESSION DU TRANSCRIT <i>CYCLINE D1</i> APRÈS STIMULATION PAR WNT3A	246
FIGURE 14 : EXPRESSION DU TRANSCRIT <i>CYCLINE D2</i> APRÈS STIMULATION PAR WNT3A	248
FIGURE 15 : EXPRESSION DU TRANSCRIT <i>C-MYC</i> APRÈS STIMULATION PAR WNT3A	249

ANNEXE 2

FIGURES 1: CLONAGE DES SHARN DANS LE VECTEUR LENTIVIRAL PRNAT-U6.....	273
FIGURE 2: RÉDUCTION DE L'EXPRESSION PROTÉIQUE DE CtBP1 PAR SHARN	274
FIGURE 3: RÉDUCTION DE L'EXPRESSION PROTÉIQUE CtBP1 APRÈS TRAITEMENT PAR STEALTH.	275
FIGURE 4: Q-PCR DU TRANSCRIT CtBP1 DANS LES HeLa TRANSFECTÉES	277
FIGURE 5: SURVIE CELLULAIRE APRÈS TRAITEMENT AUX STEALTH <i>CtBP1</i>	279
FIGURE 6: SURVIE DES CELLULES DE PATIENTS FANCONI APRÈS TRAITEMENT À LA MMC.....	280
FIGURE 7: EXPRESSION DU TRANSCRIT <i>CtBP1</i> DANS LES LIN-THY1.2- ET CD34+.....	281
FIGURE 8: SURVIE CELLULAIRE APRÈS TRAITEMENT AUX STEALTH <i>HES1</i>	283
FIGURE 9: EXPRESSION DU TRANSCRIT <i>HES1</i> DANS LES LIN-THY1.2- ET CD34+.....	284

Abréviations

ATM	Ataxia-Telangiectasia Mutée
ARNi	ARN interférence
BRCA	Breast Cancer, ealy onset
AF	anémie de Fanconi
CD	cluster de différenciation
CFU	Colony forming unit
CSH	cellules souches hématopoïétiques
DEB	diepoxybutane
DSB	cassure double brin
FANCC	protéine Fanconi Anemia de groupe C
FancC-/-	souris knockout pour protéine Fanconi Anemia du groupe C
GVL	Graft Versus Leukemia: maladie du greffon contre l'hôte
ICL	liaison intercalante
IIF	injection intra-fémorale
LMA	leucémie myéloïde aiguë
LTS	Lin- Thy1.2- Sca1+
MMC	mitomycine-C
NFS	numérotation formule sanguine
SLN	séquence de localisation nucléaire
Q-PCR	Quantitative-PCR
QSP	quantité suffisante pour
TR	Transplantation

Abréviations relatives au cycle cellulaire

Stade G0 : hors du cycle cellulaire

Stade G1 : croissance, préparation de la réplication de l'ADN

Stade S : réplication de l'ADN

Stade G2 : croissance, préparation de la mitose

Stade M : division cellulaire

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1- Maladie Fanconi

1-1 Description et caractéristiques cliniques

1-1-1 Incidences et prévalences

L'anémie de Fanconi (AF) est une forme congénitale rare² d'anémie (1/350 000 naissances) entraînant une défaillance progressive de la moelle osseuse ou anémie aplasique³. Elle est décrite pour la première fois en 1927, par le pédiatre suisse Guido Fanconi, sur l'observation clinique de deux frères respectivement de cinq et sept ans (**figures 1 et 2**), qui présentaient un ensemble de malformations congénitales associées à une sévère défaillance de la moelle osseuse⁴.

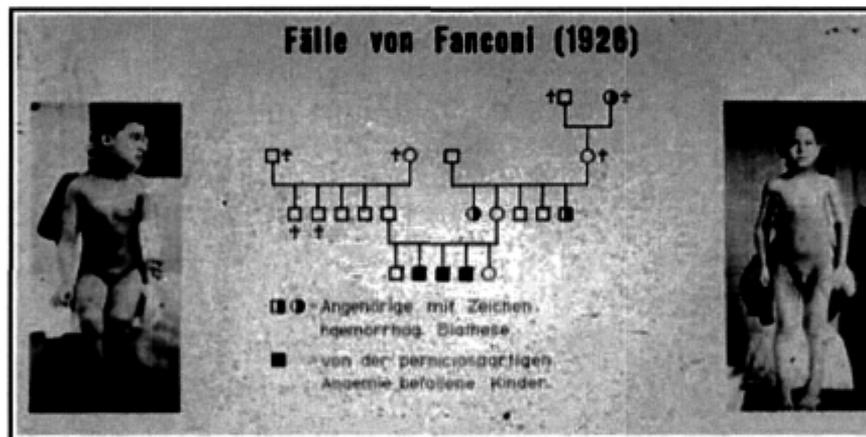


Figure 1 : Les deux premiers patients du pédiatre Guido Fanconi⁵

Photographie des deux premiers patients Fanconi et schématisation de leur arbre généalogique. Image extraite de *Nature Reviews Cancer*, 2006.

L'AF affecte de façon équivalente les hommes et les femmes, se retrouve dans tous les groupes ethniques et comme pour toute maladie récessive rare, sa fréquence est augmentée dans un contexte de consanguinité.

Un effet fondateur est ainsi retrouvé, dans certains sous-groupes de population, comme les juifs ashkénazes⁶ de la région de New-York, la population blanche Afrikaner d'origine Boër d'Afrique du Sud⁷ et la sous-population espagnole des gipsies⁸.

1-1-2 Description clinique

1-1-2-a Anomalies cellulaires

Dès les années 30, le Docteur Fanconi décrit les anomalies cellulaires par des dessins de ses observations, à une époque où la photographie microscopique n'existait pas (**figure 2**). Les premiers signes hématologiques de l'AF apparaissent en moyenne vers l'âge de 7-8 ans, sous la forme de cytopénies⁴. Le développement progressif d'une anémie aplasique médullaire sévère, retrouvée de façon systématique est directement à l'origine de pancytopenie, thrombocytopenie, neutropénie et macrocytose qui s'installent chez 90 % des patients, avant l'âge de 20 ans⁹. Cette insuffisance médullaire est consécutive à l'arrêt du fonctionnement de la moelle osseuse, dont l'examen révèle la maturation et l'apparition anormale de cellules sanguines, directement responsables de la morbidité et de la mortalité des patients¹⁰. Les conséquences sont dévastatrices pour le patient qui manque de plaquettes, de globules blancs et de globules rouges (**figure 2**). Ces cytopénies se traduisent par une élévation du risque hémorragique, faute d'une coagulation suffisante; une susceptibilité accrue aux infections en raison de la perte des défenses immunitaires et un manque d'oxygène qui affaiblit le patient. L'aplasie progressive est également associée au développement tardif de signes myéloïdes, responsables de 90 % des cas de décès répertoriés chez les patients Fanconi¹¹. L'examen de la moelle osseuse permet de détecter la présence de symptômes myélodysplasiques, qui peuvent évoluer vers une leucémie. Ce n'est parfois qu'à l'apparition de tels symptômes (LMA) que certains patients reçoivent un diagnostic. Une autre caractéristique majeure retrouvée de façon systématique est la prédisposition aux cancers, globalement plus élevée que dans la population moyenne¹². Ces cancers atypiques affectent la tête¹³, le cou¹⁴, l'œsophage¹⁵ et l'appareil génital chez les femmes¹⁶. Ces pathologies apparaissent surtout après l'âge de 20 ans, le plus souvent chez des patients ayant survécu au-delà de l'adolescence, grâce à une greffe de moelle¹⁷.

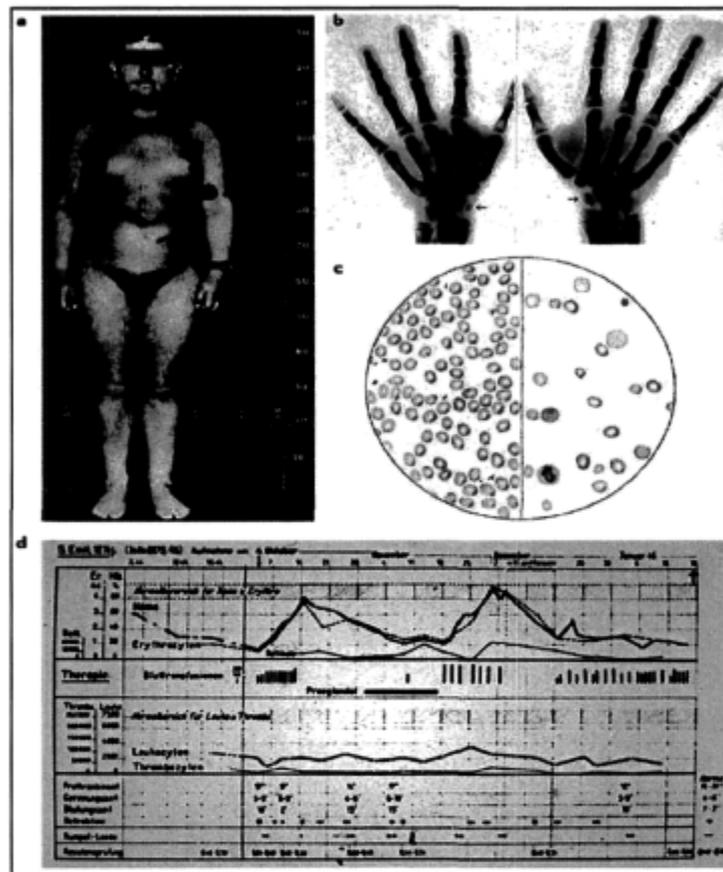


Figure 2 : Premières observations cliniques réalisées par Guido Fanconi

(a) Photographie d'un patient. C.A. de 11 ½ ans. Sévère épistaxis et anémie débutante à l'âge de 6 ans, splénomégalie causée par une panmyélocytopathie chronique. Les traitements (Prednisone, testostérone et Dianabol) ont induit une masculinisation et des changements Cushingoid.

(b) Radiographie: hypoplasie du scaphoïde à l'origine d'un raccourcissement du pouce gauche.

(c) Dessins cellulaires: à gauche: sujet contrôle avec des d'érythrocytes dont le nombre, la taille et la morphologie sont normaux. À droite: patient Fanconi dont les cellules érythrocytaires sont en petit nombre, larges et de forme irrégulière.

(d) Myélogramme: les comptes sanguins sont réduits, les paramètres de coagulation et le traitement (transfusions multiples, Praeglantol).

Image extraite de l'article *Nature Reviews Cancer*, 2006.

1-1-2-b Anomalies staturales

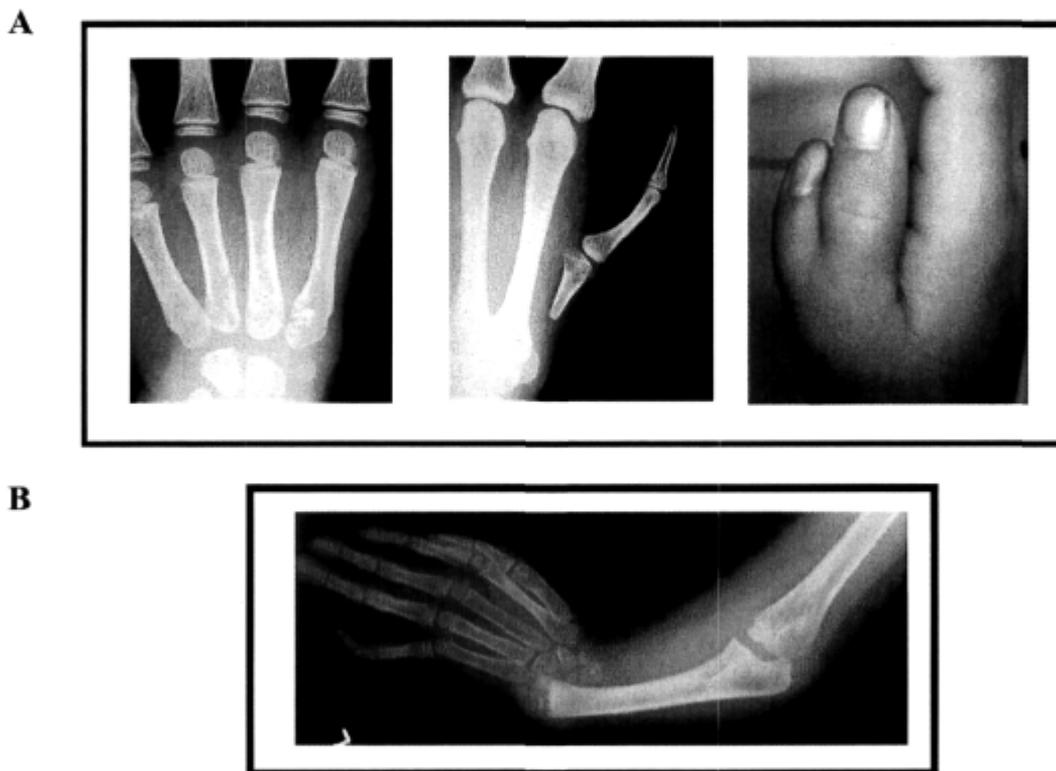
En dépit du fait que l'AF est d'abord et avant tout une maladie du sang, elle peut toucher n'importe quel système de l'organisme. Ses incidences sont nombreuses, disparates et variables selon les patients, chez lesquels elle se manifeste sous différentes formes, compliquant l'établissement d'un diagnostic. Les malformations congénitales associées sont d'autant plus difficiles à identifier qu'elles affectent une grande variété d'organes avec une grande hétérogénéité phénotypique et couvrent un large spectre d'implications physiologiques allant de la plus bénigne, à la plus grave (**tableau 1**).

Tableau 1 : Syndrome malformatif associé à la maladie de Fanconi

Syndrome malformatif	Pourcentage des patients
Troubles de la pigmentation cutanée	60-75
Tâches café au lait	
Hyperpigmentation	
Dysmorphie faciale	80-100
Retard staturo-pondéral	69-100
Retard de maturation osseuse	88
Malformations osseuses	50-64
Membres supérieurs	
Membres inférieurs	
Crâne	
Rachis	
Malformations rénales	34-50
Malformations génitales	20-50
Anomalies neurologiques	7-10
Anomalies digestives	14-20
Malformations cardiaques	10-33

Le tableau clinique est très variable d'un patient à un autre, mais également au sein d'une même famille (variabilité intra-familiale). Parmi les altérations communément répertoriées, notons celles qui affectent le squelette, les systèmes rénaux, uro-génitaux, cardiaques et plus rarement le cerveau.

Au niveau du squelette, une petite taille est très souvent rapportée, elle débute, dès la vie utérine, par un retard de croissance (retard pondéral) et se poursuit après la naissance, puisque les enfants sont également plus petits que la moyenne¹⁸ (figure 2). Le retard statural peut s'associer à des anomalies congénitales de la hanche, de la colonne vertébrale et des côtes. La colonne radiale est également affectée, les atteintes les plus courantes sont associées à une mauvaise formation du pouce qui peut être hyperplasique, bifide, surnuméraire ou absent¹⁹ (figure 3A). La formation incomplète du radius ou son absence totale est notée dans plus de la moitié des cas (figure 3B).



Figures 3 : Malformations staturales les plus fréquentes chez les patients Fanconi

(A) De gauche à droite, radiographies de pouces absent et hypoplasique, photographie d'un pouce bifide de patients Fanconi (B) Radiographie antéro-postérieure du membre supérieur montrant l'absence de radius, associée à une déviation radiale de la main. Extraits d'examens cliniques, Kerviler et al. Clinical Radiology, 2000.

Plus rarement, une hypoplasie de la scapula²⁰ et des problèmes précoces de types d'ostéoporose²¹ ont également été observés. Au nombre des manifestations cliniques les plus fréquentes figurent les dysmorphies faciales qui se présentent sous forme d'une microcéphalie²², associée un aspect particulier de la face avec un visage fin triangulaire (aspect Cushingoid) et des yeux sous dimensionnés (microphthalmie)¹³. En outre, des signes de pigmentation cutanés, tâches « café au lait », tâches achromiques et mélanodermie présents sur tout le corps, s'accroissent au cours du temps^{23,24}.

1-1-2-c Anomalies fonctionnelles

Environ un patient sur quatre souffre de troubles du système rénal²⁵, appelés «malformations rénales structurelles», qui peuvent affecter le nombre (rein unique), la position (reins pelvien, rein en rotation) ou la constitution (incomplètement formé, mal formé dit en fer à cheval ou fusionné dit sigmoïde)²⁶. Certains problèmes peuvent également intéresser l'appareil urinaire²⁷, les organes génitaux (hypogonadisme, ménopause précause)²⁸ ou le tube digestif²⁶. Dans ce dernier cas, la gravité des problèmes peut nécessiter le recours à des opérations, parfois dès la naissance, pour tenter de remédier à de graves troubles de l'estomac, de l'œsophage ou de l'intestin²⁶. Les glandes endocrines²⁹ et le système hépatique³⁰ peuvent être affectés, par une accumulation hépato-rénale du glycogène⁵ (glycogénose hépatique) et un dysfonctionnement du tube rénal proximal, se traduisant par un défaut d'utilisation du galactose²⁹. Le tableau des endocrinopathies³¹ est parfois compliqué de malformations cardiaques siégeant au niveau des tissus séparant les cavités cardiaques. Enfin, malgré la présence d'anomalies du système nerveux interne³², il n'y a, en général, pas de retard du développement psychomoteur ou intellectuel associé aux cas d'AF.

Il est à préciser que cette liste n'est ni exhaustive, ni systématique, puisqu'on rapporte un grand nombre de patients sans anomalies internes décelables. Mais ce sont des signes d'alerte, qui permettent de guider les médecins dans l'établissement d'un diagnostic d'AF.

1-2 Des origines moléculaires au diagnostic de la maladie

1-2-1 Origines moléculaires de la maladie

L'hétérogénéité phénotypique et l'extrême variabilité clinique des patients, originent très certainement d'une hétérogénéité génotypique au niveau subcellulaire. L'identification de l'étiologie moléculaire pour plusieurs sous-groupes est démontrée et reflète la sensibilité de l'AF, dont la classification génétique est établie en 13 groupes dits de complémentation³³, codés par 13 gènes uniques séquencés et clonés : *FANC-A*³⁴, *FANC-B*³⁵, *FANC-C*³⁶, *FANC-D1*³⁷, *FANC-D2*³⁸, *FANC-E*³⁹, *FANC-F*⁴⁰, *FANC-G*⁴¹, *FANC-I*⁴², *FANC-J*⁴³, *FANC-L*⁴⁴, *FANC-M*⁴⁵, *FANC-N*^{46,47}. Tous les gènes *Fanconi* sont portés par des autosomes, à l'exception du gène *FANC-B* qui est sur le chromosome X (**tableau 2**). Pour un malade donné, un seul gène est impliqué et les deux copies du gène doivent chacune porter une mutation.

Le gène le plus souvent en cause est *FANC-A* (deux tiers des patients), les mutations de *FANC-A*, *FANC-C*, *FANC-G* et *FANC-D2* représentent plus de 90 % des cas rapportés. Les autres gènes ne sont que très rarement impliqués, avec pour certains d'entre eux, moins de 1 % de malades répertoriés à ce jour.

L'identification des groupes de complémentation, est d'une importance capitale, dans l'élaboration d'un traitement adapté, que ce soit dans le cadre d'un transfert de gène ou d'une greffe de moelle autologue. Mais surtout cette caractérisation rend possible, par les techniques de biologie moléculaire, le dépistage des embryons malades.

Le modèle heuristique établi identifie certaines protéines Fanconi (*FANC-A*, *B*, *C*, *E*, *F*, *G*, *L*, et *M*) comme constituant un complexe dit "complexe core Fanconi", dont la fonction est de mono-ubiquitiner, les protéines *FANC-I*⁴² et *FANC-D2*. Une fois activée, cette dernière intervient dans les processus de réparation de l'ADN et de maintien de l'intégrité du génome^{48,49}.

Tableau 2 : Les 13 groupes de complémentation de l'anémie de Fanconi

Groupe	Fréquence	Gène	Localisation	Poids protéine
A	60-70 %	<i>FANCA</i>	16q24	163 kDa
B	<2 %	<i>FANCB</i>	Xp22	95 kDa
C	10-15 %	<i>FANCC</i>	9q22	63 kDa
D1	1-5 %	<i>FANCD1</i> <i>BRCA2</i>	13q12	380 kDa
D2	<2 %	<i>FANCD2</i>	3p25	155 kDa
E	<2 %	<i>FANCE</i>	6p21	60 kDa
F	<2 %	<i>FANCF</i>	11p15	42 kDa
G	8-12 %	<i>FANCG</i> <i>XRCC9</i>	9p13	68 kDa
I	<2 %	<i>FANCI</i>	15q25	150 kDa
J	<2 %	<i>FANCI</i> <i>BRIP1</i>	17q22	130 kDa
L	<2 %	<i>FANCL</i>	2p16	52 kDa
M	<2 %	<i>FANCM</i>	14q21	250 kDa
N	<1 %	<i>FANCN</i>	16p21	130 kDa

Chacun de 13 groupes de complémentation Fanconi correspond à un gène unique séquencé et localisé dans le génome.

1-2-2 Diagnostic de la maladie

L'hypersensibilité cellulaire aux agents pontant l'ADN est à la base du diagnostic biologique et le test de cassures chromosomiques reste aujourd'hui l'indispensable outil pour l'identification d'une AF. Parmi les agents utilisés lors d'analyses cytogénétiques, figurent la mitomycine-C (MMC)⁵⁰, le diépoxybutane (DEB)⁵¹, le cisplatine⁵², la caryolysine, le cyclophosphamide^{53,51} et dans une moindre mesure l'hydroxyurée⁵⁴. Tous ces éléments agissent en créant des pontages interbrins, au sein de la double hélice d'ADN.



Figure 4 : Cassures chromosomiques induites par l'exposition à la MMC

L'exposition des cellules Fanconi aux agents pontant (MMC) induit la formation de structures radiales (flèches rouges). Des structures tetradiales se forment, lorsque les chromatides d'un chromosome se cassent (flèches bleues) et se recollent avec les chromatides d'un autre chromosome. Figure produite par le laboratoire de services cytogénétiques de l'Université du Wisconsin.

Ce type de dommage est particulièrement délétère puisque la liaison covalente des deux brins de l'hélice, leur séparation, indispensable pré-requis aux processus vitaux de réplication et de transcription est empêchée. Ces structures sont responsables d'une extrême toxicité cellulaire, particulièrement dans des cellules dont la principale caractéristique est la prolifération.

Si le test diagnostique cherche à estimer l'existence de cassures chromosomiques spontanées, il évalue surtout l'hypersensibilité cellulaire aux agents pontant et l'augmentation de leur nombre après l'exposition. Alors que les cellules normales sont stables, les cellules Fanconi exposées à l'un de ces agents chimiques présentent un nombre élevé d'aberrations chromosomiques et une augmentation des fragmentations et des réarrangements intra et inter-chromosomes (**figure 4**).

Ces tests diagnostics sont également l'occasion d'observer l'apparition de certaines figures chromosomiques atypiques secondaires aux cassures, telles des figures tri-radiales, tétra-radiales, d'échanges et d'endo-duplication (**figure 5**), qui constituent autant de signes caractéristiques pour le cytogénéticien d'une AF. Les structures radiales se produisent dans 30 % à 100 % des cellules Fanconi traitées, alors qu'elles sont présentes à hauteur de 5 %, dans les cellules saines. Chez les Fanconi, la fréquence de recombinaison homologue, après stimulation à la MMC, varie grandement d'un groupe de complémentation à l'autre, mais également d'une famille à l'autre.

Malgré l'efficacité de tels tests, il arrive que le diagnostic clinique d'AF ne soit évoqué, qu'en état d'insuffisance médullaire avérée, réduisant alors l'éventail des stratégies thérapeutiques accessibles. Le diagnostic prénatal répond donc ici à un besoin d'identifier très tôt, durant la grossesse, un certain nombre d'anomalies foetales ou génétiques associées à l'AF.

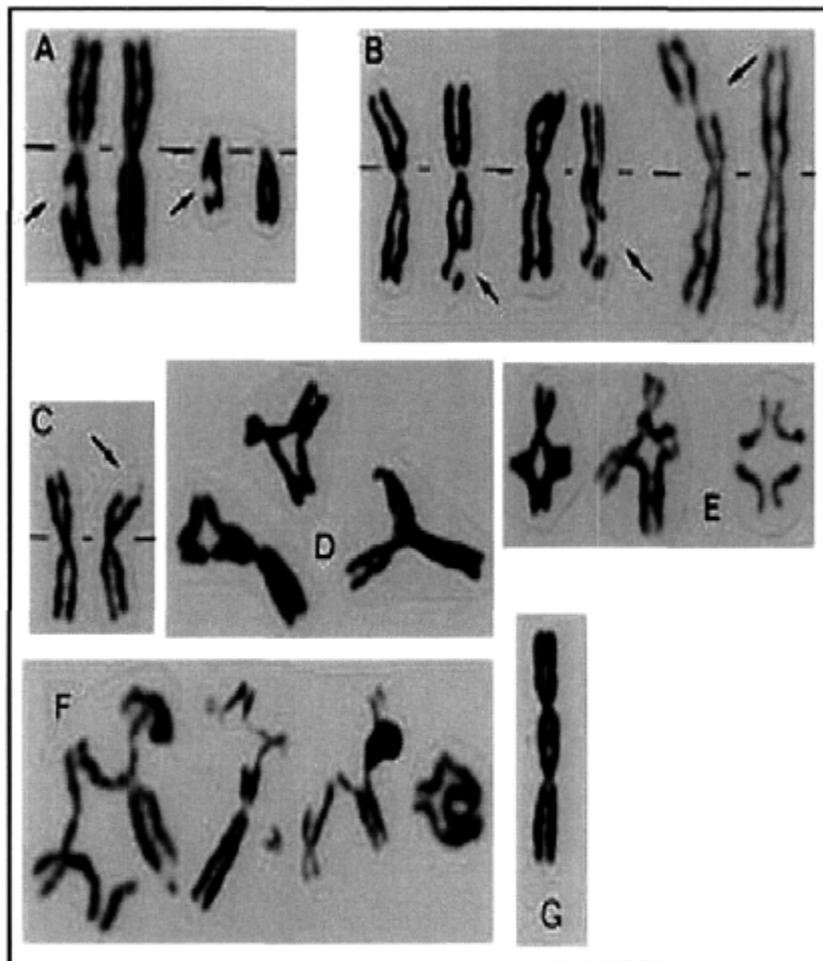


Figure 5: Figures chromosomiques atypiques après exposition aux agents pontant.

Après exposition à un agent pontant, tel la MMC, plusieurs figures chromosomiques atypiques apparaissent dans les cellules Fanconi. Ces structures témoignent d'une hypersensibilité aux effets clastogéniques des agents liants l'ADN. **A:** gap, **B:** cassures, **C:** délétion, **D:** tri-radiales, **E:** quadriradiales, (structures spontanées) **F:** figures complexes,

G: structures dicentriques. Image extraite de www.atlasgeneticsoncology.org

1-2-3 L'aplasie médullaire

L'état d'aplasie médullaire sévère est défini sur la base de critères sanguins et médullaires: une raréfaction des trois lignées myéloïdes, un dosage de neutrophiles inférieur à $0.5 \times 10^9/L$, celui des plaquettes inférieur à $20 \times 10^9/L$ et un taux de réticulocytes sous la barre des $20 \times 10^9/L$. Les critères médullaires consistent en l'identification d'un processus hématopoïétique défini par moins de 25 % de cellules myéloïdes ou de 25 à 50 % de cellules lymphoïdes, dans une moelle de cellularité réduite (> 30%). L'analyse de l'hémogramme témoigne alors d'une pancytopenie de sévérité variable, alors que les frottis sanguins peuvent signaler la présence d'une macrocytose. L'anémie est normocytaire, normochrome, parfois macrocytaire, arégénérative. La leucopénie correspond essentiellement à une neutropénie, mais peut aussi toucher les autres leucocytes. La thrombopénie habituelle peut s'avérer, dans quelques cas gravidiques. L'examen du myélogramme et médullaire révèle des signes caractéristiques et évoque l'origine centrale des cytopénies avec une moelle hypoplasique voir désertique. Ces cytopénies sont dues à l'augmentation de l'apoptose, dans les cellules hématopoïétiques^{55,56}. La dérégulation du processus apoptotique observé *in vivo*, dans les CSH Fanconi témoigne très certainement d'un défaut dans leur processus de renouvellement⁵⁶. Celles qui parviennent à survivre présentent une instabilité génomique propice au développement d'un syndrome myéloblastique et d'une leucémie myéloïde aiguë (LMA) avant l'âge de 14 ans⁵⁷, avec un risque augmenté de 800 fois. La probabilité de développer à un âge précoce d'autres tumeurs solides, (carcinomes hépatiques⁵⁸ et muqueuses épithéliales⁵⁹) est également augmentée chez les patients Fanconi. Le tableau clinique ici dressé permet d'émettre quelques suppositions quant à l'implication individuelle ou collective des protéines Fanconi dans certains des processus clés de la cellule. L'instabilité génomique à l'origine de nombreuses pathologies, suggère très clairement l'implication des gènes *Fanconi* dans la régulation du processus de réparation de l'ADN⁶⁰.

1-3 Rôles des protéines Fanconi

1-3-1 Carte d'identité des protéines Fanconi

Dans la mesure où certaines stratégies thérapeutiques reposent sur la complémentation, l'identification des gènes et des protéines incriminés est essentielle. Chacun des 13 groupes de complémentation correspond à un gène unique cloné et codant une protéine Fanconi. Ces protéines se sont révélées présenter très peu d'homologie entre elles ou avec d'autres protéines répertoriées³⁴, quelques-unes de leurs principales caractéristiques sont ici résumées.

FANC-A⁶¹, majoritairement nucléaire⁶², elle est en cause dans deux cas sur trois d'AF et constitue le groupe dont les mutations sont les plus prévalentes⁶³. Les cellules déficientes en protéine FANC-A ont des niveaux réduits de FANC-G⁶⁴. L'interaction A/G est nécessaire au maintien du niveau des deux protéines et régule l'accumulation du complexe nucléaire⁶⁵. FANC-A interagit directement avec BRCA1⁶⁶, qui en retour interagit avec des protéines impliquées, dans la réponse aux cassures double brin⁴⁸.

FANC-B³⁵ présente, dans les deux compartiments cellulaires, elle est la seule protéine retrouvée sur un chromosome sexuel, expliquant pourquoi les patients de ce groupe sont exclusivement du sexe masculin. FANC-B est un composant d'autant plus vulnérable de la machinerie cellulaire, qu'elle n'est présente qu'en copie unique en raison de l'inactivation du chromosome X.

FANC-C⁶⁷ majoritairement cytoplasmique avec une petite fraction nucléaire⁶⁸, elle constitue un élément clé du complexe nucléaire et son implication est évoquée dans 10 à 15% des cas⁶⁹.

Cette protéine multifonctionnelle⁷⁰ contrôle les voies apoptotiques induites par le TNF α et protège les CSH des dommages oxydatifs^{71,72}. Après un tel dommage à l'ADN⁷³, *in vitro* ou *in vivo*, elle est nécessaire au point de contrôle G2/M. Une exposition aux radiations ionisantes, enclenche ce point de contrôle, dans les cellules sauvages, alors que les cellules FANC-C^{-/-} perdent la capacité à maintenir le point G2. Son rôle est également évoqué dans les processus liés à l'immunité innée⁷⁴ et à l'inflammation⁷⁵, expliquant le phénotype inflammatoire des souris FancC^{-/-} et leur hypersensibilité aux chocs septiques LPS-induits. Enfin récemment des mutations de FANC-C sont retrouvées dans des tumeurs pancréatiques⁷⁶.

FANC-D1 / BRCA2³⁷ majoritairement nucléaire, elle colocalise avec le centrosome, durant la phase S et très tôt durant la phase M. Sa participation dans la régulation de la duplication et la séparation des centrosomes est suspectée, la protéine se fixe à l'ADN, lors de la réparation ou de la régulation transcriptionnelle. Ces découvertes ont permis d'impliquer BRCA2, dans la régulation du cycle³⁷, ce lien important relie la voie Fanconi aux processus de recombinaison homologue. BRCA2 est responsable des formes familiales des cancers du sein⁷⁷ et des ovaires⁷⁸. D₁ est le seul groupe de complémentation incapable de générer des foci Rad51 après un dommage à l'ADN⁷⁹.

FANC-D2³⁸ : protéine très conservée au cours de l'évolution, sa monoubiquitination (FANC-D₂ L) est requise, immédiatement après un dommage à l'ADN. Alors que les radiations ionisantes exigent en plus de la monoubiquitination, sa phosphorylation par ATM et ATR⁸⁰. La monoubiquitination de D₂ autorise sa redistribution dans les foci nucléaires où elle colocalise avec BRCA1, BRCA2, Rad51^{81,82} et intervient dans la réparation des cassures double brin^{48,83}. À la sortie de la phase S, FANC-D₂ L est déubiquitinatinée par USP1, s'en suivent une inactivation, un relargage des sites de réparation et un recyclage de FANC-D₂⁸⁴. Ses mutations sont associées aux leucémies lymphoblastiques T aiguës⁸⁵.

FANC-E⁸⁶ : préférentiellement nucléaire (motifs SLN) et grâce à son interaction avec FANC-C, elle lie le complexe-core à FANC-D₂⁸⁷. En réponse à des dommages, la phosphorylation de FANC-E, lui permet de s'associer au complexe nucléaire, de colocaliser et de monoubiquitiner FANC-D₂, qui s'assemble dans les foci pour une progression normale de la phase S.

FANC-F⁴⁰ : majoritairement nucléaire, FANC-F est un adaptateur moléculaire du complexe nucléaire. Pont entre les sous-complexes A/G et C/E, elle est essentielle à l'interaction avec les autres membres du complexe core³⁹ et à la monoubiquitination de D₂⁸⁸. Ses niveaux sont réduits, dans une majorité de cancers ovariens, diminution imputée à la méthylation de FANC-F. L'inhibition de cette méthylation (traitement au 5-ADC) réactive l'expression de FANC-F et réduit la prolifération des cellules tumorales, *in vitro* et *in vivo*⁸⁹.

FANC-G / XRCC9⁴¹, majoritairement nucléaire, il constitue un des groupes les plus communs. Dans le cytoplasme, FANC-G lie directement la SLN de FANC-A, permettant son accumulation nucléaire et le prolongement de la demi-vie du complexe core. Une délétion ou une réduction de l'expression de FANC-G augmente les risques de LMA^{90,91} et de tumeurs pancréatiques⁷⁶. L'incidence de ces pathologies chez les Fanconi est comprise entre 19 % et 32 % et varie en fonction du groupe de complémentation, les porteurs de mutations FANC-G étant généralement les plus susceptibles⁹².

FANC-I^{93,94,42,95} : substrat du groupe ATM/ATR kinases, FANC-I partage une similarité de séquence avec D2 (gène ancêtre commun). Toutes deux sont importantes à leur monoubiquitination mutuelle et à leur maintenance réciproque⁴². Le complexe FANC-I/FANC-D2 colocalise sur la chromatine en réponse aux dommages à l'ADN⁹⁴.

FANC-J⁹³ / **BRIP1**⁴³ / **BACH1**^{96,97} initialement identifiée comme hélicase impliquée dans les cancers héréditaires du sein⁹⁸. Ce qui suppose une participation directe dans un mécanisme de réparation de l'ADN⁴³, par un redémarrage de la réplication, durant la réparation des ICL ou des cassures double brin accumulées en phase G2/M. Son principal partenaire régulateur est la protéine de réplication A (RPA), qui lors de la réplication et la réparation, lie l'ADN simple brin, dans les foci nucléaires. Cette interaction potentialise l'activité hélicase en déroulant les intermédiaires de réparation de l'ADN, pour maintenir la stabilité génomique⁹⁹.

FANC-L / **PHF9**⁴⁴, dispose d'une activité catalytique E3 ubiquitine ligase *in vitro*, essentielle *in vivo* à la monoubiquitination de FANC-D₂¹⁰⁰. Certains proposent un modèle dans lequel FANC-L en liant le complexe Fanconi, participerait au recrutement d'une protéine E2 encore inconnue afin d'ubiquitiner FANC-D₂. Les niveaux de L sont réduits, lorsque la proportion de FANC-M est amoindrie⁴⁵. Son expression ubiquitaire dans le cerveau, le muscle, le coeur, les poumons, la rate, le foie, la peau, les testicules, les ovaires et l'utérus, est indicative de son importance fonctionnelle¹⁰¹.

FANC-M¹⁰² / **HEF1**⁴⁵ phosphoprotéine hyperphosphorylée en réponse à un stress génotoxique, elle est dotée d'un domaine hélicase et d'une activité de translocation⁴³. Nécessaire à l'interaction avec la chromatine, elle lie l'ADN grâce à une activité ATPasique ADN dépendante⁴⁵. Le défaut de FANC-M réduit les niveaux de FANC-A et G et plus modestement de L, au niveau du compartiment nucléaire⁴⁵, laissant supposer l'importance de FANC-M pour l'intégrité du complexe core.

FANC-N / **PalB2**^{46 47} majoritairement nucléaire elle interagit avec BRCA2, expliquant son implication dans la prédisposition au cancer du sein⁴⁶ et dans les cancers pédiatriques¹⁰³.

En résumé, les protéines FANC-C et G, à la fois nucléaires et cytoplasmiques ont des rôles doubles, puisqu'elles détectent et transmettent l'information (stress oxydatif, réplication), du cytoplasme au noyau, où elles favorisent l'assemblage et l'effectivité du complexe core constitué de 8 protéines (A, B,C, E, F, G, J, L et M), durant la phase S lors de la réplication de l'ADN ou aux sites endommagés^{104,105} (figure 6).

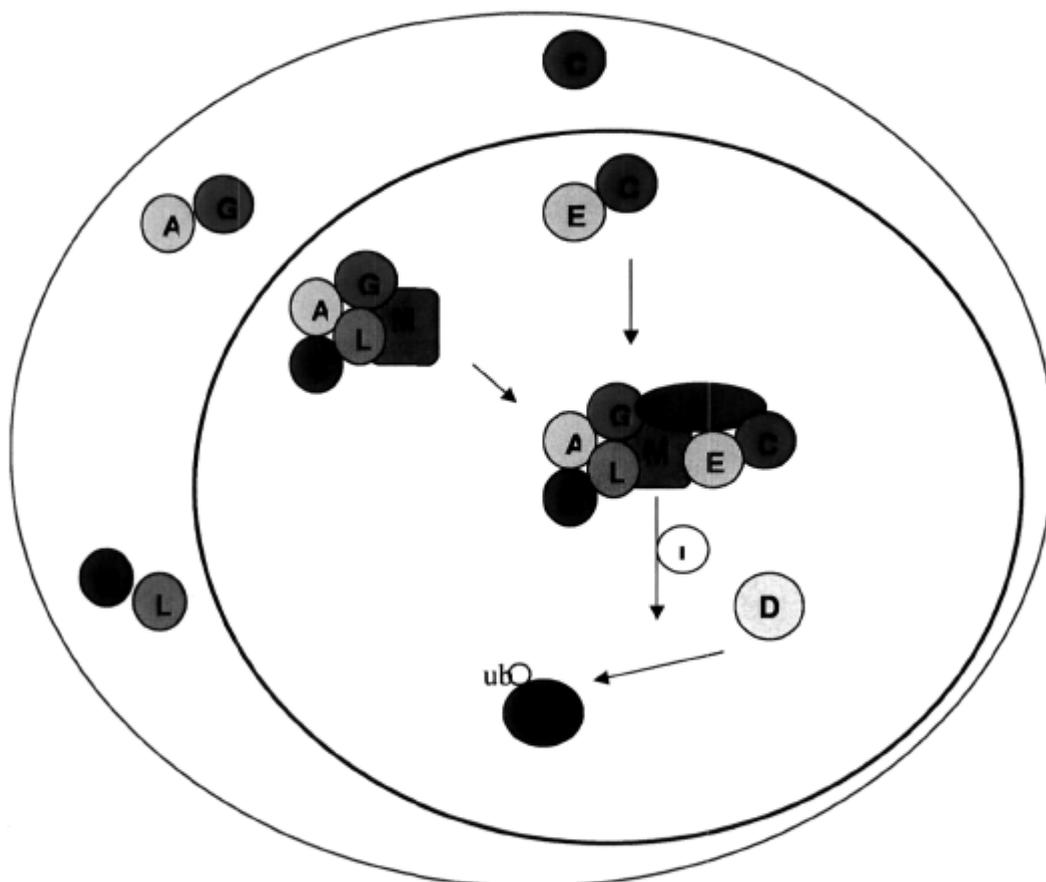


Figure 6: Séquence de mobilisation des protéines de la voie Fanconi

Lors de la réplication ou consécutivement à un dommage à l'ADN, chacune des 13 protéines Fanconi, participe selon une séquence bien définie, à la constitution d'un des trois sous-complexes Fanconi A/G, B/L et E/C qui initie celle du complexe core. Le complexe active FANC-D₂ par ubiquitination (ub) qui permet alors à D₂-L d'établir des interactions avec d'autres éléments impliqués dans la réparation de l'ADN.

Le complexe core associé à la protéine FANC-I est nécessaire à la monoubiquitination de FANC-D₂^{48,93} qui devient alors capable de s'associer à la chromatine et de s'accumuler dans les foci nucléaires. Cette migration facilite sa colocalisation avec des facteurs impliqués dans la recombinaison homologue, tels BRCA1 (forme héréditaire du cancer du sein)⁴⁸, RAD51⁸⁰, ATM, et FANC-D₁^{37,81,106} qui maintient l'intégrité du génome. Ces foci sont les sites préférentiels de réparation des ICL, la réplication y est restaurée et assurant la progression dans le cycle cellulaire¹⁰⁷.

Ces événements stabilisent les fourches de réplication bloquées ou cassées. Sans l'étape critique d'ubiquitination de FANC-D₂, les fourches de réplication brisées qui constituent une perte de la continuité chromatidienne, se collapseraient en une configuration, dans laquelle il serait encore plus difficile de redémarrer une recombinaison et induiraient des réparations aberrantes (association de terminaisons non homologues).

Le complexe Fanconi promeut donc l'intégrité chromosomique en veillant à ce que les dommages oxydatifs pouvant survenir, durant la réplication de l'ADN soient rapidement restaurés^{108,109}.

Une seule mutation sur l'un des treize gènes *Fanconi* suffit à perturber la formation d'un complexe fonctionnel^{86,110} et nuit à l'activation complète de la voie Fanconi, altérant du même coup les associations protéiques subséquentes. Il demeure aujourd'hui encore, des patients qui n'appartiennent à aucun des groupes de complémentation ci-énoncés. Cette réalité suggère que le modèle de la voie Fanconi pourrait être complété, par l'ajout de plusieurs autres groupes de complémentation. L'identification d'une ou de plusieurs endonucléases, une ou des polymérase ainsi que des protéines de remodelage de l'ADN renforcerait le scénario d'une implication de la voie Fanconi, dans la réparation de l'ADN et plus précisément dans les situations de liaisons intercallantes (ICL).

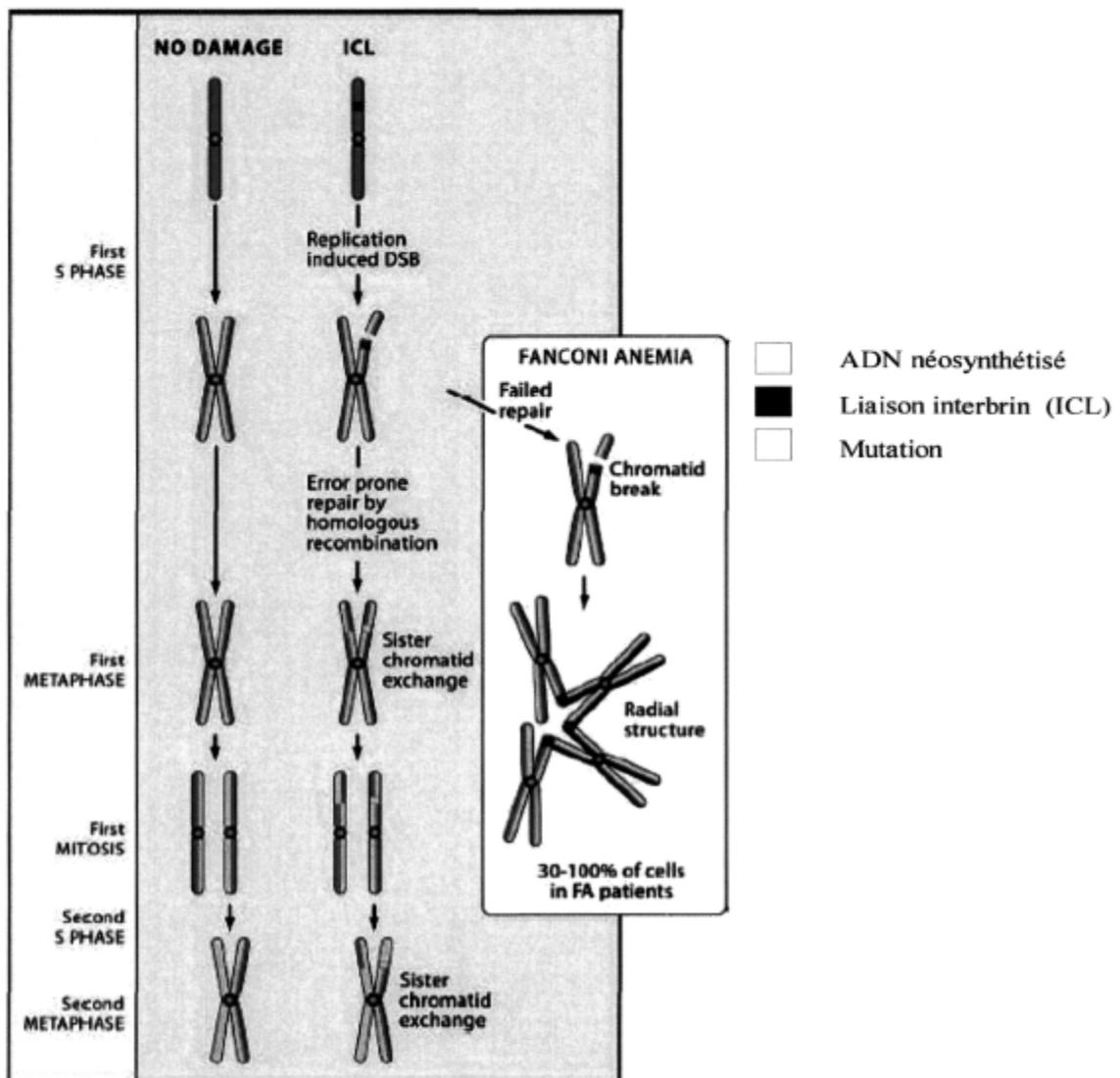
1-3-2 Des rôles difficiles à cerner

L'intégrité du génome revêt une importance capitale, tant dans le maintien de la viabilité cellulaire que dans la prévention de transformations néoplasiques. Ce principe de base semble pourtant biaisé dans le contexte Fanconi, en témoignent les manifestations cliniques (mortalité cellulaire accrue, tumorigenèse) et les conséquences hématologiques (cytopénies, aplasie). Bien que très étudiés, les détails du fonctionnement de chacune des protéines Fanconi sont encore mal connus. Pourtant les premières données suggèrent leur importance, dans la maintenance de l'intégrité du génome tant au niveau des sources endogènes, qu'exogènes de dommages à l'ADN. Comme le suggèrent les tests diagnostics, l'implication des protéines Fanconi est sans équivoque, dans plusieurs champs d'investigation majeurs que sont les processus de réparation de l'ADN⁶⁰, durant la phase S du cycle cellulaire, consécutivement à un stress génotoxique^{33,111} ou simplement dans les cellules en division¹¹². Les autres champs impliqueraient ces protéines dans le contrôle de la machinerie du cycle cellulaire¹¹³, du statut redox de la cellule¹¹⁴⁻¹¹⁷ et de l'apoptose^{118,114,55,119,120}. Des fonctions additionnelles leur ont également été attribuées, dans la modulation des signaux médiés par les cytokines¹²¹, la sensibilité au stress oxydatif¹²² ou le remodelage de la chromatine¹²³.

Dans les lignées cellulaires Fanconi, des défauts de recombinaison homologue et de stabilisation de la fourche de réplication sont rapportés¹²⁴. Ces procédés impliquent la formation de jonctions Holladays¹²⁵ et concourent à identifier la voie Fanconi comme essentielle à la réparation des dommages à l'ADN⁴⁴. Dès lors, il devient aisément compréhensible que le phénotype des cellules de patients inclue de façon systématique une sensibilité aux dommages causés par les agents « cassants », le stress oxydatif et l'élévation du processus apoptotique. Dans les cellules Fanconi, le point de contrôle G2 est intact contrairement à la phase S, justifiant qu'après l'exposition à un stress génotoxique, la majorité des cellules Fanconi se maintienne en phase G2 prolongée, en raison de la persistance des dommages endogènes.

Dans ce cas, la création de liaisons covalentes interbrins empêche leur séparation, lors des processus répliatif et transcriptionnel. Dans les cellules sauvages, la réplication d'un ADN contenant de telles structures induit des cassures double brin (DSB)^{126,127}, chez les Fanconi elle entraîne la mort cellulaire. Les liaisons interbrins sont également des composantes inductrices de recombinaison homologue, survenant pendant la réplication de l'ADN¹²⁸. Ces échanges réciproques de matériel entre les chromatides soeurs se produisent habituellement entre séquences homologues et plus rarement entre séquences non homologues, dans les cellules sauvages. Dans le cas des Fanconi, ces échanges se font entre séquences non homologues et dans des proportions nettement augmentées (**figure 7**).

L'hypersensibilité à certains agents pontant et l'inaptitude à réparer les défauts induits à l'ADN proviennent de l'incapacité des cellules Fanconi à activer les points de contrôle du cycle cellulaire. Ces défauts sont directement à lier avec la principale caractéristique de l'AF, l'aplasie médullaire. Le déficit hématopoïétique sévère observé chez tous les patients, laisse supposer l'implication des protéines Fanconi dans le processus d'autorenouvellement^{129,130}, de prolifération^{129,130} et de survie des CSH et des progéniteurs médullaires. Si cette implication est logiquement explicable, elle n'a toujours pas été clairement démontrée. Le rôle exact des protéines Fanconi lors du processus hématopoïétique normal et dans le maintien de l'homéostasie du système reste un défi. Bien que les différentes protéines Fanconi aient des activités individuelles distinctes au sein du complexe, le phénotype universel de l'aplasie médullaire est commun à tous les groupes, la similitude des phénotypes cliniques présuppose la participation de ces protéines à un même réseau métabolique majeur. Les interactions qu'elles établissent au cours de ces mêmes processus, les mécanismes enzymatiques qu'elles activent ou répriment ne sont pas connus précisément. Par ailleurs, une corrélation stricte entre la gravité de la maladie et les gènes en cause ou le type de mutation de ces gènes n'est pas évidente à ce jour.



Extrait de L.J. Niedernhofer *et al.*, Cell, 2005

Figure 7: Échanges chromosomiques en réponse aux dommages intercalant

La réplication de l'ADN duplique le matériel et crée une chromatine soeur (phase S). Si l'ADN chromosomique contient des liaisons intercalantes (ICL, barre bleue), la réplication est bloquée générant des cassures double brin (DSB) qui sont normalement réparées par recombinaison (RE) homologue. Les ICL peuvent être à l'origine de mutation (barre dorée). Dans de rares cas (<5 %) dans les cellules normales, un DSB induit par les ICL persiste (cassure chromosomique). Les DSB sont alors éliminés par RE avec une séquence non homologue d'autres chromosomes, créant des structures radiales. Chez Fanconi, le traitement par des agents pontant induit entre 30 % à 100 % d'ICL, dues à une augmentation de la fréquence des recombinaisons non homologues.

1-4 Les traitements de l'anémie de Fanconi

Si l'AF reste une maladie incurable, de nombreux traitements sont disponibles et permettent d'agir à divers niveaux pour remédier aux problèmes immédiats des patients. Tous les traitements qui sont ici évoqués ne constituent en aucun cas des « remèdes », mais véritablement des traitements palliatifs provisoires qui ralentissent l'évolution de la maladie; les patients finissant, dans un délai plus ou moins court, par ne plus y répondre.

1-4-1 Transfusions, cytokines et facteurs de croissance

Chez tous les organismes supérieurs, les cellules sanguines matures ont une durée de vie limitée et font l'objet d'un renouvellement continu, qui s'opère dans la moelle osseuse des os longs, avant l'âge de 5 ans et dans les os courts et plats après.

De façon à compenser l'urgence imminente que représente le manque de globules rouges et de plaquettes, une première stratégie emploie le potentiel immédiat des transfusions sanguines. Les patients peuvent recourir à ce traitement périodiquement, sur une durée relativement longue, les seules limitations étant restreintes au groupe sanguin. Les effets secondaires consistent en une accumulation de fer, potentiellement nocive au fonctionnement de certains organes, à une stimulation accrue du système immunitaire, à l'origine à terme de la destruction des cellules transfusées.

Il est également possible d'agir sur le renouvellement et la différenciation des cellules sanguines. En exploitant les capacités modulatrices, des facteurs de croissance hématopoïétiques ou CSF (*colony-stimulating factor*). D'origine synthétique sont utilisés sur certains types cellulaires précis. Plusieurs ont déjà montré leur efficacité au cours d'essais cliniques et sont aujourd'hui d'usage courant sur les patients Fanconi.

L'*interféron γ (IFN γ)* ou interféron immunitaire est une cytokine immunorégulatrice non génotoxique, produite par les lymphocytes T (CD4⁺ et CD8⁺) et les cellules *natural killer* (NK).

Son utilité thérapeutique est démontrée pour les patients atteints de l'AF^{131,132}, particulièrement après l'apparition de pathologies telles les LMA, lymphomes, myélomes, mélanomes, cancers (urologiques, tumeurs primaires du cerveau et carcinomes ovariens)¹³³.

En se fixant sur des récepteurs membranaires spécifiques, cette lymphokine active la synthèse de protéines impliquées dans la protection virale, l'activité phagocytaire des macrophages, l'activation des neutrophiles et des cellules NK, elle stimule la maturation des lymphocytes T et B, augmente la production d'anticorps et l'expression des molécules HLA de classe I et II par les macrophages. Son utilisation est également suggérée comme stratégie non génotoxique, lors de la préparation des patients avant une procédure de transplantation^{134,135}. Bien que l'IFN permette une rémission partielle des patients, il est très toxique et source d'effets secondaires dose-dépendants au nombre desquels la fièvre, les céphalées, des frissons et des myalgies. Mais d'autres conséquences plus graves, tels des troubles du rythme cardiaque, des déséquilibres neuropsychiatriques sont rapportés¹³⁶.

Le *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)* sécrété par les macrophages, les lymphocytes T, les cellules endothéliales et les fibroblastes, il dynamise en quelques jours la prolifération, la différenciation des cellules myéloïdes, et la transformation des cellules souches myéloïdes en CFU-GEMM (*colony forming unit, granulocyte erythroid, macrophage, monocyte megacaryocyte*), puis en thrombocytes, polynucléaires neutrophiles, monocytes et macrophages, éosinophiles et basophiles¹³⁷. Les patients Fanconi bénéficient de ce traitement généralement, après une transplantation de moelle osseuse, afin d'accélérer la récupération du système myéloïde et traiter les leucopénies induites par la chimiothérapie¹³⁸. Il accroît les fonctions antimicrobiennes des polynucléaires neutrophiles (adhésivité, chimiotactisme, phagocytose), des éosinophiles et des macrophages et augmente leur activité antitumorale. De plus, cette cytokine a la propriété de préserver les CSH de l'apoptose^{139,140}. Ses effets ont été observés quelque soit le groupe de complémentation.

Une splénomégalie, un état grippal, des épanchements pleuraux et péricardiques sont les principaux effets indésirables de ce traitement. Le risque d'augmentation de prolifération tumorale est également signalé.

Le *granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)* est libéré par les macrophages, les cellules endothéliales et les fibroblastes. Sa concentration extrêmement faible, dans le sérum des sujets normaux, s'élève chez les sujets Fanconi en proie à une infection ou à une aplasie médullaire¹⁴¹, en favorisant la différenciation et la maturation, tente de contrecarrer deux des principaux défauts d'un organisme Fanconi.. Principal effet indésirable des traitements anti-néoplasiques, la neutropénie diminue la capacité de défense de l'organisme contre les infections. L'administration du G-CSF est parfaitement indiquée dans le traitement des neutropénies spontanées ou induites par des chimiothérapies anticancéreuses. Il favorise la différenciation, la prolifération et la maturation de la lignée granulocytaire et promeut la transformation des CFU-G (colony forming unit granulocyte) en polynucléaires neutrophiles, dont il augmente la capacité migratrice et l'activité phagocytaire. Une injection quotidienne par voie sous-cutanée ou intraveineuse, pendant une dizaine de jours, suffit à observer une amélioration générale de la formule sanguine des patients Fanconi¹⁴², où les neutrophiles et les plaquettes sont augmentés de façon significative¹³⁸. Les effets secondaires recouvrent des douleurs osseuses, des dysuries et des modifications de certains paramètres biologiques (élévation des phosphatases alcalines, de l'activité de la lactate déshydrogénase). L'administration prolongée multiplie le risque d'apparition d'une hémopathie maligne.

Le *Stem Cell Factor (SCF)* est une glycoprotéine régulatrice, au rôle clé dans des mécanismes aussi variés que le développement des mastocytes, la mélanogénèse, la gamétogénèse et l'hématopoïèse via les cytokines (IL-3, GM-CSF). Un effet anti-apoptotique est rapporté dans les CSH, par l'induction de la voie de Jak2¹⁴⁰. Médiateur crucial pour la survie, la croissance et le fonctionnement des CSH les plus primitives, c'est dans ce cadre que les praticiens y ont recours pour les patients Fanconi¹⁴².

L'action de la protéine SCF, médiée par la liaison au récepteur c-Kit, majore la croissance des progéniteurs érythroïdes de 70 %¹⁴³, ce qui suggère fortement le recours à cette molécule, pour le traitement de nombreux défauts hématologiques, quelle que soit leur origine.

1-4-2- Les traitements hormonaux

Plusieurs autres traitements palliatifs existent, au nombre des médicaments que nous citerons figurent certaines hormones de croissance, des stéroïdes et autres molécules capables de stimuler la moelle osseuse. Au premier chef desquelles figure l'érythropoïétine (EPO)¹⁴⁴, hormone d'origine rénale qui stimule la synthèse d'hémoglobine et augmente le nombre de réticulocytes. Son action agit à différents stades de la maturation des érythrocytes, dans la moelle osseuse et dans le sang périphérique, en favorisant la transformation des CFU-E (*colony forming unit erythroid*) en proérythroblaste et la transformation de ces derniers en érythrocytes. Sa forme recombinante utilisée en thérapeutique est indiquée dans le traitement des anémies après chimiothérapie, ainsi que pour les patients ne répondant pas aux androgènes. Chez les patients Fanconi¹⁴⁵, les doses d'EPO sont administrées proportionnellement à la sévérité de l'anémie. Cependant, là encore les effets sont limités dans le temps.

Androgène est le terme générique désignant généralement une hormone stéroïde, dont l'action est médiée par la liaison à des récepteurs spécifiques. Le recours aux androgènes (testostérone) est souvent indiqué en cas d'impossibilité d'une greffe médullaire. Les androgènes utilisés en clinique, regroupent des molécules telles que l'oxymétholone et la noréthandrolone.

Pendant un temps, l'oxymétholone avive la production et l'excrétion urinaire d'érythropoïétine, accroît le nombre de globules rouges chez les patients anémiques et stimule l'érythropoïèse, dans les anémies avec un défaut de production d'érythrocytes. Cette molécule dope la production de globules rouges mais aussi celle de plusieurs autres cellules sanguines, améliorant, d'une façon qui reste à déterminer et sur une période variable, la numérotation de la formule sanguine (NFS). Malgré une efficacité avérée permettant la prolongation de l'espérance de vie de près de 75 % des patients Fanconi, ces traitements n'entraînent qu'une rémission transitoire de la défaillance de la moelle.

À longue échéance, les patients peuvent de ne plus y répondre et surtout une anémie sévère risque de se manifester. Le recours aux androgènes peut avoir de sérieuses conséquences secondaires: effets masculinisants, problèmes cardiaques et pathologies hépatiques (tumeurs)^{146,147}.

L'utilisation de l'ensemble de ces facteurs de croissance hématopoïétiques peut conduire, chez les patients Fanconi, au sur-développement des cellules déjà transformées. Par ailleurs, il est avéré qu'une moelle aplasique est un des symptômes précurseurs de la survenue de désordre pré-leucémiques (aberrations clonales). Le maintien d'une surveillance est donc vivement recommandé chez les malades, particulièrement lorsqu'un traitement aux facteurs de croissance hématopoïétiques est maintenu à longue échéance.

L'ensemble des traitements présentés jusqu'ici ne constitue que des mesures transitoires, des thérapeutiques palliatives souvent appliquées dans l'attente d'une greffe de moelle ou en cas d'impossibilité de cette dernière. Par ailleurs, ces traitements ne sont pas pleinement satisfaisants sur le long cours, soit en raison d'un effet transitoire, soit pour les conséquences qu'ils induisent¹⁴⁸. Le recours à d'autres techniques souvent plus invasives est donc requis.

1-4-3 Les transplantations

Les transplantations sont nées, au début des années 70, grâce aux travaux de deux grands précurseurs français que sont le Pr Georges Mathe¹⁴⁹ et le Pr Jean Dausset¹⁵⁰. Leurs découvertes ont permis, au Pr Donald Thomas de réaliser en 1974, aux États-Unis, les premières greffes de moelle osseuse, sur des patients leucémiques en phase terminale à partir d'un greffon compatible¹⁵¹. La transplantation reste aujourd'hui le seul traitement curatif des manifestations hématologiques liées à la défaillance médullaire des patients Fanconi.

1-4-3-a Allogreffes de moelle osseuse

L'allogreffe de moelle osseuse se définit par la provenance du greffon médullaire, issu d'un donneur sain différent du patient receveur. Depuis 1995, la greffe allogénique de CSH a permis à plus de 80 % des patients Fanconide survivre, au-delà de 2 ans^{152,153}. Pourtant, seule une proportion réduite (25 % à 30 %) dispose de donneurs compatibles et peut se prévaloir de cette stratégie.

L'allogreffe peut être réalisée, dès que le diagnostic de la maladie est posé, sans traitement préalable lors de déficit immunitaire ou d'aplasie médullaire. Les greffons peuvent provenir de trois sources, CSH médullaires¹⁵⁴, circulantes dans le sang périphérique¹⁵⁵ ou issues du sang de cordon ombilical¹⁵⁶. Pour éviter la réaction du greffon contre l'hôte, la recherche du plus haut degré de compatibilité HLA (antigène d'histocompatibilité) entre le donneur et le receveur est la condition *sine qua non*. Cette compatibilité tissulaire est évaluée selon des critères très précis, où le donneur et le receveur ont de 0 à 6 antigènes HLA en commun, plus ce chiffre est élevé, meilleur est le pronostic théorique de la greffe (réduction du rejet et du traitement immunosuppresseur). La compatibilité HLA étant primordiale, le recours à la moelle d'un des membres de la fratrie du patient est toujours privilégié¹⁵⁷, les chances de succès sont alors de 80 %.

Cependant, les probabilités statistiques de disposer d'un donneur au sein d'une fratrie dépendent du nombre de frères et sœurs et sont évaluées à environ 25 %. Si le patient ne dispose pas de fratrie ou s'il n'existe pas de donneur parmi eux, le recours aux CSH provenant de la moelle d'un donneur non apparenté (donneur volontaire inscrit sur un fichier)¹⁵⁸ ou de sang de cordon d'origine familiale ou non apparentée (banque de sang de cordons)^{159,160} peut être envisagée, mais la probabilité de succès de la transplantation chute alors à 30 %. Le pronostic de guérison par une greffe est meilleur chez les patients jeunes, en bon état clinique, souffrant d'anémie aplasique sans complications et n'ayant pas ou peu reçu de transfusions sanguines¹⁶¹. Ces dernières réduisant de 50 % le succès de la greffe¹⁶².

La procédure relative à la greffe de moelle osseuse chez les patients Fanconi est relativement comparable à celle communément d'usage pour d'autres maladies. La moelle osseuse du donneur sain est introduite, dans le corps du patient, après destruction de sa moelle défectueuse, pour permettre à la moelle osseuse saine du donneur de se développer. Jusqu'à récemment, les greffes de moelle à partir de donneurs non apparentés ou partiellement compatibles, ne donnaient pas de bons résultats. Aujourd'hui, grâce aux améliorations des méthodes de conditionnement¹⁶³⁻¹⁶⁶, les patients Fanconi peuvent aujourd'hui en bénéficier et voient leur taux de survie amélioré de 75 %¹⁶⁷.

La première étape, le conditionnement, a lieu avant la greffe et consiste en un traitement préparatoire par chimiothérapie associée ou non à une irradiation corporelle du receveur¹⁶⁸. Les doses administrées aux Fanconi sont plus importantes¹⁶⁹, afin de disposer d'une immunosuppression pré-implantatoire plus efficace, pour contourner le rejet du greffon¹⁶⁹, particulièrement en présence d'un mosaïsme somatique.

Les centres transplantateurs ont commencé à expérimenter de nouveaux médicaments, telle la fludarabine¹⁷⁰, pour supprimer la moelle osseuse du patient. Cette molécule anticancéreuse inhibe la synthèse d'ADN bloquant ainsi la prolifération cellulaire.

Dotée d'une spécificité à l'égard des lymphocytes leucémiques, elle est particulièrement indiquée, dans les cas de leucémie lymphoïde chronique¹⁷¹. Son utilisation dans les procédures de transplantations facilite la prise de la greffe¹⁷² et majore la survie à 3 ans, de 13% à 52 %¹⁷³. Souvent incluse dans les protocoles d'allogreffe partiellement compatible¹⁶⁵, la fludarabine voit son efficacité améliorée lorsqu'elle est associée au cyclophosphamide¹⁷⁰ qui empêche la réplication de l'ADN et a un effet cytostatique⁵³.

D'autres améliorations ont été obtenues en associant deux agents chimiques à une irradiation totale ou thoraco-abdominale^{166,167}. Le but est double, d'une part, un effet antitumoral sur les cellules malignes, d'autre part, une immunodépression du receveur, afin qu'il accepte la moelle du donneur et ne développe pas de réaction de rejet du greffon¹⁶⁶.

Si les patients souffrent de myélodysplasie ou d'un excès de cellules blastiques, leur conditionnement est alors plus intense, car le risque de développer une leucémie suite à la greffe est augmenté. Les premiers résultats suggèrent que ces traitements réduisent fortement le risque de rejet du greffon chez les malades. Pourtant, en dépit des progrès dans la préparation du patient, certaines conditions réduisent les chances de réussite d'une allogreffe (myélodysplasie ou leucémie) et exigent une préparation plus agressive de la greffe de moelle osseuse. Malheureusement, les tissus de l'organisme d'un patient Fanconi ont une sensibilité majorée aux radiations et aux médicaments utilisés, lors du conditionnement. Pour ces raisons, les patients victimes d'anémie aplasique sans complications avec un donneur compatible¹⁶⁷ issu de la fratrie, reçoivent des dosages réduits des produits de conditionnement¹⁶⁸.

La seconde étape, après le prélèvement de la moelle du donneur consiste en la greffe de moelle à proprement parler, qui s'effectue à la fin du conditionnement. Les cellules médullaires du donneur sont introduites dans la circulation sanguine du receveur, au moyen d'une simple transfusion veineuse. Les cellules vont, via le flux sanguin, se loger dans les cavités osseuses et proliférer pour assurer la reconstruction d'une moelle osseuse saine.

La reconstruction hématologique est observable au bout d'une vingtaine de jours, le patient qui ne fabriquait plus de cellules à partir de sa propre moelle détruite lors du conditionnement, commence à produire des cellules à partir de la moelle osseuse du donneur. Pendant la phase initiale d'une allogreffe, le malade est soumis à une surveillance hématologique en raison de la gravité des complications qui peuvent survenir. Durant la période d'aplasie médullaire, qui suit le conditionnement, alors que les taux des globules blancs et de plaquettes sont au plus bas, il existe un risque important d'infection, d'origine bactérienne, fongique ou virale¹⁷⁴, à l'origine de nombreux décès.

La deuxième complication spécifique aux allogreffes, est désignée sous le nom de "maladie du greffon contre l'hôte" (GVL ou GVH), est liée au système d'histocompatibilité mineur. Les GVH surviennent dans environ 30 % des cas si le donneur appartient à la fratrie et le risque est majoré dans les cas d'une compatibilité imparfaite des antigènes HLA.

Actuellement, de nombreux centres transplantateurs évaluent de nouveaux protocoles afin de limiter les risques de complications et leur sévérité. Au nombre de ces protocoles figure la déplétion, avant la greffe, des lymphocytes T de la moelle du donneur^{171,175}. La troisième complication est commune à toutes les greffes d'organes, il s'agit de la non prise de la greffe ou le rejet secondaire. Elle survient le plus souvent dans les greffes entre personnes non apparentées, plus rarement dans les greffes interfratrie ou phénoïdiques totalement compatibles. Ce rejet du greffon injecté justifie l'administration d'un traitement immunosuppresseur, avant la greffe.

La quatrième et dernière complication: les rechutes sont fréquentes chez les patients Fanconi T déplétées n'ayant pas eu de réaction de GVH, même lorsque les indications de greffes ont été bien posées. Le traitement du patient par des lymphocytes du donneur peut dans certains cas (LAM) entraîner une disparition des cellules tumorales et permettre une seconde rémission. Les mécanismes de l'effet anti-leucémique des lymphocytes allogéniques restent à ce jour incomplètement élucidés.

Si la greffe peut remédier aux problèmes liés à l'insuffisance médullaire, elle ne met en aucun cas à l'abri du développement de cancers¹⁴⁷. D'ailleurs, nombreuses sont les études rétrospectives qui présentent le développement de tumeurs secondaires à long terme comme une complication importante chez les patients Fanconi greffés: carcinomes de la tête ou du cou associés à l'allogreffe et dont le pronostic est souvent fatal¹⁷⁶⁻¹⁷⁸.

1-4-3-b Autres stratégies de correction

En raison des défauts intraséques des CSH Fanconi, le recours à l'autogreffe, utilisant la propre moelle du patient ne constitue pas une thérapeutique avantageuse pour le traitement de l'AF.

D'autres alternatives à la greffe de moelle sont néanmoins disponibles et principalement représentées par les cellules du sang fœtal, extraites du cordon ombilical et du placenta, après un accouchement¹⁷⁹. L'utilisation de ce sang présente un double intérêt en raison de sa richesse en CSH capables de prolifération et d'expansion¹⁴⁸ et son immaturité immunitaire¹⁸⁰, autorisent les allogreffes partiellement compatibles^{156,181}. Cette procédure présente cependant un inconvénient de taille, celui de la quantité. Les contingents de sang recueillis ne sont pas importants, limitant *a priori* le nombre de cellules souches susceptibles d'être greffées. Cet argument explique que les premières greffes de sang de cordon aient toutes été réalisées sur de petits enfants^{182,183}. La première a été pratiquée sur un enfant Fanconi¹⁸⁴ en 1989, par l'équipe du Docteur Gluckman, à l'hôpital Saint Louis à Paris. Cet enfant est aujourd'hui un adolescent normal qui ne présente plus aucun signe hématologique de la maladie. Depuis, les opérations se multiplient, des banques de sang de cordon foetal sont constituées un peu partout à travers le monde.

Grâce au diagnostic préimplantatoire, une alternative complémentaire s'offre depuis peu aux parents d'enfants Fanconi. Il devient désormais possible de sélectionner le frère ou la sœur HLA identique^{185,186}, de l'enfant Fanconi.

Les CSH du sang de cordon ombilical peuvent alors être congelées pour une utilisation ultérieure ou faire l'objet d'une expansion *ex vivo*^{187,188}, sans que leurs capacités de prolifération et de différenciation ne soient affectées^{189,190 188}.

Toutes les stratégies thérapeutiques ici abordées présentent à des degrés variables des contraintes et des risques secondaires non négligeables, allant du rejet simple à l'émergence de pathologies malignes. Les procédures ne sont pas suffisamment satisfaisantes et justifient la recherche de nouvelles approches, spécifiques au contexte Fanconi.

1-4-4 La thérapie génique

1-4-4-a Principe de la thérapie génique

Dans le contexte Fanconi, le recours à la thérapie génique est d'autant plus indiqué qu'il est question d'une maladie monogénique, avec un déficit fonctionnel impliquant un gène unique¹⁹¹. Par ailleurs, la guérison serait obtenue même en présence d'une faible synthèse de protéine transgénique, la population transduite pouvant acquérir un avantage sélectif¹⁹²⁻¹⁹⁴.

Le principe d'une telle stratégie repose sur l'introduction délibérée de matériel génétique dans des cellules humaines ou animales, pour pallier au manque d'une protéine en fournissant le gène responsable de sa synthèse (complémentation). Les conséquences de l'introduction d'un élément génique exogène sur la physiologie de la cellule sont fonction des interactions que ce gène établit avec les autres composantes cellulaires. En dépit de cela, il apparaît aujourd'hui, que manipuler un gène, donc très souvent agir à la source du processus pathologique, peut modifier favorablement le fonctionnement de la cellule et constituer ainsi un réel moyen thérapeutique.

Aussi, depuis près de dix ans, de nombreux efforts ont été réalisés afin de parvenir à un transfert de gène efficace et durable, avec l'espoir de réussir où les autres thérapies ont échoué. La correction génique par transduction de CSH représente une perspective prometteuse pour le traitement de nombreux désordres lymphohématologiques héréditaires ou acquis¹⁹⁵. Les essais jusqu'ici réalisés sur les patients Fanconi n'ont pas été couronnés de succès, puisqu'ils n'ont permis ni une correction permanente de CSH, ni la restauration de leurs pleines capacités¹⁹⁶.

1-4-4-b Difficultés de la thérapie génique

Parmi les obstacles qui restent à surmonter, figure le déficit en CSH de la moelle aplasique des patients³, leur extrême fragilité et une mort cellulaire massive induite par les manipulations¹⁹⁷. Aussi, chez les malades Fanconi le succès d'une telle thérapie repose sur un diagnostic précoce, avant l'apparition d'une hypoplasie avérée, de façon à ce que le stock de CSH soit encore disponible.

Des stratégies de thérapie génique rétrovirales par transduction *ex vivo*, de cellules médullaires ont déjà été réalisées¹⁹⁸. Des patients Fanconi ont alors reçu dans le cadre d'essais cliniques, trois à quatre cycles de transfert génique lors de cultures *ex vivo*, au cours desquelles, des progéniteurs hématopoïétiques autologues, ont été ciblés, et sont parvenus à exprimer le gène *FANCC*¹⁹⁹. Cependant, la culture *ex vivo* est connue pour réduire la prise de la greffe, autant dans le modèle murin¹²⁹ que chez l'Homme²⁰⁰, sans que les conséquences sur les caractéristiques des CSH et des progéniteurs soient véritablement connues. Dans un tel contexte, les CSH Fanconi présentent une augmentation du processus apoptotique¹²⁹, des anomalies cytogénétiques²⁰¹ et des transformations malignes de type myéloïdes²⁰² associées à une résistance au TNF α .²⁰³. L'ensemble de ces données suggère que l'instabilité génomique des CSH et progéniteurs Fanconi exerce une pression de sélection en faveur des cellules résistantes au processus apoptotique et ayant une propension à l'évolution vers une hémato-poïèse clonale et maligne.

2- Les cellules souches hématopoïétiques

2-1 Description et caractéristiques

La présente description fait mention de l'ontogénie humaine, celle des autres mammifères est régit par les mêmes lois, avec quelques particularités qui seront précisées le cas échéant.

2-1-1 Ontogénie des cellules souches hématopoïétiques

Les premières cellules apparaissent, dans la vésicule vitelline située, dans la région extra-embryonnaire, avant même que les organes définitifs ne soient ébauchés. Ces cellules primitives appartiennent au mésoderme extra-embryonnaire (hémangioblastes) et se concentrent au niveau de la splanchnopleure para-aortique, territoire présomptif de la région appelée AGM (aorte-gonades-mésonéphros)²⁰⁴. Les premières cellules différenciées des systèmes vasculaires et sanguins apparaissent au cours de la vie embryonnaire, dès la 3^{ème} semaine de gestation chez l'Homme.

L'hématopoïèse se poursuit activement dans des régions anatomiquement variées, dont certaines sont transitoires, pour se stabiliser dans le thymus et la moelle osseuse à partir de la fin du premier trimestre. Chez l'Homme à la 5^{ème} semaine de gestation, il se produit une migration orientée de cellules souches entre la vésicule vitelline et le foie. La colonisation du thymus s'effectue autour de la 7^{ème} semaine et celle de la moelle osseuse entre la 10^{ème} et la 11^{ème} semaine.

Plus prosaïquement, durant la vie intra-utérine, l'hématopoïèse fœtale s'effectue au niveau du tissu conjonctif embryonnaire jusqu'au 2^{ème} mois, elle devient hépatique et splénique du 2^{ème} au 6^{ème} mois, médullaire à partir du 4^{ème} mois, coïncidant alors avec le développement des ébauches osseuses. Après la naissance, l'hématopoïèse normale est localisée exclusivement, dans la moelle osseuse chez l'Homme. Jusqu'à l'âge de 5 ans, tous les os ont une activité hématopoïétique, qui va progressivement se limiter aux os courts et plats (sternum, côtes, vertèbres et os iliaques).

Les potentialités fonctionnelles des CSH varient au cours des phases successives du développement. Le processus est relativement comparable chez les rongeurs, à la différence près que la rate et la moelle osseuse ont une activité hématopoïétique, qui se maintient après la naissance. Cette différence avec l'humain est importante pour comprendre et interpréter les nombreuses expériences recourant au modèle murin.

2-1-2 Caractéristiques des cellules souches hématopoïétiques

Le système murin offre une plateforme à pour l'évaluation *in vivo*, des propriétés physiques et biologiques des CSH. Par des expériences de transplantation dans des souris syngéniques létalement irradiées, il devient alors possible de déterminer plus précisément l'implication de chaque type cellulaire et de caractériser plus avant les sous-classes de CSH^{205,206}. En effet, il existe dans l'organisme adulte, une hiérarchie quant aux potentialités fonctionnelles des CSH. Ces cellules multipotentes, douées d'une grande capacité de prolifération et d'autorenouvellement, donnent naissance à des progéniteurs, dont la prolifération et le potentiel sont amputés, mais encore capables de remplacer efficacement des souches spécialisées. Ces progéniteurs se divisent eux-mêmes en précurseurs, morphologiquement reconnaissables, différenciés, mais peu capables de division et ayant une durée de vie très limitée (**figure 8**). Chacune de ces populations dispose de caractéristiques physiologiques et de marqueurs cellulaires propres et peut être utilisée à des fins thérapeutiques.

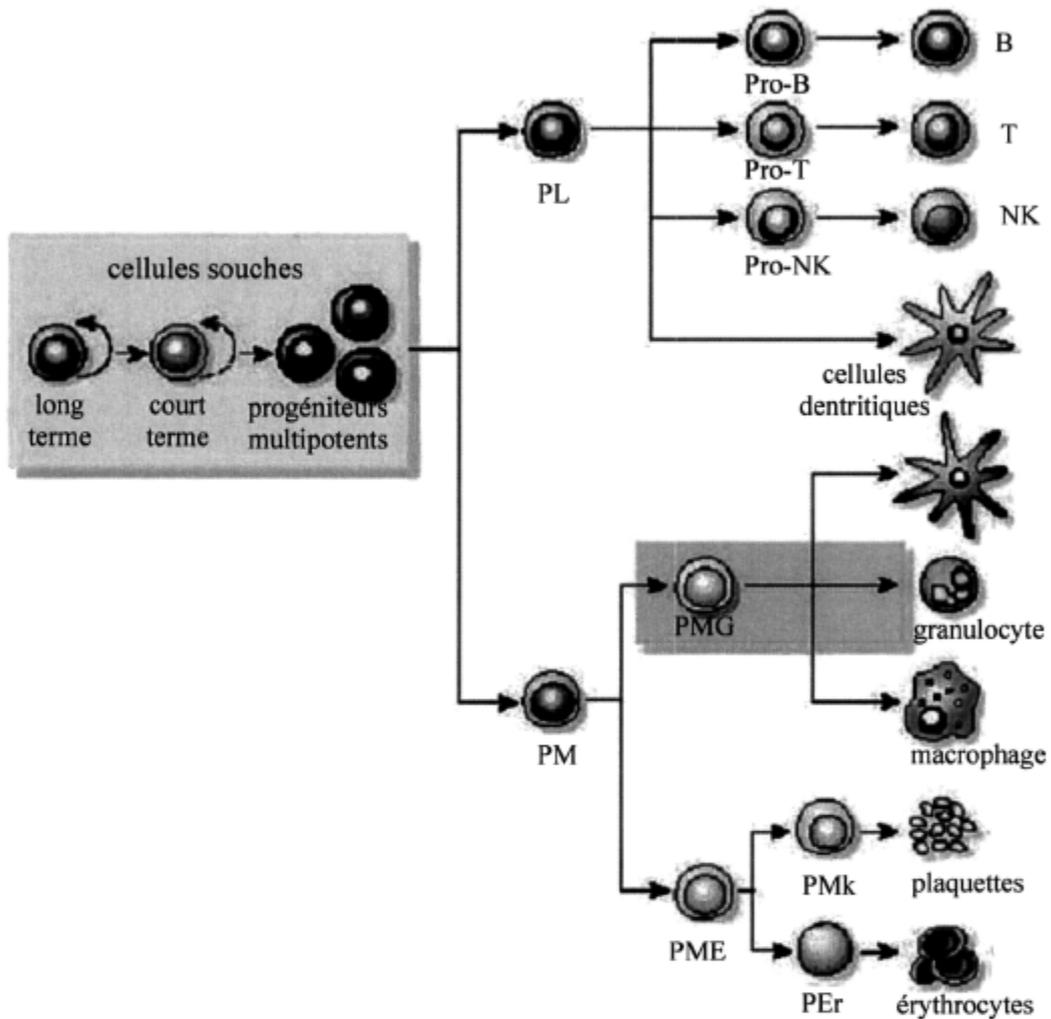


Figure 8: Hiérarchie des CSH médullaires et de leurs descendants

Une cellule souche de long terme permet la reconstitution hématopoïétique, la vie durant, alors que les CSH de court terme ont une fonctionnalité de quelques mois. Les cellules progénitrices (Pro) peuvent être de type myéloïde ou lymphoïde et génèrent des cellules précurseurs (P) de chaque lignée (PL, PM, PME, PMG), avant l'apparition de cellules matures. Image adaptée de *Nature Medecine*, 2005.

2-1-2-a Les cellules souches

La cellule souche hématopoïétique est une cellule multipotente primitive indifférenciée qui suffit à maintenir, toute la vie durant la production de toutes les cellules immunes et sanguines. Les cellules souches ne représentent qu'un faible pourcentage des cellules médullaires (0,01 à 0,05 %) et ne sont pas identifiables morphologiquement.

Plusieurs approches expérimentales ont démontré la grande hétérogénéité cellulaire du compartiment des cellules souches hématopoïétiques, au sein duquel coexiste une variété de cellules aux potentiels de prolifération et de différenciation variable. Deux entités cellulaires distinctes coexistent, l'une en charge de la reconstitution hématopoïétique de long terme (LT-RC) et l'autre de celle à court terme (ST-RC).

Bien que les cellules souches soient préférentiellement localisées dans la moelle osseuse, certaines peuvent passer de façon temporaire dans le sang. À l'état normal, elles sont pour la majorité en dehors du cycle cellulaire, en phase G0, seule une fraction entre dans le cycle. Comme chez l'homme, la définition de cellules souches chez la souris est purement fonctionnelle. Deux caractéristiques fondamentales les définissent, la capacité d'autorenouvellement et la capacité de multipotence. La propriété d'autorenouvellement explique qu'un si petit nombre de cellules puisse fonctionner sur une si longue période, quand la multipotence justifie le large éventail de différenciation qui s'offre à chacune d'entre elle. La compréhension des processus de maintenance, d'expansion et leur modulation, lors de cultures *ex vivo* représente un des défis majeurs, auxquels les chercheurs doivent faire face dans l'adaptation des protocoles de thérapie génique.

Si aucune des propriétés de multipotence et d'autorenouvellement n'est absolument requise pour affirmer le caractère souche d'une cellule, celle-ci en revanche doit fonctionner à long terme et donc être capable d'un grand nombre de divisions cellulaires. Ces divisions peuvent être de trois types²⁰⁷.

Lorsqu'elle est symétrique et qu'elle génère deux cellules souches filles primitives, le terme à propos est expansion (**figure 9A**). La moelle osseuse a recours à ce procédé, lors d'une reconstitution, comme après une transplantation de moelle. La majorité des protocoles de culture *ex vivo* conduisent à des divisions symétriques des CSH en cellules différenciées²⁰⁸.

Alors qu'une division asymétrique engendre une CSH et une cellule progénitrice apte à la différenciation. Elle permet la multiplication sans différenciation, maintenant intact le stock de cellules souches primitives, procédé d'usage, dans une moelle, à l'état basal (**figure 9B**).

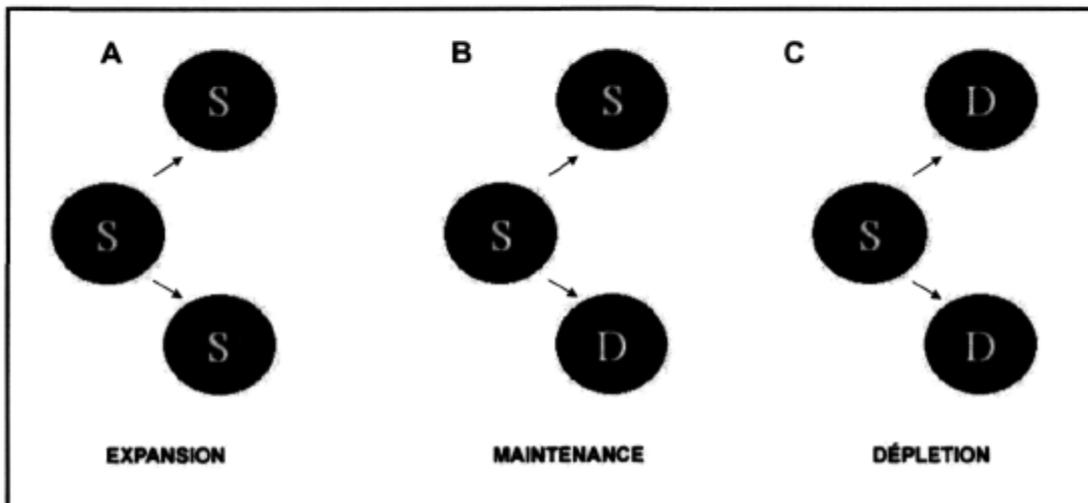
La capacité de différenciation est la possibilité, sous l'influence de facteurs de croissance, de se diviser en s'engageant de façon irréversible vers une lignée. Cette procédure conduit rapidement à une réduction du nombre de CSH et à une déplétion de la moelle (**figure 9C**).

La déplétion est le procédé communément décrit pour illustrer l'AF, les progéniteurs générés sont dans un état pro-apoptotique, les empêchant de compléter efficacement leur maturation. Un tel schéma favorise la différenciation massive des cellules primitives, sans garantir la reconstitution des stocks²⁰⁹.

Il paraît évident qu'un tel phénomène condamne à brève échéance l'intégrité médullaire et de fait nuit à la survie même des patients, dont les CSH ne pourront contrairement à leur mandat, garantir le maintien d'une hématopoïèse durable, tout la vie durant.

Toute la difficulté expérimentale consiste à acquérir la preuve qu'une cellule est bel et bien une cellule souche, ce qui nécessite de caractériser sa descendance *in vivo* et *in vitro*. L'identification d'une telle cellule ne peut donc se faire que rétrospectivement et indirectement par la mise en évidence de ses propriétés de prolifération et de différenciation. Confirmée par la production de cellules différenciées identifiables par leur phénotype (cytométrie, histologie) ou par leur fonction.

L'homéostasie sanguine est maintenue par un savant équilibre, entre la production des cellules souches par division cellulaire (autorenouvellement) et l'engagement vers les lignées cellulaires (différenciation), une cellule souche multipotente devient une cellule progénitrice.



Figures 9: Modèles de divisions des cellules souches hématopoïétiques

Les CSH disposent de plusieurs stratégies de divisions cellulaires, selon le contexte. **(A)** L'expansion qui permet à une cellule souche(S) de générer deux cellules souches est généralement observée lors de transplantations, pour reconstituer les stocks de CSH. **(B)** Lors de la maintenance, phénomène médullaire basal, une cellule souche (S) génère une autre cellule souche et une cellule différenciée (D) contribuant ainsi au maintien du niveau de CSH **(C)** Alors que la déplétion, processus observé chez les patients Fanconi, épuise les réserves de CSH en favorisant la différenciation, sans maintenir le niveau de CSH, puisqu'une souche (S) ne génère que des cellules différenciées (D).

2-1-2-b Les cellules progénitrices

Descendants directs des cellules souches, les cellules progénitrices ont un potentiel de prolifération et de différenciation déjà restreint. Progressivement au cours du processus de différenciation, les cellules progénitrices voient leur durée de vie et leur capacité de fonctionnement à long terme restreintes. Elles sont fonctionnelles en quelques divisions et deviennent morphologiquement identifiables par des anticorps monoclonaux, beaucoup sont présentes dans la moelle osseuse. Un nombre non négligeable d'entre elles est véhiculé par le sang vers d'autres destinations, sans que le principe de cette migration soit bien compris. Au fur et à mesure de leur avancement, dans le processus de différenciation, les cellules progénitrices perdent progressivement leurs capacités d'autorenouvellement. Les tests clonogéniques réalisés *in vitro* ont permis de démontrer l'existence de progéniteurs déterminés. La plupart des colonies qui sont obtenues (Colony Forming Unit ou CFU) ne contiennent qu'un seul type cellulaire et sont incapables de constituer des colonies secondaires suggérant l'engagement de la cellule clonogénique dans un lignage de différenciation, excluant qu'elle soit dotée d'une capacité d'autorenouvellement.

Après plusieurs divisions, elles deviennent spécifiques d'une seule lignée et génèrent les cellules précurseurs, cellules engagées, dont le potentiel de différenciation est de plus en plus limité.

2-1-2-c Les cellules précurseurs

Ces cellules différenciées perdent toute capacité d'autorenouvellement, mais se divisent et mûrissent. Le compartiment des précurseurs est exclusivement médullaire et est le siège de la multiplication et la maturation cellulaire. Ce qui explique que la majorité des cellules observées sur un étalement de myélogramme ou sur une biopsie ostéomédullaire. Divers stades cytologiques sont observés dans chaque lignée avant d'aboutir aux cellules terminales fonctionnelles.

Les précurseurs les plus immatures sont les myéloblastes (futurs polynucléaires), les proerythroblastes (hématies), mégacaryocytes (plaquettes), lymphoblastes (lymphocytes) et les monoblastes (monocytes). Les modifications morphologiques communément reliées à la maturation sont la diminution de la taille cellulaire, la diminution du rapport nucléo-cytoplasmique, la disparition des nucléoles et la condensation de la chromatine. Mais, la maturation de chaque lignée induit également des modifications spécifiques du noyau (polylobulation de la lignée granuleuse), du cytoplasme (granulations spécifiques de la lignée granuleuse) et de la membrane (apparition de protéines membranaires spécifiques).

L'efficacité et le rendement de l'hématopoïèse seraient très faibles si à chaque précurseur ne correspondait qu'un seul élément figuré mature. Aussi, parallèlement à la maturation, chaque stade cytologique correspond à une division cellulaire. Selon les lignées, il se produit entre trois et cinq mitoses, de sorte qu'un précurseur peut donner naissance à 32 cellules filles. Pour les précurseurs mégacaryocytaires la situation est particulière, il n'y a pas de division cellulaire, mais une endomitose à l'intérieur de chaque mégacaryocyte, la cellule doublant son ADN. Les plaquettes sont des fragments de cytoplasme du mégacaryocyte qui seront libérés au moment de la mort de ce précurseur.

2-1-2-d Les cellules matures

La maturation terminale des précurseurs aboutit aux cellules matures fonctionnelles qui passent dans le sang. Si la majorité de l'hématopoïèse a lieu dans la moelle osseuse, seules les cellules terminales, matures et fonctionnelles passent dans le sang. Pour une partie d'entre elles, le sang ne représente qu'un véhicule et un lieu de passage, entre le site de production et le site de fonctionnement biologique. Les lymphocytes et les monocytes utilisent le sang pour rejoindre les organes lymphoïdes primaires et secondaires, où ils complètent leur différenciation et finalisent leur maturation.

2-2 Marqueurs des cellules souches hématopoïétiques

les cellules souches hématopoïétiques étant rares, très rapidement est apparue la nécessité de les enrichir en éliminant les cellules matures. Aussi, depuis plusieurs années, de nombreuses équipes développent des techniques qui permettent d'isoler et de caractériser les CSH, tant chez l'Homme que chez la souris²¹⁰⁻²¹³. Les travaux du Dr Weissman ont initié ces recherches, en contribuant à montrer qu'une fraction de moelle osseuse loin d'être homogène, contient un nombre restreint de CSH primitives et des proportions variables de leurs descendants^{210,214}. Son équipe a initié les premiers travaux qui ont conduit à l'enrichissement des CSH, grâce à l'utilisation conjointe de marqueurs de surface et de la cytométrie de flux (FACS). De nombreuses autres équipes ont ensuite contribué à allonger la liste des marqueurs antigéniques, qui reste aujourd'hui encore, non exhaustive. En tête figurent ceux qui caractérisent les CSH, le récepteur de type tyrosine kinase c-kit⁺ (CD117)²¹⁵, la glycoprotéine membranaire Sca-1⁺²¹⁶ et la non-expression des marqueurs de différenciation des lignées hématopoïétiques CD5, CD11b, CD45R, Gr-1, Ter119. L'absence de ces marqueurs est plus communément désignée comme lignée négative (*lineage-*) ou Lin⁻²¹⁷. Les cellules c-kit⁺ Lineage- Sca-1⁺ (KLS) représentent moins de 0,1 % des cellules de la moelle brute²⁰⁶. Ce sont ces huit marqueurs de surface canoniques qui sont utilisés, lors des procédés d'enrichissement des CSH, depuis plusieurs décennies et se retrouvent chez l'Homme comme chez la souris²⁰⁶.

Bien que le recours à ces premiers marqueurs permet une première séparation des CSH, cette fraction cellulaire est encore très hétérogène et inclue à la fois des lignées progénitrices, des CSH dotées de capacités de reconstitution de long terme et de court terme. Pour exclure les cellules progénitrices différenciées, la combinaison des marqueurs Thy-1.2, Flk-2 et CD34 est nécessaire. Chez la souris, la population cellulaire Lin⁻ Sca-1⁺ Thy-1⁺ contient toutes les cellules capables de reconstituer une hématopoïèse. Chez l'homme, l'antigène CD34 est un marqueur essentiel à la purification des cellules progénitrices et des cellules souches.

L'expression de la glycoprotéine CD34 chez l'Homme²¹⁸ est corrélée à celle de la souris^{219,220}, avec une importante homologie de séquences (90 %)²²¹ et des similitudes fonctionnelles²²². La découverte de l'homologue murin de la molécule CD34 a ouvert les portes d'une caractérisation plus approfondie des cellules responsables de la reconstitution hématopoïétique à court et long termes. Le marqueur CD34⁺ est aujourd'hui d'usage courant dans la purification des CSH. Les cellules Lin⁻ Thy1.2⁻ Sca-1⁺ CD34⁺ (LTS CD34⁺) pourvoient à la reconstitution de court terme et se répartissent en deux sous-populations LTS CD34⁺ CD38⁻ et LTS CD34⁺ CD38⁺, cette dernière catégorie contient la grande majorité des progéniteurs primitifs (**figure 10**).

Il existe une population de cellules hématopoïétiques dont les caractéristiques phénotypiques et biologiques sont très différentes des cellules CD34⁺. D'autres travaux ont identifié une nouvelle classe de CSH dépourvues de l'antigène CD34. D'abord caractérisées chez l'Homme²²³, leur présence est confirmée chez la souris²²². Ces cellules LTS⁻CD34⁻ sont dépourvues des antigènes CD34, HLA-DR et Thy-1, trois marqueurs normalement présents à la surface des cellules CD34⁺. Les LTS CD34⁻ sont constituées des LTS CD34⁻ CD38⁻ et LTS CD34⁻ CD38⁺ et favorisent la reconstitution de long terme²²⁴. Contrairement aux CD34⁺ qui sont fortement clonogéniques à court et long terme *in vitro*²²⁵, les CD34⁻ ont une activité hématopoïétique restreinte en culture. En revanche *in vivo*, lors d'une transplantation, les CD34⁻ et en particulier les CD34⁻ CD38⁻²²⁶, sont capables de prolifération et de différenciation. Enfin, comme le démontre Zanjani *et al.* les cellules CD34⁻ sont plus primitives et précèdent leurs homologues CD34⁺, dans la hiérarchie hématopoïétique, chez l'Homme comme chez la souris, en témoigne leur capacité à générer ces dernières²²³. La réponse des CD34⁻ aux facteurs de croissance est très différente de celle des CD34⁺²²⁷. Plusieurs études ont démontré que chez la souris, l'acquisition du marqueur CD34 loin d'être un phénomène de différenciation est plutôt liée à un mécanisme d'activation²²⁷, que certains traitements, comme le 5-fluorouracile (5-FU) favorisent, en induisant l'entrée en cycle des cellules primitives²²⁸. De tels traitements administrés à la souris activent le compartiment médullaire, mais surtout favorisent l'apparition de la sous-population activée exprimant l'antigène CD34⁺ et capable de reconstitution à long terme.

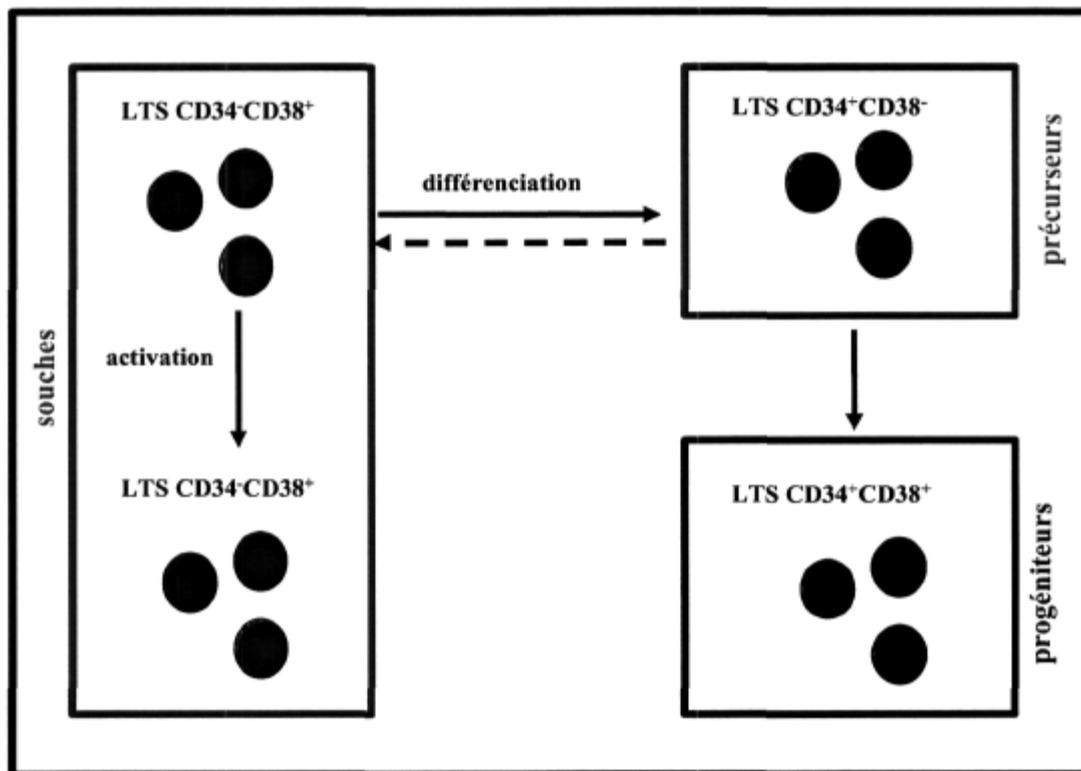


Figure 10: Marqueurs de différenciation des cellules souches hématopoïétiques

Au fur et à mesure de la différenciation hématopoïétique, les CSH acquièrent ou perdent des marqueurs ou cluster de différenciation (CD). Les CD permettent de séparer les cellules souches, des cellules précurseurs et progénitrices. Au nombre des marqueurs figurent CD34, CD38 et l'absence de certains autres (CD5, CD11b, CD45R, Gr-1, Ter119) désignée par Lin- ou lignage négatif. Les cellules Lin⁻ Thy1.2⁻ Sca-1⁺ sont dites (LTS).

Les travaux de Bonnet et *al.*, de l'équipe du Dr Dick, montrent que la culture *ex vivo* de cellules CD34⁻ humaines, augmente leur nombre, sans lien à un processus de prolifération. Par ailleurs, chez l'Homme, contrairement à la souris, l'acquisition du marqueur CD34 n'est aucunement indispensable au processus de prolifération.

La proportion de cellules CD34⁻ et de CD34⁺ varie au cours de la vie, elle est plus importante durant la vie foetale.

Si les cellules les plus primitives peuvent être fractionnées en fonction de l'expression du marqueur CD34; des expériences *in situ* ont démontré que les CSH précoces expriment également le marqueur CD41²²⁹. Alors que dans la moelle osseuse des adultes, l'expression de CD41 est restreinte aux mégacaryocytes. Les CSH peuvent également être isolées en fonction de l'expression du marqueur CD150²³⁰ et de l'absence de CD48^{231,232}. D'autres marqueurs de restriction de lignées négatives sont quelques fois utilisés, comme le récepteur à la transferrine négatif, HLA DR low ou le CD33²³³. L'acquisition des déterminants CD33, HLA DR et CD34 caractérisent les cellules progénitrices.

Contrairement aux autres cellules médullaires²¹³, les CSH présentent une expulsion active de nombreuses drogues, ce procédé explique de la faible rétention des marqueurs de fluorescence liant l'ADN (Hoechst 33342²³⁴ et Rhodamine 123²³⁵). Cette particularité est largement exploitée dans les stratégies de purification des CSH, dans lesquelles l'expulsion différentielle du marqueur Hoechst 33342 détermine l'isolation d'une population communément appelée *side population* (SP).

Les cellules SP sont enrichies en CSH dont les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles coïncident avec les cellules c-Kit⁺Sca-1⁺ Lin⁻ Thy lo CD34²³⁶. Les SP constituent pour certains, une des populations les plus pures et les plus puissantes actuellement disponible par purification (**tableau 3**). Cette conception ne fait cependant pas l'unanimité au sein des experts. Il est désormais possible d'isoler les CSH, de les maintenir en culture et dans certains cas de les expandre, offrant ainsi des opportunités sans précédent. Une seule cellule LTS, injectée à une souris irradiée ou cultivée *in vitro*, pourrait reproduire l'ensemble des lymphocytes et des cellules myéloïdes différenciées nécessaires à la restauration définitive d'un statut hématologique normal. Une fois injectée, elle serait également capable de générer des cellules souches capables à leur tour de reconstituer le système hématologique. On ne parle pas *stricto sensu* d'un « autorenewement », puisqu'on ne peut pas démontrer l'identité moléculaire de la cellule fille et de la cellule parentale, mais d'autorenewement « fonctionnel » ou plutôt d'une capacité de reconstitution à « long terme ».

Tableau 3 : Proportions relatives des CSH chez la souris

Marqueur de surface	Fraction médullaire
c-kit+ Sca-1+ Lin- (KSL)	0,08
KLS Thy1.2- (KTLS)	0,05
KLS CD34-	0,008
SP	0,05

Ces valeurs ne sont pas absolues, mais relatives et sont sujettes à variations selon dans les méthodes de tri utilisées.

2-3 Le vecteur viral idéal

2-3-1 Ses caractéristiques

Le transfert efficace dans les CSH qu'elles soient humaines ou murines est un objectif important dans la concrétisation des espoirs de la thérapie génique. En fonction des plans de traitement, de la durée, mais également des cellules ciblées, de leur localisation et de leur capacité à se diviser ou non, différents vecteurs sont disponibles. Dans le cadre d'un traitement de longue durée, les vecteurs qui seront préférés sont ceux capables de s'insérer dans le chromosome et ainsi de se répliquer durant les divisions cellulaires, assurant un maintien sur plusieurs générations cellulaires. Le vecteur idéal devrait réunir plusieurs caractéristiques, comme la spécificité de la population cellulaire ciblée, assurer un transfert efficace et prolongé, ne pas déclencher de réaction immunitaire susceptible de le neutraliser, n'entraîner aucun risque de complication infectieuse, ni de développement tumoral et enfin être facile à produire, dans des conditions reproductibles et à un coût acceptable.

Dans cette quête du vecteur idéal le plus performant et le plus sûr, les vecteurs viraux sont préférés aux vecteurs non viraux, en raison de leur efficacité de transfert et de l'expression prolongée du gène, grâce à une intégration dans le génome. Ces véhicules font l'objet de nombreuses analyses afin de mieux cerner les risques inhérents à leur utilisation. Ils sont classés en fonction de la taille maximale de l'ADN transférable, des infections qu'ils engendrent suite à leur dissémination dans l'organisme, du nombre de particules virales injectées, la possibilité de recombinaison du vecteur avec un virus sauvage, les réactions immunitaires vis-à-vis des protéines de l'enveloppe et enfin la transformation maligne des cellules transduites. Il existe une grande variété de vecteurs viraux potentiellement utilisables en thérapie génique, cependant les particularités de l'AF exigent le recours à des vecteurs capables de cibler le plus grand nombre de cellules indifféremment de leur nature et de leur activité. Ainsi les cellules capables de prolifération, autant que les cellules quiescentes doivent pouvoir être atteintes.

2-3-2 Sa nature

Les causes essentielles d'échec des essais de thérapie génique réalisées, les dix dernières années, sont essentiellement attribuables à la faible efficacité de transfert, la brièveté de l'expression du transgène et la difficulté, dans les maladies multigéniques, de définir le meilleur gène cible. Si la manipulation génétique des CSH repeuplantes à long terme est possible grâce à certains systèmes de délivrance, elle est souvent incompatible avec les réalités thérapeutiques. Le transfert efficace dans les CSH qu'elles soient humaines ou murines est un objectif important dans la concrétisation des espoirs de la thérapie génique. Lorsque la thérapie envisage de cibler des CSH, l'état de quiescence dans lequel se trouvent les plus primitives d'entre elles, suggère de favoriser le recours à des vecteurs de type lentiviraux²³⁷. Rétrovirus apparentés au virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1), les lentivirus sont capables d'infecter les cellules quiescentes avec une grande efficacité^{238,239}. Leur supériorité pour les applications *in vivo* est sans contexte et a été démontrée à plusieurs reprises^{240 241}.

Les lentivirus ont un génome complexe, en plus des structures gag, pol et env, le VIH-1 contient deux gènes régulateurs tat et rev, essentiels à la transcription virale et à l'expression génique, ainsi que quatre gènes accessoires vif, vpr, vpu, nef. Ces 4 gènes sont dits accessoires, car ils peuvent être délétés sans que la réplication virale ne soit affectée²⁴¹. ils sont essentiels au maintien de la virulence *in vivo* et, interfèrent dans le cycle cellulaire et la croissance²⁴². Leurs fonctions dans la pathogénicité du VIH *in vivo* sont complexes et partiellement connues. Leur présence représenterait un risque pour l'Homme, justifiant leur délétion dans les systèmes de vecteurs²⁴³. Dans les utilisations les plus récentes, le vecteur viral est délété de ces séquences répliquatives tout en conservant son pouvoir infectant.

D'autres parties sont maintenues pour les caractéristiques fonctionnelles qu'elles octroient. Le gène Gag est nécessaire et suffisant à l'assemblage et au relargage de particules virales (virus like particules, VLP), dans les cellules infectées. La maturation de la particule infectieuse requiert une protéase (PR) codée par *pol* (reverse transcriptase et intégrase).

Les particules virales contenant la copie d'ARN du vecteur lentiviral, sont produites *in vitro* et peuvent transduire une grande variété de cellules. Le recours au promoteur de la phosphoglycérate kinase (PGK) autorise une expression forte du transgène, dans les cellules progénitrices hématopoïétiques autant que dans les lignées différenciées, dans des conditions de cultures mitogéniques autant que non mitogéniques²⁴⁴.

Alors que le transport nucléaire du complexe de préintégration des rétrovirus, nécessite une cassure de l'enveloppe nucléaire qui survient au moment de la mitose²⁴⁵, les lentivirus dérivés du VIH-1, utilisent les propriétés kariophyliques de leur complexe. Le signal de localisation nucléaire présent sur la protéine matrice du VIH-1 facilite l'importation du complexe de préintégration, au travers du nucléopore et permet un transfert efficace, une intégration et une expression de long terme des transgènes dans des cellules non mitotiques aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*^{246,247}.

Ce processus est facilité par la présence de deux protéines que sont matrix (MA) et Vpr, codées par le génome viral et qui interagissent avec la machinerie d'importation nucléaire et médient le transport actif du complexe de préintégration au travers du nucléopore.

Le succès de l'infection virale des CSH dépend des récepteurs viraux présents à la surface des cellules cibles, mais également des titres viraux. La concentration par ultracentrifugation est une bonne alternative, qui était jusqu'à peu, limitée par la fragilité des protéines d'enveloppe du virus. Ces limites ont été surmontées par l'utilisation de vecteurs, dans lesquels l'enveloppe du VIH a été remplacée par une enveloppe amphotropique moins fragile, provenant d'autres virus (dérivés du virus de la stomatite vésiculaire VSV-G²⁴⁸) et capable de se fixer sur un nombre supérieur de récepteurs membranaires^{243,249}. Ces virus modifiés sont dits «pseudotypés» et produisent des vecteurs d'une plus grande stabilité, capables de résister à la concentration, ce qui augmente le titre viral, limite le volume d'injection et améliore la biosécurité de ces systèmes²⁵⁰.

Ce travail a employé des vecteurs lentiviraux de seconde génération, dotés de la modification dite de self-inactivation ou SIN. Ce qui permet une inactivation du promoteur viral (expression des gènes viraux et réplication virale) dans les copies reverse-transcrites d'ADN viral qui s'insèrent dans les chromosomes des cellules infectées. Le vecteur dispose d'un promoteur interne qui permet l'expression du transgène délivré.²⁵¹ Par ailleurs, les vecteurs disposant de la technologie SIN ont un promoteur interne plus faible et plus spécifique des cellules, que le promoteur viral originel. La stratégie la plus urgente étant d'évaluer les risques de mutagenèse insertionnelle des différents vecteurs, en raison leur insertion dans le chromosome. Il apparaît en réalité que les vecteurs dérivés du VIH-1 s'insèrent plus fréquemment dans les terminaisons géniques, plus que dans les régions promotrices. L'ensemble de ces propriétés réduit les risques d'activation oncogénique²⁵².

2-4 Les modèles Fanconi

Pour comprendre la pathogenèse de l'AF et faciliter le développement d'approches thérapeutiques, plusieurs modèles animaux ont été générés. Bien qu'il n'existe pas de protéines Fanconi dans toutes les espèces, plusieurs modèles sont accessibles pour l'étude de la maladie, *Cenorhabditis elegans*²⁵³, *Drosophila melanogaster*²⁵⁴, *Xenopus laevis*²⁵⁵, *Cricetulus griseus* ou *Hamster chinois*²⁵⁶ et *Mus musculus*²⁵⁷ figurent au nombre des animaux les plus communément usités.

2-4-1 Les avantages du modèle murin

Les souris Fanconi homozygotes ont été générées par de multiples procédés de façon à induire l'altération d'un gène *Fanconi* précis (knock-out, mutation ponctuelle, ou délétion partielle). Les procédures expérimentales ont généré quatre modèles, couramment d'usage dans la communauté Fanconi : les souris *FancA*^{-/-1}, *FancC*^{-/-258}, *FancD2*^{-/-259} et *FancG*^{-/-260} (**Tableau 4**). Les naissances de souris Fanconi n'obéissent pas aux lois mendéliennes, puisque les animaux homozygotes pour un allèle donné, sont obtenus dans une proportion de 19 %^{1, 258,261}, en lieu et place des 25 % attendus¹³². Cette réduction témoigne d'une mortalité embryonnaire et contribue à évoquer la participation de la voie Fanconi, à des mécanismes développementaux majeurs.

Le modèle murin est d'autant plus couru dans les équipes de recherche, que de nombreuses caractéristiques le rapprochent de l'*Homme*.

L'hématopoïèse est chez les deux espèces, un processus dynamique qui génère de façon continue, quotidiennement, approximativement $2,4 \times 10^8$ globules rouges et 4×10^6 cellules non lymphoïdes, dans le sang périphérique. Ce processus compense la perte sanguine suite aux infections ou à l'action d'agents chimiques, présents dans l'environnement.

Tableau 4 : Modèles murins de l'anémie de Fanconi

Modèle	Stratégie	Similitudes avec le phénotype humain	Différences	Références
FancA	remplacement de exon 4-7 par cassette lacZ-neo	fertilité altérée, hypersensibilité aux agents pontants	malformations congénitales anomalies hématopoïétiques et cancers absents	{Cheng, 2000 #53}
FancC	remplacement de exon 8 ou 9 par cassette neo	fertilité altérée, hypersensibilité aux agents pontants, au TNF α et IFN γ , effets pro-apoptotiques bloqués en inhibant capsase 3	malformations congénitales anomalies hématopoïétiques et cancers absents	{Chen, 1996 #51} {Whitney, 1996 #52} {Pang, 2000 #154} {Rathbun, 1997 #82} {Haneline, 1998 #83} {Rathbun, 2000 #648}
FancD2	déletion des exons 26 et 27	fertilité altérée, léthalité périnatale, naissances hors des ratios mendéliens, microphthalmie, cancers, hypersensibilité aux pontants, hypomorphisme	malformations congénitales anomalies hématopoïétiques	{Houghtaling, 2003 #550}
FancG	remplacement de exons 2-9 par cassette neo	fertilité altérée, hypersensibilité aux agents pontants, radiations ionisantes, manque isoforme FANCD2-L	malformations congénitales anomalies hématopoïétiques et cancers	{Yang, 2001 #55}
FANCC	surexpression de FANCC transgénique	protection contre apoptose		{Wang, 1998 #151}
FNT	surexpression du TNF α dans souris FancC	réduction de la formation de colonies des CSH médullaires	comptes sanguins normaux cellularité médullaire normale	{Otsuki, 1999 #153}

Ces modèles murins fournissent des plateformes précliniques facilitent l'examen détaillé de la pathogenèse, le développement de nouvelles approches thérapeutiques, mais également l'étude *in vivo*, des conséquences biologiques reliées à la manipulation des CSH. Chacune des caractéristiques intrinsèques de ces différents modèles murins a été étudiée de façon à évaluer leur proximité et les divergences avec le phénotype des patients Fanconi avec le syndrome humain.

Toutes les expérimentations présentées au cours de ce travail ont fait exclusivement usage des modèles murins *FancA*^{-/-} et *FancC*^{-/-}. Les souris *FancC*^{-/-} utilisées dans le cadre de cette étude présentent une interruption de l'homologue murin du gène *FancC* à hauteur de l'exon 8²⁵⁸. Les animaux *knock-out* *FancC*^{-/-} reproduisent plusieurs caractéristiques phénotypiques du syndrome humain, incluant le retard de croissance staturo-pondéral (**figures 11A et B**), la microcéphalie, la microphthalmie (mono, bilatérale) voir anaphtalmie et la propension accrue au développement de cancers (**figure 11C**).

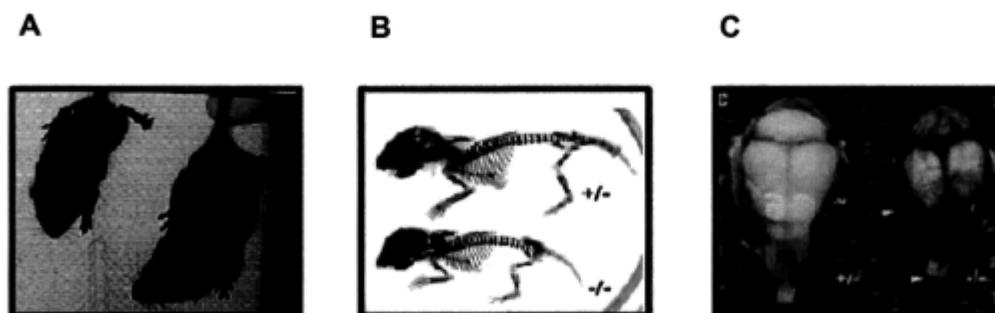
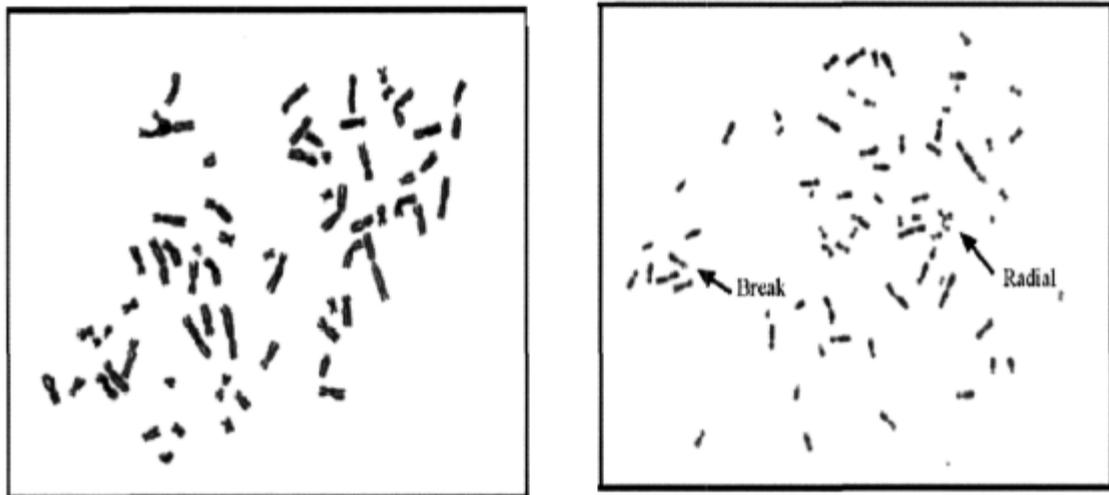


Figure 11: Phénotypes dans le modèle murin de l'anémie de Fanconi

Plusieurs caractéristiques phénotypiques des modèles murins sont confirmées au syndrome clinique. (A) Le retard staturo-pondéral pré et postnatal, image de M. Carreau (B) La réduction de la constitution osseuse des Fanconi illustre leur petite taille. (C) Les animaux présentent également une microcéphalie associée à une microphthalmie, mono ou bilatérale, voir une anaphtalmie. Images B et C extraites de Wong, *Hum. Mol. Gen.* 2003

Conformément au phénotype des patients, les CSH murines sont aussi sensibles à la culture *ex vivo*¹⁹⁷, que leurs homologues humains. *In vitro* la capacité des cellules progénitrices médullaires à former des colonies est également affectée^{56,132}. À l'état basal, les animaux présentent également une proportion plus élevée que la moyenne d'aberrations chromosomiques et une hypersensibilité à certaines cytokines et agents pontant (TNF α , IFN γ , MMC, DEB)^{258 56,262,263} (figure 12).



Bruun *et al.*, DNA repair, 2003

Figure 12: Caryotype de fibroblastes de souris Fanconi traités à la MMC

Dans le cadre d'une analyse caryotypique, les cellules fibroblastiques issues de souris Fanconi sont traitées avec 15 ng/mL de MMC. Alors que les fibroblastes sauvages ne présentent aucun dommage (figure de gauche), les cellules Fanconi exposent un profil d'instabilité chromosomique. Image extraite de l'article D.Bruun *et al.*, DNA Repair, 2003.

Environ la moitié des souris développe des anomalies cytogénétiques, dont la résistance au TNF α ¹⁹⁷, ce qui concorde avec les données recueillies chez les patients²⁰³.

Les cellules murines Fanconi présentent une augmentation de l'instabilité chromosomique spontanée, une hyper-réactivité aux effets clastrogéniques et anti-prolifératifs des agents liants²⁵⁸ et aux cytokines inhibitrices^{56,262,264}, lesquels majorent les cassures et les aberrations chromosomiques. Les cellules qui ne résistent pas aux dommages induits à leur ADN, se dirigent rapidement vers un processus apoptotique¹⁹⁷, contribuant à une déplétion médullaire. Près du tiers des souris, présentent une perte des chromosomes sexuels¹³² et le développement de pathologies malignes myéloïdes. Les mâles et les femelles nullizygotes montrent des signes d'hypogonadisme²⁶⁵, une réduction du nombre de cellules germinales¹³², une gamétogénèse perturbée¹³², qui conduit à une infertilité marquée^{258,266}, coïncidant avec celle des patients. La première année aucun défaut hématologique n'est détectable, les paramètres sanguins restent dans des valeurs normales et aucune anémie n'est décelée.

Les caractéristiques des souris *FancA*^{-/-} sont proches des celles des souris *FancC*^{-/-} confirmant une interdépendance des produits des gènes *Fanconi* et leur implication, dans une voie développementale commune.

2-4-2 Une phénocopie très discutable

S'ils conviennent à la compréhension de la physiopathologie de l'AF, à la recherche et à la mise au point de stratégies thérapeutiques novatrices, comme leur nom le laisse supposé, les modèles animaux ne sont que des ébauches. Ils permettent de dresser un schéma des processus cellulaires, mais ne suffisent pas à mener à une connaissance pleine et entière de la pathologie et de fait à ces traitements. Le phénotype des souris ne reproduit pas le syndrome clinique, dans son intégralité et dans toute sa complexité²⁶⁷. Ainsi, le tableau des malformations et des pathologies cancéreuses est largement amoindri. Par ailleurs, pour cerner l'étendue des divergences entre la forme humaine et murine de la pathologie Fanconi, quelques autres différences importantes sont à garder l'esprit. Contrairement aux malades, les souris *FancC*^{-/-} ne sont que peu susceptibles aux radiations ionisantes²⁶⁸.

Si les étapes clés de la prolifération et de la différenciation des CSH murines et humaines sont probablement identiques, les acteurs de la régulation fine diffèrent suffisamment pour que les résultats obtenus chez l'une ne soient pas immédiatement transposables à l'autre. D'autres facteurs entrent également en ligne de compte, comme la taille, la durée de vie qui diverge grandement entre l'humain et la souris. Mais la plus grande divergence est sans conteste celle voulant que la forme murine de l'AF n'induisse pas la défaillance médullaire²⁶⁹, élément pourtant crucial dans la forme humaine.

Chez les souris Fanconi, l'hématopoïèse est virtuellement normale et la défaillance de la moelle osseuse ne survient pas spontanément^{34,269}. Pourtant, la moelle osseuse des animaux $\text{FancC}^{-/-}$ contient une quantité moindre de $\text{Lin}^{-}\text{Thy1.2}^{-}\text{Sca1}^{+}\text{c-kit}^{+}\text{CD34}^{+270}$. Quant à la proportion de cellules $\text{Lin}^{-}\text{Thy1.2}^{-}\text{Sca1}^{+}\text{c-kit}^{+}\text{CD34}^{-}$, elle est réduite de 30% comparativement aux sauvages, ce taux passe à 60 % dans les souris plus âgées²⁷⁰. En revanche, un déficit médullaire sévère peut être induit, dans des conditions de stress^{34,271} permettant de disposer de souris sujettes à des pathologies hématologiques malignes. L'administration de MMC par exemple peut suffire à générer un état d'aplasie proche de celui des malades Fanconi^{34,271}.

Les résultats obtenus dans ce modèle devront donc être nuancés au regard de l'ensemble de ces divergences. Il devient alors aisément compréhensible que certains résultats prometteurs, à l'efficacité avérée dans le modèle murin^{272,273}, ne se concrétisent pas une fois transposés à l'Homme^{196,199}. Ces données révèlent que les modèles murins doivent leur imperfection au fait qu'ils ne sont pas des copies phénotypiques ou phénocopies de la forme humaine, entre autres se posent les problèmes de l'aplasie progressive de la moelle osseuse et de la prédisposition aux leucémies. En dépit de son caractère incomplet, le modèle a permis de procéder à de grandes avancées dans la compréhension de la maladie et à l'élaboration de stratégies thérapeutiques novatrices.

3- Hypothèses et objectifs de recherche

Pour corriger génétiquement une maladie héréditaire, le gène doit être délivré, intégré et exprimé de façon stable et durable dans des cellules capables d'auto-renouvellement et de différenciation vers toutes les lignées hématopoïétiques. Les CSH sont justement dotées de telles capacités et la perspective d'y recourir lors d'une thérapie génique est d'autant plus attrayante qu'elles sont aisément accessibles. Un tel procédé permettrait, de reconstituer une hématopoïèse normale, en dotant l'organisme de cellules corrigées capables de proliférer et de se différencier toute la vie durant. Cette idée est particulièrement enthousiasmante dans le contexte d'une maladie monogénique comme l'AF. Mais

3-1 Problématique

Diverses procédures permettent de transduire *in vitro* les CSH, pourtant, ces stratégies de corrections ne sont que peu adaptées à aux cellules Fanconi. Leur hypersensibilité à la culture *in vitro* et les altérations générées représentent une contrainte à leur usage clinique.

3-1 Hypothèse de recherche

L'élaboration d'une stratégie de correction génique *in situ*, garantirait-elle une correction génique efficace tout en se délestant des risques inhérents à la correction *in vitro* ?

3-3 Objectifs de recherche

Pour développer une thérapie génique adaptée au contexte Fanconi, il fallait prendre en compte la fragilité, le nombre réduit et la sensibilité des CSH de patients.

À cet effet, les objectifs du présent travail étaient de mettre au point et d'évaluer une stratégie de correction génique délivrant le transgène directement dans l'environnement natif des cellules souches hématopoïétiques.

Les cellules peuvent-elles présendre à une complémentation fonctionnelle pour et *in fine* assurer la survie des souris corrigées génétiquement ?

Les travaux exposés dans ce mémoire contribuent à présenter une nouvelle stratégie thérapeutique de correction génique *in situ* par injection intra-fémorale (IIF).

Les analyses évaluent les capacités de prolifération, de reconstitution et de résistance aux drogues après IIF du transgène *FancC-EGFP*, sur plusieurs générations de cellules. Ces données constituent le **chapitre II**.

Les mêmes expériences sont reproduites mais cette fois dans un contexte aplasique, plus proche de la réalité clinique des patients. L'efficacité des IIF dans des telles circonstances est abordée au **chapitre III**.

CHAPITRE II

LA THÉRAPIE GÉNIQUE *IN VIVO*

Avant-propos

L'ensemble des expériences présentées dans ce chapitre qui ont mené à la transduction *in vivo*, des CSH a été réalisé par mes soins. J'ai adapté la technique d'injection intra-fémorale (IIF) et la stratégie de transduction *in situ* au contexte Fanconi. J'ai procédé à la réalisation et à l'analyse des échantillons sanguins des souris ayant reçu le transgène par IIF, à l'étude des tests de résistance à la MMC *in vivo* et des tests clonogéniques *in vitro*. Au cours des transplantations secondaires et tertiaires, le sang des animaux a été analysé avec le support technique de Marie-Chantal Delisle et Valérie Bourdages.

1- Introduction

Le succès des thérapies géniques conventionnelles, recourant à la transduction *in vitro* est plusieurs fois démontré sur le modèle murin. Différents groupes rapportent un transfert génique efficace dans les souris FancA^{-/-} ou FancC^{-/-}, avec des retrovirus^{274,275}, MSCV²⁷⁶, des lentivirus^{272,273,277}, des retrotransposons ou plus récemment avec de foamy virus. En revanche, transposées en clinique, l'ensemble de ces procédures ne sont que faiblement efficaces^{199,274,278} incitant les équipes à rechercher une procédure plus adaptée aux caractéristiques Fanconi. C'est dans une telle perspective que s'inscrivent ces travaux qui tendent à mettre en lumière les avantages d'une procédure avant-gardiste.

2- Matériels et méthodes

2-1 Techniques de biologie cellulaire

2-1-1 Culture cellulaire

Les cellules utilisées dans les protocoles classiques de transfections sont des cellules rénales embryonnaires (HEK 293T) ou des cellules cancéreuses de la patiente Henrietta Lacks (HeLa). Ces cellules sont maintenues en culture dans un milieu DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, Gibco), complété de 10 % de sérum foetal bovin (FBS, Biomedica) et de 1% d'antibiotiques (50 U/mL pénicilline, 50 µg/mL streptomycine, Life Technologies). Les cellules sont placées à 37°C, dans un incubateur à 5% CO₂.

2-1-2 Transfection lentivirale

La transfection consiste en la pénétration physique ou chimique du plasmide dans les cellules cibles. Au cours de nos expériences, les vecteurs lentiviraux sont utilisés en transfection transitoire, dans les cellules de mammifères (HEK-293T). Le surnageant viral est obtenu par un mélange des trois constructions lentivirales de troisième génération^{250,279} utilisé, lors de transductions pour infecter les cellules cibles (HeLa et CSH). La veille les cellules HEK 293T sont comptées (Coulter Particule Counter) et disposées dans un pétri 100 mm à raison de 2×10^6 cellules/pétri. La transfection est réalisée le lendemain, suivant un protocole utilisant le chlorure de calcium. Le mélange de transfection est réalisé, pour 1mL final, dans les proportions suivantes : 15 µg pCMV-ΔR8.91; 5 µg pMD.G; 20 µg pSin-PGK-EGFP ou pSin-FancC-EGFP ou pSin-Hes1-IRES-EGFP. Ce mélange est complété de TE 1X pH8 (10 mM Tris-HCl pH7,6; 1 mM EDTA); CaCl₂ 0,5M et vortexé 6 fois avant d'être déposé goutte à goutte, dans une solution de HEBS 2X pH 7,05 (140 mM NaCl; 1,5 mM Na₂HPO₄+7H₂O; 50 mM HEPES).

Après une incubation de 30 min, à TP, la solution de transfection est ajoutée au milieu de culture des cellules HEK 293T qui sont incubées à 37°C. Après 12 h, un milieu de culture frais est ajouté. Dès lors, le surnageant peut être collecté. Ce premier vecteur est porteur des cassettes d'expression des gènes d'intérêt, soit la forme murine des gènes *FancC* en fusion avec le gène EGFP (pSin-*FancC*-EGFP) ou *Hes1* (pSin-*Hes1*-IRES-EGFP), sous contrôle du promoteur murin de la phosphoglycérate kinase. La construction du gène murin d'intérêt *FancC* cloné, dans le plasmide lentiviral pSin-PGK était disponible dans le laboratoire. Le second vecteur exprime les gènes de structure (pCMV-ΔR8.91), alors que le troisième code pour l'enveloppe virale (pMD.G). Ces vecteurs lentiviraux sont une gracieuseté du Dr Didier Trono de l'université de Genève (**figure 13**).

2-1-3 Transduction lentivirale

Les infections résultent de l'action du virus sur les cellules cibles. Les particules virales produites dans les cellules HEK 293T sont collectées le 3^{ème} jour, post-transfection, filtrées (0,2 μm, Corning) et concentrées par ultrafiltration (AdenoPack, Viva Science-Pure Proteomics) ou par ultracentrifugation (60 min, 35 000 rpm, 4°C, rotor SW40, Beckman) et resuspendus dans un solution de PBS 1% antibiotiques (50 U/mL pénicilline, 50ug/mL streptomycine, Life Technologies). Après la resuspension, les virions sont directement utilisés ou aliquotés et conservés à -80°C. Une fraction est conservée pour estimation du titre viral réalisée en transduisant les cellules HeLa, avec des volumes variables de surnageant virale. Après une période de 3 à 5 jours de culture, les cellules sont trypsinisées et analysées par cytométrie de flux (FACS). Le titre est calculé d'après la formule mathématique suivante :

$$((10^5 \times \% EGFP) / \text{volume de transduction}) \times 1000 = TU/mL$$

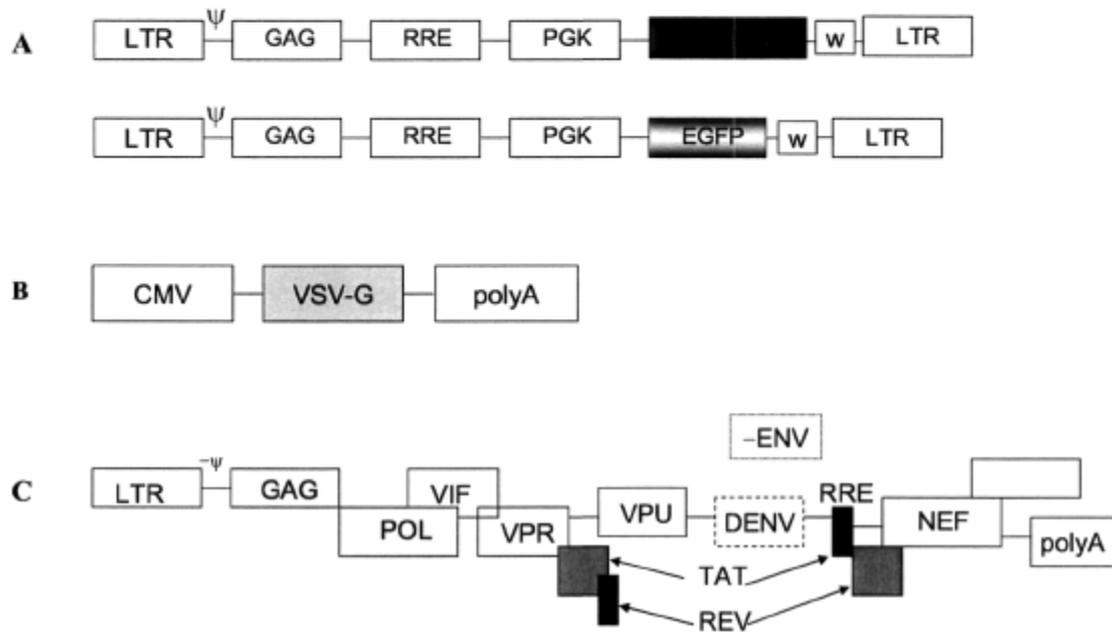


Figure 13: Représentation schématique du système de vecteurs lentiviraux

Cartes des trois constructions lentivirales de 3^{ème} génération dérivés du VIH-1 utilisées au cours de ce travail. Les transfections transitoires des HEK 293T utilisent 3 plasmides: (A) Représentation du vecteur cible contenant soit l'ADNc de *EGFP* (vecteur vide), soit la fusion *FancC-EGFP* sous le contrôle du promoteur de la phosphoglycérate kinase (PGK). Ces deux vecteurs contiennent les signaux d'encapsulation Ψ intact et de forte expression du transgène WPRE (W).

(B) Représentation du vecteur d'enveloppe codant pour le gène *env* du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G) sous le contrôle du promoteur CMV. Il est utilisé pour le pseudotypage des particules générées par les deux plasmides précédents. Ψ signal d'emballage (packaging signal). Tous trois gracieusetés du Dr Trono²⁵¹.

(C) Représentation du vecteur d'emballage codant les gènes structuraux *gag* et *pol*, les gènes régulateurs *tat* et *rev* et les protéines accessoires *vif*, *vpr*, *vpu* et *nef*²⁴¹. Le signal d'encapsulation Ψ et le gène *env* ont été délévés.

2-1-4 Cytométrie de flux

2-1-4-a Principe

La cytométrie de flux est une technique de caractérisation individuelle (cellule par cellule), quantitative de particules en suspension dans un liquide. Elle consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis (diffusion ou fluorescence) par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser. Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs d'une part, aux propriétés optiques intrinsèques des particules qui correspondent aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la particule (FSC), à leur structure interne (SSC) ou à l'auto fluorescence de certaines. D'autre part, les signaux mesurés peuvent être le fait de propriétés optiques obtenues par marquage spécifique ou de fonctions cellulaires. La fluorescence des cellules est alors exprimée en fluorescence verte (FL1) en unités arbitraires.

Ces signaux séparés par des filtres optiques sont collectés par des photo-multiplieurs, amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur. Ce procédé d'analyse individuelle est multiparamétrique et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés et les représente sous la forme d'histogrammes (un paramètre) ou de cytogrammes (deux paramètres) sur une ou plusieurs populations dont les propriétés cellulaires sont ainsi évaluées.

Les données ici présentées ont été acquises via un appareil FACScalibur de Becton-Dinckinson, leurs analyses ont utilisé le logiciel CellQuest Pro.

La séparation physique des populations cellulaires CD34 a été facilitée par l'accès à la fonction "tri " du cytomètre de flux du département de Rhumatologie et immunologie et à l'expertise de Monsieur Maurice Dufour.

1-1-2-b Procédure pour une acquisition sans marquage

En présence d'un échantillon cellulaire homogène, constitué d'un type cellulaire unique, comme lors d'analyses de cellules transfectées (HEK 293T) ou transduites (HeLa), l'examen en cytométrie de flux n'est pas conditionné à un marquage. Dans ce cas l'examen se résume à une simple quantification de la fluorescence.

L'analyse au FACS est beaucoup plus sensible que l'observation au microscope; l'oeil humain ne distinguant que des fluorescences supérieures à 10^2 unités arbitraires du cytomètre.

Les cellules sont lavées au PBS, lorsqu'il s'agit de HEK et de HeLa, elles sont préalablement détachées en présence de trypsine. Toutes les cellules sont ensuite resuspendues dans un volume moyen de 400 μ L de PBS 2 % FBS (*Fetal Bovine Serum*, Life Technologies) et transférées, dans des tubes (Falcon 5 mL Polystyrene Round-Bottom Tubes, Becton Dickinson) qui sont chargés sur un carrousel avant que l'analyse ne soit amorcée. Dans le cas d'une analyse de fluorescence simple, les représentations sous forme d'histogrammes sont préférées.

Certaines analyses des échantillons sanguins n'ont pas nécessité de marquage. Dans ce cas, la procédure de préparation des cellules a procédé selon la séquence suivante : un prélèvement de 50 μ L de sang est réalisé au niveau de la veine saphène et placé dans un tube eppendorf contenant 10 μ L d'héparine (1 i.u/mL, LEO Pharma), pour éviter la coagulation. L'échantillon est dilué dans 1 mL de PBS 2 % FBS, transféré dans un tube (Falcon 5 mL Polystyrene Round-Bottom Tubes, Becton Dickinson), où la lyse des érythrocytes est amorcée après l'ajout de 3 mL d'ammonium chloride. Après une incubation de 10min à 4°C, les échantillons sont centrifugés (8 min, 1 400 rpm, 4°C), le culot est resuspendu, dans 3 mL PBS 2 % FBS, centrifugé et à nouveau resuspendu dans 400 μ L PBS 2% FBS. Les cellules sont alors prêtes pour analyse au FACS, sans marquage.

1-1-2-c Procédure pour une acquisition avec un marquage externe

L'analyse de certains échantillons sanguins ou médullaires implique le recours à un marquage externe afin d'identifier plus précisément les lignées cellulaires. La préparation des cellules suit la séquence présentée plus haut, *in fine* le culot de cellules est resuspendu dans 400 μ L PBS 2% FBS. Afin de bloquer les sites aspécifiques, 5 % sérum de rat (StemCell Technologies) sont ajoutés à la suspension et incubés, 15 min à 4 °C. Le marquage est réalisé dans un volume de 100 μ L de cellules bloquées, en présence d'1 μ L de chacun des anticorps choisis, couplés à 4 types de fluorochromes différents (PharMingen).

Les anticorps utilisés sont couplés à quatre types de fluorochromes (PharMingen Bioscience et E. Biosciences) : allophyco-cyanin (APC), fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE) et activated peridinin chlorophyll protein (PERCP). Le marquage est spécifique de la lignée lymphoïde (CD5, B220), myéloïde (Ly6G, CD11b). Les marquages sont séparés en deux groupes, une première série de cellules est marquée avec les anticorps CD5-PERCP (lymphocytes T) et Ly6G-APC (granulocytes), alors que la seconde série est marquée par les anticorps B220-PERCP (lymphocytes B) et CD11b-APC (monocytes).

Parallèlement, des tubes contrôles (cellules non marquées, isotypes et compensation) sont constitués, afin de permettre la calibration du FACS, avant l'analyse des échantillons. Après une incubation de 30 min, dans le noir à 4°C, les tubes sont complétés de 100 μ L de PBS 2% FBS et chargés sur le carrousel de l'appareil. Les résultats sont présentés sous forme de cytogrammes.

La préparation des cellules, avant le marquage peut être sujette à quelques modifications selon la nature de l'échantillon (moelle ou sang). Le protocole de marquage reste le même à la différence près que l'analyse des cellules médullaire utilise en complément des anticorps précédemment énoncés, d'autres dirigés contre les marqueurs de cellules souches tels CD34, Sca-1⁺ et c-kit⁺.

1-1-2-d Procédure pour une acquisition avec un marquage interne

Le marquage interne est réalisé sur des cellules du sang périphérique fixées la veille (PBS 1 % PFA, 0,05 % NP40). Après deux lavages au PBS, une étape de perméabilisation de la membrane cellulaire est nécessaire pour faciliter l'entrée des anticorps. Les cellules sont alors resuspendues, dans 100 μ L PBS 2 % FBS, 0,1 % saponine-BSA et placées 20 min, à TP. Les cellules sont ensuite lavées et resuspendues à nouveau (100 μ L PBS 2 % FBS, 0,1 % saponine), avant l'ajout de l'anticorps primaire α -GFP-souris (Santa Cruz, dilution 1/100). Après une incubation d'une heure à TP, sous agitation, les cellules sont lavées au PBS et resuspendues dans 100 μ L de PBS 2 % FBS, 0,1 % saponine. L'anticorps secondaire, α -souris PE (0,2 mg/mL, Becton Dickinson) est ajouté et les placées sous agitation 20 min, à TP. Après deux lavages au PBS et une resuspension dans 400 μ L PBS, l'analyse au FACS peut être amorcée.

1-2 Techniques de biologie moléculaire

1-2-1 Préparation d'ADN

Les préparations ADN des plasmides lentiviraux pSin-*FancC-EGFP*, pSin-*Hes1-IRES-GFP*, pMD.G et pCMV. Δ R8.91 ont exigé le recours à des kits commerciaux. Une culture de la souche désirée est obtenue dans 100 mL de milieu de culture LB, incubé à 37°C, sous agitation 250 rpm, toute la nuit. Le lendemain, la culture est centrifugée (5 500 rpm, 15 min, 4°C) et le culot resuspendu, dans 10 mL de tampon de resuspension (50 mM; Tris-HCl pH 8; 10 mM, EDTA; 100 μ g/ μ L RNaseA). Après la resuspension, 10 mL de tampon de lyse (200 mM NaOH, 1% SDS (m/v)) sont ajoutés, l'ensemble est mélangé par inversion (4-6 fois) puis incubé à température pièce (TP), 5 min. L'ajout de 10 mL de tampon de neutralisation (3 M acétate de potassium, pH 5.5) permet d'arrêter la lyse. Après un mélange lent par inversion, la solution prend un aspect trouble, ce sont les protéines qui précipitent, la centrifugation permet de s'en départir (12 000 rpm, 15 min, 4°C).

Le surnageant est prélevé en évitant le culot blanchâtre de protéines et placé dans une colonne (QIAGEN-tip 500) préalablement équilibrée (750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7; 15% isopropanol (v/v); 0,15% Triton X-100 (v/v)). Le surnageant passe dans une résine par gravité, la solution de lavage (1 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7; 15% isopropanol (v/v)) est utilisée à deux reprises (2 fois 30 mL), afin d'éliminer les contaminants de la colonne. L'ADN est élué par ajout de 15 mL de tampon d'éluion (1,25 M NaCl; 50 mM Tris Cl, pH 8.5; 15% isopropanol (v/v)) au centre de la colonne. Le volume est complété de 10,5 mL d'isopropanol pour précipiter l'ADN, avant une nouvelle centrifugation (12 000 rpm, 15 min, 4°C). Le culot d'ADN est rincé avec 5 mL d'éthanol 70 %, centrifugé (12 000 rpm, 15 min, 4°C), séché 5 à 10 min pour éliminer toute trace résiduelle d'éthanol, avant d'être dissout dans 100 µL de tampon TE (10 mM Tris-Cl, pH 8, 1mM EDTA ou 10 mM Tris-Cl, pH 8.5).

À la fin de la préparation, la concentration de l'ADN est estimée au moyen d'un dosage au spectromètre de masse (GeneQuant *pro*, Biochrom), dans une cuvette de quartz (Hellma). Une dilution de la préparation d'ADN est placée dans l'appareil qui mesure l'absorbance à 260 nm et calcule la concentration de la solution, d'après la loi de Beer-Lambert :

$$A_{260} = \epsilon \times l \times c$$

où **A**: absorbance, **ε**: coefficient d'extinction molaire; **l**: longueur du parcours de la lumière; **c**: concentration).

1-2-2 Digestions enzymatiques

Les vecteurs plasmidiques ainsi obtenus font l'objet de digestion afin de s'assurer d'être en présence des constructions attendues.

Les préparations d'ADN plasmidiques sont mises en présence des enzymes de restriction voulues et du tampon adéquat comme suit, les plasmides pSin-*FancC-EGFP* et pSin-*Hes1-IRES-GFP* sont digérés en présence de l'enzyme Xba-I (1 unité) et du tampon H (Invitrogen). Le plasmide pMD.G est digéré en présence de l'enzyme EcoR-I et du tampon B (Invitrogen). Le plasmide pCMV-*AR8.91* fait l'objet d'une digestion séquentielle par EcoR-I et BamH-I, toutes deux actives en présence du tampon B (Invitrogen). Après une incubation de 2 h à 37°C, les produits de digestions sont déposés sur gel d'agarose pour une électrophorèse.

1-2-3 Électrophorèse

L'électrophorèse sur gel d'agarose sépare les produits de digestion, en fonction de leur taille. Les digestions sont déposées sur des gels d'agarose de 1 % préalablement coulés et constitués d'un mélange (m/v) d'agarose et de tampon TAE 1X (0,5 % Tris-HCl; 0,1 % acide acétique glacial; 1 µM EDTA, pH 8). Le mélange est chauffé au micro-onde avant l'ajout de bromure d'éthidium (BEt, 5 µg/mL), agent intercalant facilite la visualisation des acides nucléiques sous rayonnements ultra-violet (UV). Une fois les gels coulés et polymérisés, les acides nucléiques sont mélangés à un tampon de charge 5X (12,5 % Ficoll, dans TAE 5X, 50% glycérol, 0,25 % bleu de bromophénol) et chargés dans les puits, un marqueur de poids moléculaire est ajouté (100 pb ou 1 kb, Invitrogen). Les gels sont immergés dans le tampon TAE 1X et la migration est lancée pour 15 à 20 min, à 150 V (Helixx). L'observation sous UV permet de constater la présence de deux fragments de 2,97 kb et 7,98kb pour pSin-*FancC-EGFP*; deux fragments de 3,7 kb et 8 kb pour pSin-*Hes1-IRES-EGFP*; trois fragments de 0,77 kb, 1,6 kb et 3,63 kb pour pMD.G; deux fragments chacun de 1,27 et 10,79kb pour pAR8.91. Lorsque les profils de digestions ne correspondent pas à ceux attendus, de nouvelles transformations de bactéries sont réalisées afin de reconstituer des stocks valides.

1-2-4 Transformation de bactéries compétentes

1-2-4-a Préparation de cellules compétentes DH5 α

La transformation des constructions plasmidiques (viraux ou non) implique, le recours à une souche bactérienne dérivée d'*Escherichia coli*, DH5 α . La veille, une pré-culture de la souche bactérienne d'intérêt est étalée sur pétri de LB et incubée 12 h, à 37 °C. Le lendemain, quelques colonies sont repiquées et ensemencées, dans 5 mL de milieu de culture LB, pendant 2 h à 37°C sous agitation (250 rpm). La colonie utilisée pour inoculer la culture est ensuite diluée dans 100 mL de LB préchauffés à 37°C et incubés 2 à 3 h, sous agitation (250 rpm, 37°C), jusqu'à l'obtention d'une DO₆₀₀ < 0,6. La culture est alors centrifugée (2 500 rpm, 10 min, 4 °C) et le culot resuspendu, dans 40 mL de Tfb1 froid (KOAc 30 mM, MnCl₂ 50 mM, KCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, glycérol 15 % m/v; pH 5,8). Le lysat est laissée sur glace 5-10 min, centrifugée (4 000 rpm, 5 min, 4 °C) et le culot resuspendu dans 4 % de solution Tfb2 (Na-MOPS pH 7 10 mM, CaCl₂ 75 mM, glycérol 15 % m/v). La suspension cellulaire est aliquotée par volume de 100 μ L et stockée à -80°C. Les cellules compétentes doivent être testées avant leur utilisation, afin de déterminer leur titre, elles seront jugées propres à la transformation, si le titre est supérieur à 10⁶.

1-2-4-b Transformation de cellules compétentes DH5 α

Les bactéries sont transformées par choc thermique, mais il est possible de recourir à une transformation par choc électrique (électroporation). Un aliquot de la souche bactérienne conservé à -80 °C, est décongelé sur glace. Un volume de 30 μ L de bactéries est ajouté à une quantité variable d'ADN (10 à 100 ng), le tout est placé sur glace, pendant 20 min, avant d'être incubé à 42°C, pendant 45 sec, puis transféré sur glace 2 min. Le mélange est complété de 950 μ L de milieu de culture LB stérile et incubé 1 h à 37 °C. Les bactéries sont ensuite étalées sur un milieu solide (LB + agar) contenant l'antibiotique de sélection approprié et les pétris incubés à 37°C, toute la nuit.

Les expériences de transformations impliquent le recours à un contrôle négatif (bactéries non transformées) et un contrôle positif (variable selon l'agent de sélection). Lorsque la digestion valide la construction, un stock glycérol est constitué (900 μ L milieu de culture, 600 μ L glycérol 15 %) et conservé à -80°C .

1-2-5 Polymerase chain reaction (PCR)

Les ADN extraits des CSH sont mis en présence de tampon 10X (200 mM Tris-HCl pH8,4, 500 mM KCl), MgCl₂ (50 mM), dNTP (10 mM), Taq ADN polymérase (5U/mL) et des amorces (10 μ M) *FancC*, *EGFP* ou *GAPDH* (cf. **Tableau 5**). Un contrôle négatif de PCR est ajouté, afin de s'assurer que les échantillons n'ont pas été contaminés. Ce contrôle contient l'ensemble du mélange de la réaction exception faite de l'ADN, qui dans ce cas est remplacé par de l'eau. Les produits de PCR sont ensuite déposés sur gels d'agarose.

1-3 Expérimentations animales

1-3-1 Thérapie génique in vivo par injection intraveineuse (IV)

Dans le cadre d'une première stratégie de correction génique *in vivo*, le surnageant lentiviral a dans un premier temps fait l'objet d'une injection intraveineuse. Les souris sont immobilisées dans une cage de contention, avant que ne leur soit injectée une solution de 100 μ L de PBS 1% antibiotiques, dans laquelle les virons porteurs du transgène *FancC-EGFP* ont été resuspendus.

1-3-2 Thérapie génique in vivo par injection intra-fémorale

La chirurgie fémorale est réalisée sur des souris C57BL/6J CD45.2, âgées de 4 à 6 mois et de génotype *FancA*^{-/-}, *FancC*^{-/-} ou sauvage.

Ces animaux reçoivent, une semaine avant l'acte chirurgical, un traitement antibiotique à spectre large (0,48 mg/mL Septra co-trimoxazole BP, dans eau de boisson), pour limiter les risques d'infection. Après une anesthésie à l'isofluorane (débit 2,5 à 3% + O₂ 400 à 600 mL/min), un lubrifiant oculaire protecteur est appliqué (Lacri Lube, Allergan). Afin de limiter les douleurs de l'animal avant l'IIF, une injection d'un analgésique fort, la Buprénorphine (0,05 à 0,1 mg/kg S.C. ou I.P) est délivré en sous-cutanée, selon le protocole de chirurgie de l'animalerie du CHUL.

Les mouvements de l'animal sont réduits, lors de la chirurgie, en maintenant l'anesthésie au moyen d'un masque placé sur toute la face de la souris et délivrant un mélange d'isofluorane et d'oxygène. La chirurgie est amorcée par perforation de la tête fémorale gauche via une seringue 1cc et une aiguille 27G. La production, la concentration et le titre des vecteurs viraux sont réalisés, suivant la procédure présentée aux chapitres précédents (cf. sections 1-1-2 et 1-1-3). Les virions sont injectés à raison de 25 µL/fémur, à l'aide d'une seringue à insuline 1/2 cc et une aiguille 28G. Après l'intervention, les souris sont placées dans une cage de réveil, avant le retour dans leur cage respective. Dans le cadre d'un suivi post-opératoire, deux injections par jour de Buprénorphine (0,05 à 0,1 mg/kg S.C. ou I.P) sont administrées, sur une période de 72h.

1-3-3 Procédures de suivi du transgène

L'ensemble de la procédure expérimentale emprunté lors de la correction génique *in vivo* est schématisé à la **figure 14**. Un suivi de l'expression du transgène a été réalisé, par le biais d'analyses sanguines mensuelles et d'analyses médullaires (FACS), mais également lors de transplantations successives (secondaires et tertiaires) et au cours de tests clonogéniques *in vitro*.

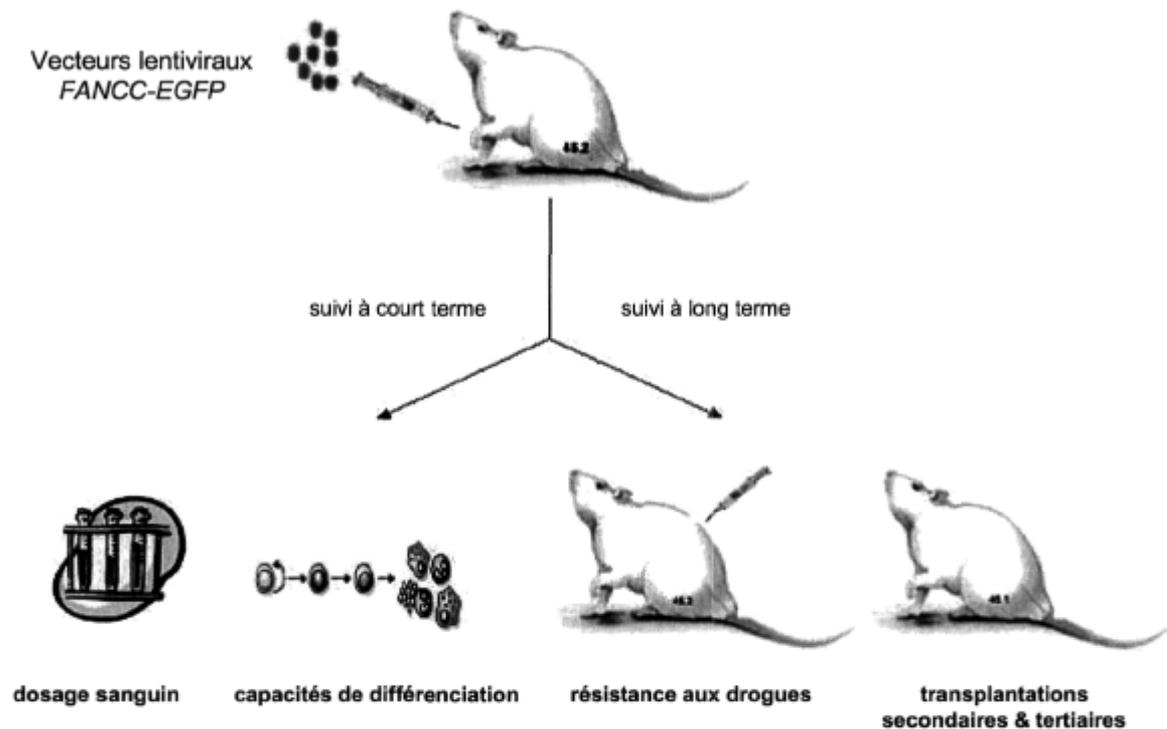


Figure 14 : Procédures de suivi du transgène après une injection intra-fémorale

Après injection intra-fémorale (IIF), un examen de l'expression du transgène est réalisé par dosage sanguin, estimation de la capacité de différenciation, résistance aux drogues (MMC) et lors de transplantations successives (secondaires et tertiaires).

Pendant les six premiers mois, des analyses des prélèvements sanguins mensuels de souris ayant fait l'objet d'une chirurgie, permettent d'estimer l'expression du transgène dans les cellules circulantes. Le traitement des cellules et leur marquage en vue d'un examen en cytométrie de flux, sont réalisés suivant les séquences précédemment décrites à la section 1-1-4-c. Au-delà, les animaux sont sacrifiés, leur moelle osseuse prélevée et analysée par FACS suivant les procédures décrites.

1-3-4 Test de survie à la MMC in vivo

Dans le contexte Fanconi, les injections séquentielles de doses non létales de mitomycine-C (MMC, Sigma) permettent d'induire une pancytopénie progressive. Conformément aux données établies²⁷¹, chaque souris reçoit une injection intrapéritonéale hebdomadaire de MMC, proportionnelle à son poids (0,3 mg/kg). Ces injections sont maintenues sur une période de 15 semaines consécutives, ces injections consécutives provoquent la mort des souris Fanconi, dans un délai de 3 à 8 semaines²⁷¹. Le recours à cette drogue permet d'estimer la modulation de l'expression sanguine du transgène, la fonctionnalité de la protéine transgénique et *in fine* l'effectivité de la correction génique au moyen de la survie des souris. Des souris sont dites traitées (T) ou non traitées (NT) suivant qu'elles aient reçu ou non de traitement à la MMC après IIF du transgène *FancC-EGFP*. Les souris font également l'objet d'un suivi, par dosage des paramètres sanguins en cytométrie de flux.

1-3-5 Tests clonogéniques

La méthylcellulose est un milieu de culture semi-solide permettant la survie et la croissance cellulaire, dans les mêmes conditions que le milieu liquide, à la différence près que les cellules filles restent en périphérique de la cellule mère, facilitant leur observation. Afin d'estimer la fonctionnalité de la protéine transgénique FANCC-EGFP et les capacités de prolifération, de différenciation et de survie des cellules corrigées, des tests clonogéniques sont effectués sur les CSH de moelle totale de souris IIF. Ces expériences ont utilisé un milieu (MethoCult GF, StemCell) contenant les cytokines (rmSCf, rmIL-3, rhIL-6, rhEPO), complété d'IMDM (*Iscove modified Dulbecco's medium*) et de 1% antibiotiques (50 U/mL pénicilline, 50 µg/mL streptomycine, Life Technologies). Un total de 5×10^4 cellules/pétri est déposé au centre de la gélose, 5 nM de MMC/pétri sont ajoutés, l'ensemble est mélangé à la seringue, avant d'être répartis dans un pétri 35 mm.

Chaque expérience de méthylcellulose est réalisée en triplicata. Les pétris sont placés 14 jours à 37°C dans un incubateur 5 % CO₂. Au 14^{ème} jour, les colonies ou CFU sont comptabilisées afin d'estimer la résistance à la MMC et les capacités de différenciation et de prolifération des cellules progénitrices. Les analyses en pCR sur certains clones incluent une étape de prélèvement par aspiration (micropipette et embout 10 µL), un lavage au PBS, pour éliminer l'excès de méthylcellulose, puis une lyse (100 mM Tris-HCl; 5 mM EDTA; 200 mM NaCl; 0,2 % SDS; 100 mg/mL protéinase K) et une centrifugation (1 400 rpm, 2 min). Le culot obtenu est dissout dans de l'isopropanol (1 v.), centrifugé (1 400 rpm, 2 min), lavé à EtOH 70 % (1 v.), centrifugé à nouveau (1 400 rpm, 2 min), séché (5 min à TP) et resuspendu, dans 10 µL de TE pH8. L'ADN est ensuite utilisé dans le cadre de réactions en PCR (cf. section 1-2-5).

1-3-6 Transplantation de moelle osseuse

1-3-6-a Purification des cellules

Toutes les expériences sur le modèle murin ont été approuvées par le Comité de protection animale de l'université Laval. Les souris utilisées dans le cadre de nos procédures expérimentales, ont un génotype B6.SJL-PtcaPep3b/BoyJ CD45.2 ou CD45.1. Ces deux marqueurs de surface CD45.1 et CD45.2 sont retrouvés sur l'ensemble des cellules de l'organisme et s'avèrent d'une utilité considérable, dans le cadre d'un suivi de la transplantation. Les cellules de la donneuse 45.2 étant transplantées dans une souris receveuse 45.1, il devient aisément possible d'observer l'apparition d'un chimérisme de l'organisme receveur.

Lors de ces expériences, un nombre moyen de 4 à 6 souris C57BL/6J, âgées de 4 et 6 mois, sont utilisées. Le sacrifice des animaux est précédé d'une anesthésie à l'isofluorane (Forane, isofluorane, USP, Baxter), suivie d'une euthanasie au CO₂ et d'une dislocation cervicale. Les trois os majeurs des membres (tibias, fémurs et humérus) sont prélevés sur chaque souris, ainsi que les organes internes (rate, thymus et sternum).

Pour extraire les cellules souches, les os sont dépouillés de leur moelle qui est récupérée dans un tube Falcon 1 mL, au moyen d'une seringue 1cc (Terumo), d'une aiguille 25G (Terumo) et de 1 mL de PBS stérile. Les cellules de moelle totale récupérées sont dans un premier temps débarrassées des érythrocytes, grâce à l'ajout de 3 mL d'ammonium chloride (StemCell Technologies) à la solution contenant les cellules médullaires. Ce mélange est placé 10 min, à 4°C, avant une centrifugation (8 min, 1 400 rpm, 4 °C). Le culot est ensuite lavé au PBS- 2 % FBS (*Fetal Bovine Serum*, Life Technologies), avant d'être resuspendu dans du PBS-2% FBS. Les cellules médullaires d'un même génotype sont alors groupées et comptées à l'hémacytomètre (Bright-Line, Hausser Scientific). À cette étape les cellules totales de la moelle peuvent être utilisées brutes (extraction ARN, transplantation) ou subir un procédé de séparation supplémentaire afin d'isoler différents types de CSH. Dans ce dernier cas, le recours à une colonne séparation couplée à l'utilisation d'anticorps appropriés est nécessaire (cf. section 3-2-1).

1-3-6-b Transplantation médullaire

In vivo, l'animal receveur irradié a généralement un avantage sélectif facilitant le développement de cellules greffées, les populations endogènes étant détruites et les niches libérées. Dans le cadre des transplantations secondaires et tertiaires, les cellules médullaires sont préparées suivant la même procédure que celle détaillée au paragraphe précédent. La transplantation de moelle osseuse est réalisée sur des souris CD45.1 létalement irradiées (950cG, GammaCell-40, MDS Nordion) et ayant reçu, une semaine avant la transplantation, un traitement antibiotique (0,48 mg/mL Septra co-trimoxazole BP, dans eau de boisson). Un total de 2×10^6 cellules/mL est délivré à chaque souris, par voie intraveineuse (veine de la queue), à l'aide d'une seringue à insuline et d'une aiguille 27G^{1/2} (Terumo).

1-3-7 Nécropsie et analyses histologiques

Le prélèvement de certains organes internes (rate, thymus) et d'os (sternum, fémurs) est réalisé sur des animaux morts, sacrifiés pour expérimentation ou en raison de signes de détresse. À des fins de conservations, les organes sont placés, dans une solution de formaline tamponnée 10 % (Sigma-Aldrich) et envoyés au service de coupes histologiques (Département d'endocrinologie, CHUL). Tous les prélèvements sont colorés à l'Hématoxyline-éosine (H&E) et incorporés en paraffine. Les coupes de 4 µm pour le sternum et de 5 µm pour les organes lymphoïdes (rate et thymus) sont réalisées au microtome. Le sternum exige préalablement une décalcification avant son incorporation dans un bloc de paraffine, il est ensuite coupé par microtome et coloré (H&E).

2- Résultats

Certaines des expériences de ce chapitre font mention du transgène *Hes1* qui appartient à un autre projet, mais dont les mises au point ont été réalisées de façon concomitante à celles de *FancC*.

2-1- Modalité de conservation des surnageants

Compte tenu de la longueur d'une expérience d'IIF, la possibilité de produire des surnageants en grande quantité et de les conserver a rapidement été envisagée. À cet effet, une première évaluation devait estimer la capacité des virions à résister à la congélation, sans que leurs propriétés infectieuses ne soient altérées. Les transduction de HeLa utilisent des particules virales porteuses des transgènes *EGFP*, *FancC-EGFP* ou *Hes1-IRES-EGFP* fraîchement recueillies versus des surnageants congelés, avant leur utilisation (**figure 15**).

L'analyse en cytométrie de flux (FACS) révèle une efficacité de transduction des HeLa comparable que les surnageants soient frais ou congelés. Les surnageants frais fournissent une transduction de 9 % pour *EGFP*, 39 % *FancC-EGFP* et 58 % *Hes1-IRES-EGFP*. Les surnageants congelés à -80°C , avant leur utilisation, induisent une efficacité de transduction de 7 %, 37 % et 50 %, respectivement pour les virions porteurs des transgènes *EGFP*, *FancC-EGFP* et *Hes1-IRES-EGFP*.

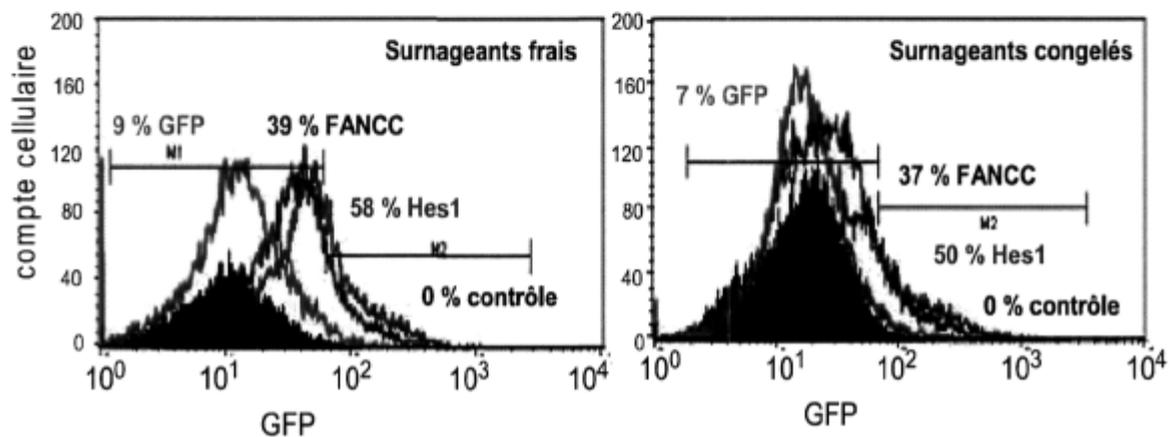


Figure 15 : Traitement des surnageants lentiviraux et transduction de HeLa

Analyses par FACS des cellules HeLa transduites avec différents surnageants *GFP* (vert), *FancC* (bleu) ou *Hes1* (rose) et contrôle de cellules non transduites (violet) **(A)** Les cellules ont été transduites par des surnageants frais et concentrés par ultracentrifugation **(B)** Les cellules sont transduites par des surnageants concentrés et congelés à -80°C . Titre viral 2×10^7 TU/mL. Expérience reproduite avec $n = 2$.

L'efficacité de transduction moyenne est de 35 % avec des surnageants frais et de 31 % en présence de surnageants congelés. La conservation à -80°C ne paraît donc pas affecter les capacités infectieuses des virions.

Des expériences similaires sont reproduites avec les cellules $\text{Lin}^{-}\text{Thy1.2}^{-}$ (LT), population que l'on souhaite cibler, lors de la transduction *in vivo* (**figure 16**).

L'analyse en cytométrie de flux révèle des taux de transduction pour les surnageants frais, compris entre 63 % et 64 % pour les transgènes *EGFP*, *FancC* et *Hes1*, issus de surnageants frais, soit une transduction moyenne des cellules LT de 63 %. Lorsque les expériences sont reproduites, en présence de surnageants préalablement congelés, les niveaux d'expression des transgènes sont relativement similaires, avec un taux de transduction moyen de 57 %. Seule l'expression du transgène *EGFP* affiche une légère réduction d'expression après congélation.

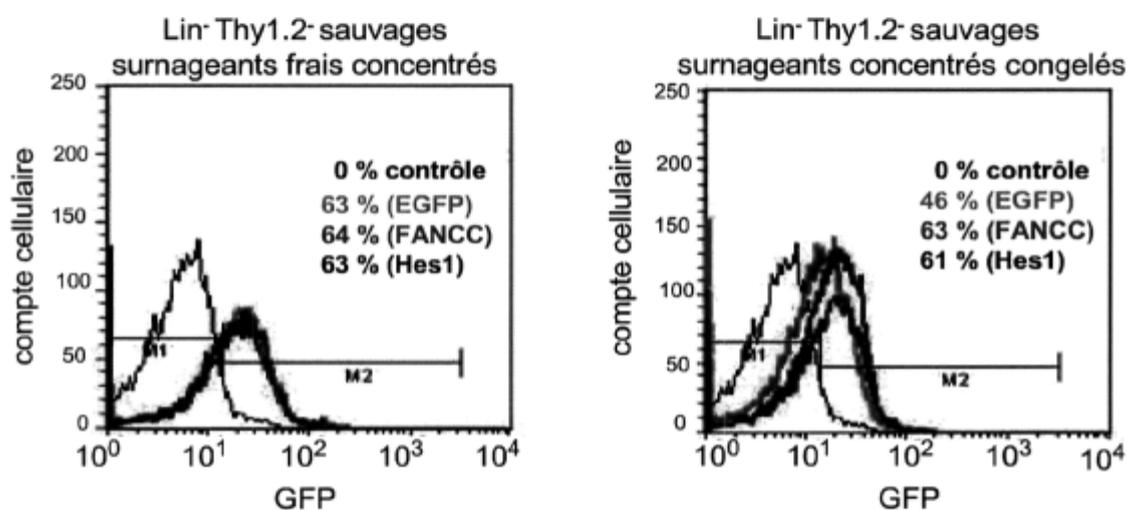


Figure 16 : Traitement des surnageants lentiviraux et transduction des cellules LT

(A) Analyses par FACS des cellules Lin⁻Thy1.2⁻ transduites *in vitro* par différents surnageants frais et concentrés *EGFP* (vert), *FancC* (rose) ou *Hes1* (bleu), contrôle non transduites (noir). (B) Transduction via des surnageants concentrés et conservés à -80C, avant leur utilisation. Titre viral 6×10^8 TU/mL. Expériences reproduites avec $n = 4$.

Notons que l'efficacité de transduction est tributaire du titre viral, aussi la moindre transduction des HeLa est ici le fait d'un titre viral plus faible.

Cette première série d'expérimentations démontre qu'une conservation des particules virales à -80°C, n'altère aucunement l'efficacité de transduction des virions et ne nuit pas à l'expression des transgènes qu'ils véhiculent.

2-2- Transduction par injection intraveineuse

Dans le cadre d'une première stratégie de transduction *in vivo*, le transgène *FancC-EGFP* a fait l'objet d'une administration par voie intraveineuse. Un mois après l'injection du surnageant lentiviral, dans la veine de la queue, les analyses sanguines en cytométrie de flux des animaux *FancC^{-/-}* et sauvages n'ont retrouver aucune trace de la fluorescence associée à l'expression du transgène *FancC-EGFP* (données non présentées). Les données n'étant pas probantes, l'usage de cette technique est abandonné au profit d'une autre stratégie.

2-3- Transduction par injection intra-fémorale

2-3-1 Évaluation de l'efficacité technique de l'IIF

La stratégie de correction génique *in vivo* par injection intra-fémorale est une approche novatrice et jamais usitée dans le contexte Fanconi. Aussi, avant de s'engager plus avant dans l'évaluation de la correction génique, il convenait dans un premier temps, d'en estimer la faisabilité technique. À cet effet, plusieurs séries d'expériences visaient à délivrer un transgène aisément retracable dans les cellules circulantes. Lors de cette étape préliminaire, le recours au transgène *EGFP*, issu du plasmide pSin-*IRES-EGFP* est donc préféré.

2-3-1-a Expression sanguine du transgène

Les cellules HEK 293T sont transduites avec les constructions virales, de façon à disposer de particules porteuses du transgène *EGFP* (cf. 1-1-2). Les virions sont collectés, concentrés, avant d'être administrés, lors d'une chirurgie sur le fémur gauche, dans des souris sauvages ($n = 16$) et *FancC*^{-/-} ($n = 8$), les souris contrôles recevant une dose de solution saline (cf. 1-3-2). L'expression sanguine du transgène a fait l'objet d'un suivi mensuel, au moyen d'analyses en cytométrie de flux, chez tous les animaux, sur une période de 5 mois consécutifs (**figure 17**).

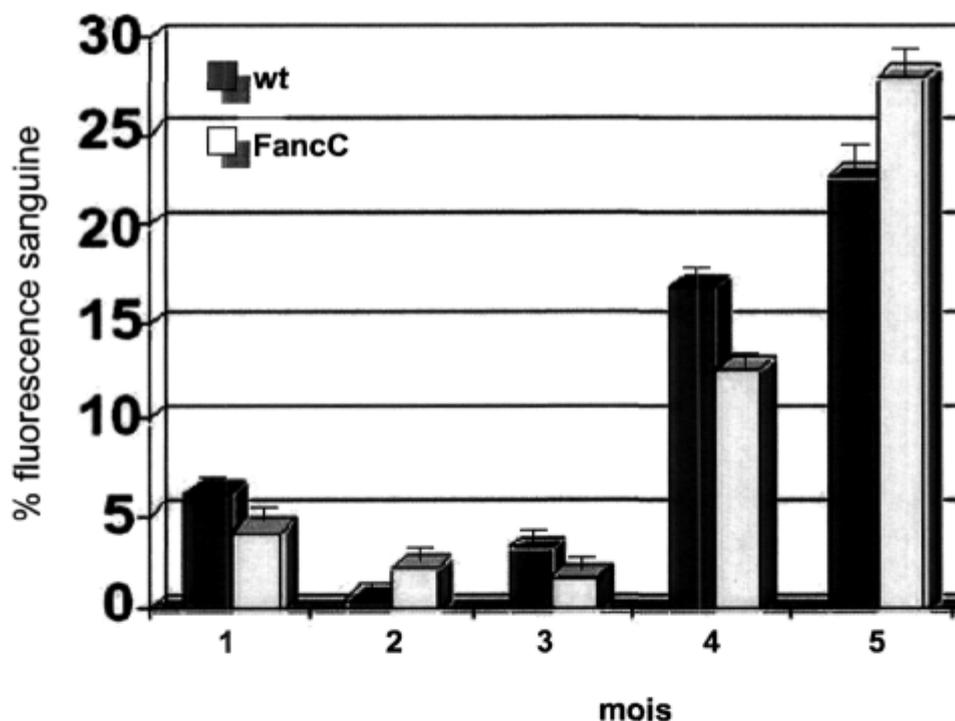


Figure 17 : Expression sanguine du transgène *EGFP* après chirurgie fémorale

Analyse par FACS de l'expression sanguine du transgène *EGFP* chez les souris sauvages wt ($n = 16$) et *FancC*^{-/-} ($n = 8$). Chaque colonne est une moyenne de 8 à 16 valeurs, (+/- écart-type). Titre 8×10^8 TU/mL.

L'expression du transgène est corrélée au pourcentage de fluorescence, dans les cellules du sang circulant, des animaux injectés avec le transgène *EGFP*. Dès la premier mois suivant la chirurgie, le taux moyen de fluorescence sanguine était de 6 % chez les souris sauvages et de 4,5 % chez les souris *FancC^{-/-}*. Les proportions de fluorescence sanguine ont fluctué, les trois premiers mois, mais la tendance générale était à l'augmentation régulière, chez tous les animaux quel que soit leur groupe génotypique.

Quatre mois après la chirurgie, les niveaux étaient augmentés respectivement de deux et quatre fois, pour atteindre 16 % chez les sauvages et 12 % chez les *FancC^{-/-}*. Au 5^{ème} mois, l'expression de la fluorescence sanguine atteint un maximum de 23 % pour les sauvages et 27 % pour les *FancC^{-/-}*. De façon à estimer les conséquences résultant du seul du seul acte chirurgical, des souris injectées de saline sont utilisées comme contrôle négatif (n = 2) et ne présentaient aucune expression de fluorescence sanguine. La fluorescence détectable relève donc exclusivement de l'expression du transgène *EGFP*, qui a préalablement fait l'objet d'une intégration dans le génome des cellules médullaires dont la nature reste à déterminer.

2-3-1-b Expression médullaire du transgène

Après une période de 5 mois, les animaux sont sacrifiés et leur moelle totale rassemblée et analysé en cytométrie de flux, afin de comparer l'expression médullaire du transgène *EGFP* en fonction de l'appartenance génotypique (**figure 18**).

Si l'expression sanguine du transgène est relativement équivalente entre les *FancC^{-/-}* (27%) et les sauvages (23 %), l'expression médullaire diffère grandement. Les souris *FancC^{-/-}* présentent un taux de fluorescence de 25 %, soit une augmentation de cinq fois, comparativement aux sauvages (5 %).

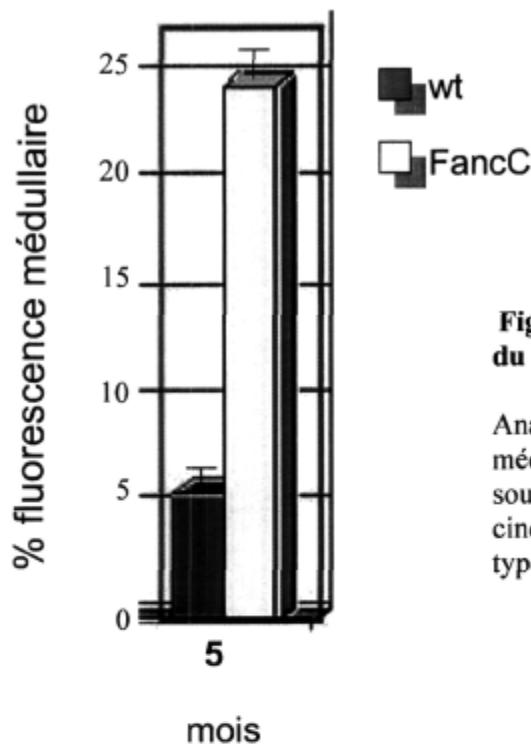


Figure 18 : Expression médullaire du transgène EGFP selon le génotype

Analyse par FACS de l'expression médullaire du transgène *EGFP* pour les souris sauvages ($n = 8$) et *FancC*^{-/-} ($n = 8$) au cinquième mois post-chirurgie, +/- écart-type. Titre 8×10^8 TU/mL.

Cette différence pourrait être le fait d'une atteinte différentielle des cellules souches, des cellules progénitrices ou des cellules précurseurs de la moelle. Elle pourrait également être imputable à l'effet différentiel de la transduction virale sur les cellules Fanconi. Bien qu'aucune étude n'en fasse mention, il est possible que les CSH Fanconi soient plus enclines à être transduites que les cellules sauvages.

De plus, ces données démontrent l'expression stable et durable du transgène, dans des cellules résidentes de la moelle et donc potentiellement dans des cellules souches. Cette atteinte facilite le maintien de la construction exogène, dans leurs descendance soient les cellules différenciées en circulation dans le sang. Dans le cadre de cette expérience des souris contrôles non injectées ou injectées avec une solution de saline, n'ont exprimé aucune fluorescence médullaire.

Dans le cadre d'une autre procédure expérimentale, l'expression du transgène est cette fois estimée, dans les cellules médullaires de chacun des fémurs (**figure 19**). La moelle totale d'une souris non injectée est utilisée comme contrôle négatif.

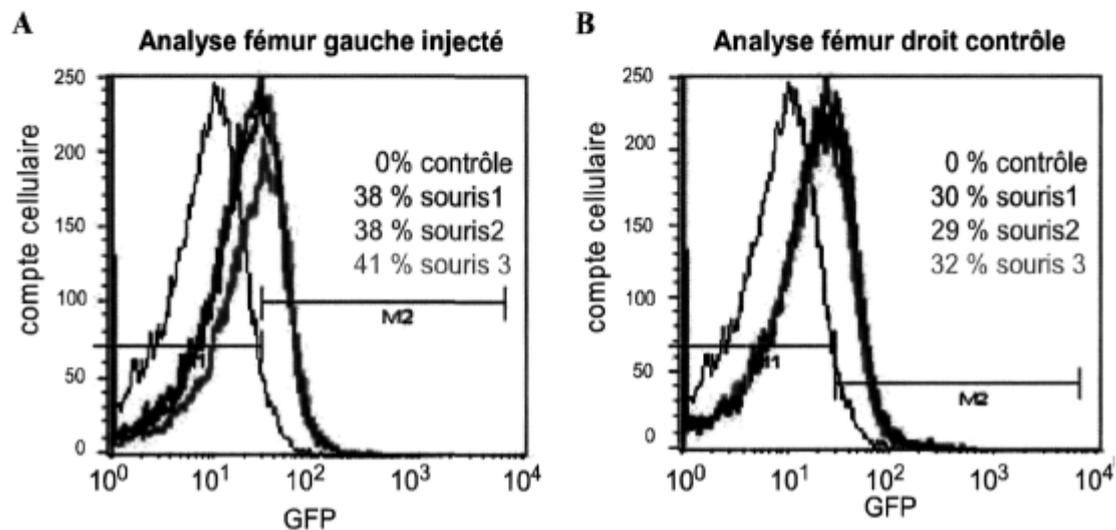


Figure 19 : Expression médullaire du transgène *EGFP* en fonction du fémur

Analyse comparative par FACS de l'expression du transgène *EGFP*, dans le fémur gauche et droit des souris IIF. (A) Cellules de moelle totale résidentes du fémur gauche, fémur injecté (B) Cellules de moelle totale résidentes du fémur droit non injecté. Contour noir: souris contrôle non injectée, contours de couleur: souris injectées en IIF. Titre 5×10^8 TU/mL.

L'examen individuel de chaque fémur a permis, d'une part d'identifier l'expression du marqueur fluorescent dans les cellules résidentes de la moelle. D'autre part de détecter dans le fémur gauche (fémur injecté) des animaux injectés, des niveaux de fluorescence équivalents à ceux retrouvés dans le fémur droit (fémur non injecté).

L'expression moyenne du transgène, dans le fémur injecté est de 39%, comparativement à un taux de 30 %, dans le fémur droit qui rappellons-le n'a fait l'objet d'aucune chirurgie. Cette observation témoigne de l'existence d'une population cellulaire mobile, capable de migrer d'un environnement médullaire à l'autre.

Si la première séquence de ce travail a confirmé la réalisation technique de l'IIF, la deuxième séquence devait permettre de déterminer si une correction génique pourrait être obtenue par l'administration intra-fémorale du gène correcteur *FancC* .

2-3-2 Évaluation de la correction génique par injection intra-fémorale

Les premières expériences d'IIF ne laissaient en rien augurer de l'habileté des transgènes ainsi délivrés à corriger un défaut génétique. Pour évaluer le caractère thérapeutique de cette procédure, les mêmes expériences d'IIF sont reproduites, mais cette fois en délivrant le transgène correcteur *FancC-EGFP*, dans des souris *FancC*^{-/-}, *FancA*^{-/-} et sauvages.

Dans un premier temps, le suivi de l'expression du transgène est réalisé, suivant les mêmes procédures que pour EGFP, soit par le biais d'analyses individuelles des échantillons sanguins et médullaires (FACS). Parallèlement, afin de caractériser les effets résultants du seul acte chirurgical, une souris *FancA*^{-/-} et une souris sauvage, ont reçu une dose de saline et sont utilisées comme contrôles négatifs de la procédure d'IIF, des souris n'ayant fait l'objet d'aucune procédure expérimentale constituaient le contrôle négatif de l'expérience.

2-3-2-a Expression sanguine du transgène dans les souris primaires

Un total de 22 souris, réparties selon leur appartenance génotypique, soit 8 souris sauvages, 6 souris *FancA*^{-/-} et 8 souris *FancC*^{-/-} a reçu, lors d'une chirurgie intra-fémorale, une dose unique des virions porteurs du gène *FancC-EGFP*. Dès le mois suivant l'IIF, les analyses mensuelles ont révélé l'expression du transgène, dans la circulation sanguine de toutes les souris indifféremment de leur génotype (figures 20).

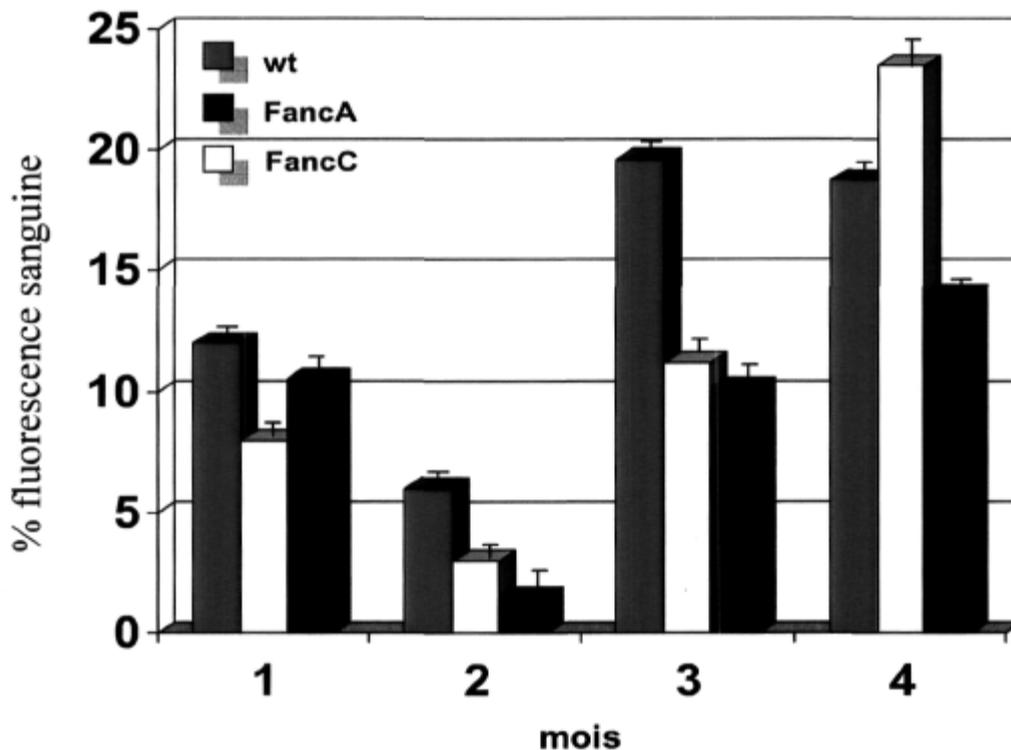


Figure 20 : Expression sanguine du transgène *FancC-EGFP* après IIF

Analyse par FACS de l'expression sanguine du transgène *FancC-EGFP*, sur une période de 5 mois, chez les souris IIF sauvages (n = 5), *FancA*^{-/-} (n = 3) et *FancC*^{-/-} (n = 5). (+/- écart-type). Titre 9×10^8 TU/mL.

Au premier mois suivant la chirurgie, le transgène est plus présent dans le sang circulant des souris sauvages (12 %) et des *FancA*^{-/-} (11 %), que dans celui des souris *FancC*^{-/-} (8 %). Aucune fluorescence sanguine n'est en revanche retrouvée chez les souris contrôles (donnée non présentée). Au deuxième mois, l'expression est réduite pour toutes les souris, avant d'augmenter graduellement au 3^{ème} et 4^{ème} mois et atteindre le niveau moyen de 17% pour les sauvages, 23% pour les *FancC*^{-/-} et 13% pour les *FancA*^{-/-}. Cette fluorescence témoignait de l'expression de la protéine transgénique de fusion FANCC-EGFP et donc de l'intégration du transgène dans des cellules capables de générer toutes les cellules du sang circulant. En revanche, cette expression ne pouvait en aucune façon être garante d'une quelconque fonctionnalité de la protéine transgénique et encore moins de sa participation aux processus biologiques de la cellule.

Pour déterminer la correction phénotypique des cellules ayant intégré le transgène, il fallait évaluer si les cellules transduites exprimaient un transgène fonctionnel capable d'intégrer des processus cellulaires majeurs. Le contexte de l'AF permettait de disposer d'un traitement facilitant une telle évaluation. En effet, les cellules et l'organisme Fanconi sont hypersensibles aux dommages induits par la MMC. Dans cette situation, des injections séquentielles de doses non létales de MMC, administrées sur une base hebdomadaire permettraient de faire un tri sélectif entre les cellules complémentées et les non complémentées, pour *in fine* permettre ou non la survie de l'animal. À cette étape, les animaux sont séparés en deux sous-groupes, selon qu'ils reçoivent ou non le traitement de MMC.

2-3-2-b Expression médullaire du transgène dans les souris primaires

Une première cohorte ayant reçu le transgène *FancC-EGFP* par IIF, est sacrifiée au 6ème mois. La moelle osseuse de ces souris primaires est groupée par génotype (souris sauvages (n = 5), *FancA*^{-/-} (n = 3) et *FancC*^{-/-} (n = 5)), pour être transplantée en série dans des receveuses secondaires sauvages, létalement irradiées (n = 26) (TR1).

Avant l'expérience de transplantation, un échantillon cellulaire de chaque groupe génotypique est analysé en cytométrie de flux (**figure 21**).

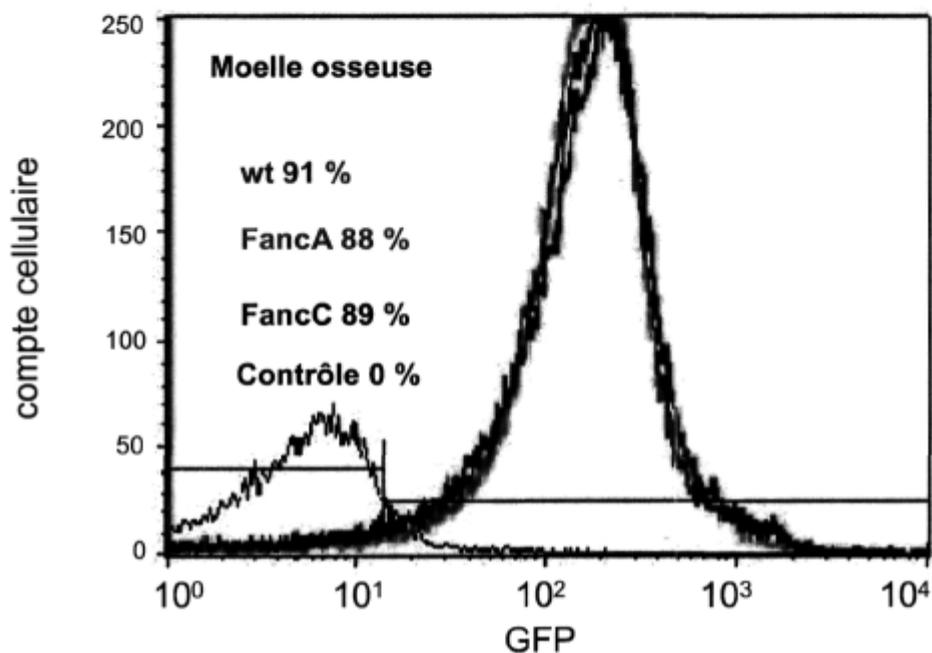


Figure 21 : Profil des cellules médullaires des souris IIF non traitées

Analyse par FACS de l'expression du transgène *FancC-EGFP*, dans les cellules de moelle totale des souris IIF non traitées à la MMC. Profil des souris sauvages (n = 5) (vert), *FancA*^{-/-} (n=3) (rose), *FancC*^{-/-} (n = 5) (bleu), moelle de souris contrôle non injectée (noir). Titre viral 9×10^8 TU/mL.

La cytométrie de flux révèle une expression de la fluorescence équivalente, dans les cellules médullaires, quel que soit le génotype des souris primaires. Le niveau d'expression du transgène est de 91% chez les sauvages, 88% chez les *FancA*^{-/-} et 89% chez les *FancC*^{-/-}. Les cellules résidentes de la moelle expriment des niveaux de fluorescence importants laissant supposer une atteinte possible des CSH.

Afin de s'en assurer et de confirmer que l'intégration du transgène ne se limitait pas à une population cellulaire, des analyses plus approfondies en cytométrie de flux sont réalisées (figure 22).

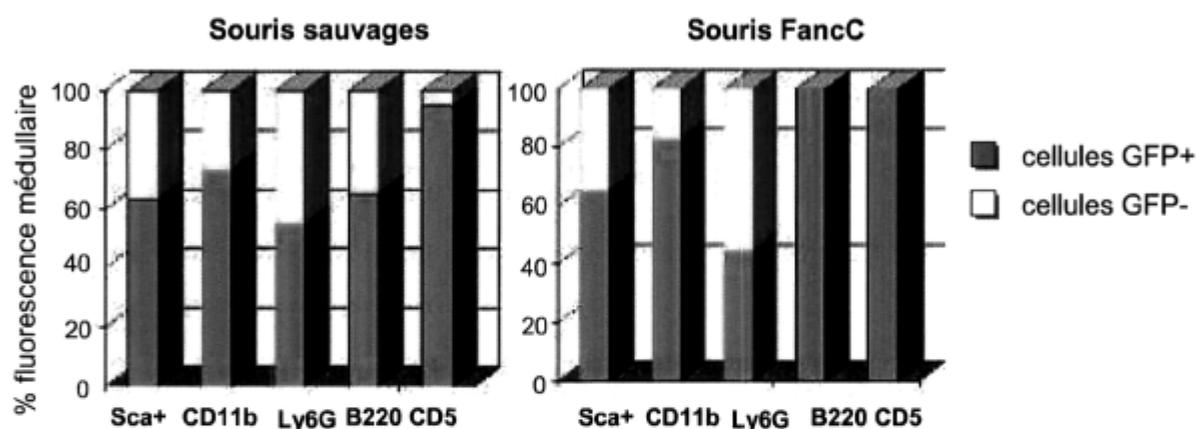


Figure 22 : Proportion des différentes lignées cellulaires dans souris secondaires

Analyse par FACS de l'expression médullaire du transgène dans les différentes lignées cellulaires des souris secondaires sauvages et $FancC^{-/-}$, représentatives. Expression des cellules progénitrices ($Sca1^{+}$), lymphocytes T (CD5), lymphocytes B (B220), monocytes, (CD11b) et granulocytes (Ly6G).

Un tel examen confirme l'expression ubiquitaire du transgène, retrouvé dans toutes les lignées tant lymphoïdes (CD5 et B220) que myéloïdes (Ly6G et CD11b), mais également dans les cellules progénitrices ($Sca1^{+}$), des souris primaires sauvages et $FancC^{-/-}$. La proportion de cellules $EGFP^{+}$ est comprise entre 50 et 92 % chez les souris sauvages et entre 40 et 100 %, chez les $FancC^{-/-}$.

L'expression de la fluorescence dans les cellules progénitrices (60 %) dans les deux groupes permet de constater l'efficacité de l'IIF à cibler les cellules primitives.

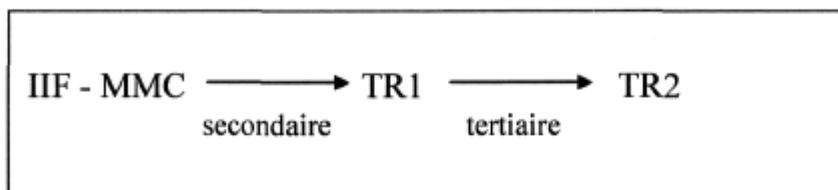
Par ailleurs, les souris *FancC^{-/-}* expriment le transgène dans 100 % des cellules lymphoïdes, T et B confondus, ce qui pourrait refléter l'atteinte d'une cellule progénitrice lymphoïde ou d'une cellule précurseur.

Par la suite, des analyses de plus long terme sont réalisées, de façon à déterminer la nature et les propriétés exactes des cellules affectées par la transduction lentivirale. À cette fin, des tests de résistance aux drogues et des transplantations successives (secondaires et tertiaires) sont réalisés.

Compte tenu du fait que le caractère souche d'une cellule n'est déterminé qu'a posteriori, seul des expériences de transplantations successives permettront d'apprécier l'atteinte des cellules les plus primitives.

La moelle osseuse de ces souris primaires IIF est groupée par génotype et transplantée en série dans des receveuses secondaires sauvages, létalement irradiées (n= 26) (TR1). La séquence expérimentale est indiquée au **tableau 5**.

Tableau 5 : Séquence expérimentale pour les souris IIF non traitées



La moelle totale de souris primaires injectées non traitées à la MMC ont fait l'objet de transplantations secondaires (TR1). Les souris secondaires sont sacrifiées 7 mois plus tard et utilisées dans le cadre de transplantations tertiaires (TR2).

2-3-3 Transplantation secondaire de moelle totale de souris *I^{aires}* complémentées

2-3-3-a Expression sanguine du transgène dans les souris secondaires

Après une destruction complète du système hématopoïétique par l'irradiation, seules les cellules souches sont capables de le reconstituer de façon récurrente un. L'expression du transgène *FancC-EGFP* est donc recherchée dans le sang des souris secondaires transplantées avec la moelle des souris primaires IIF (TR1) (**figure 23**).

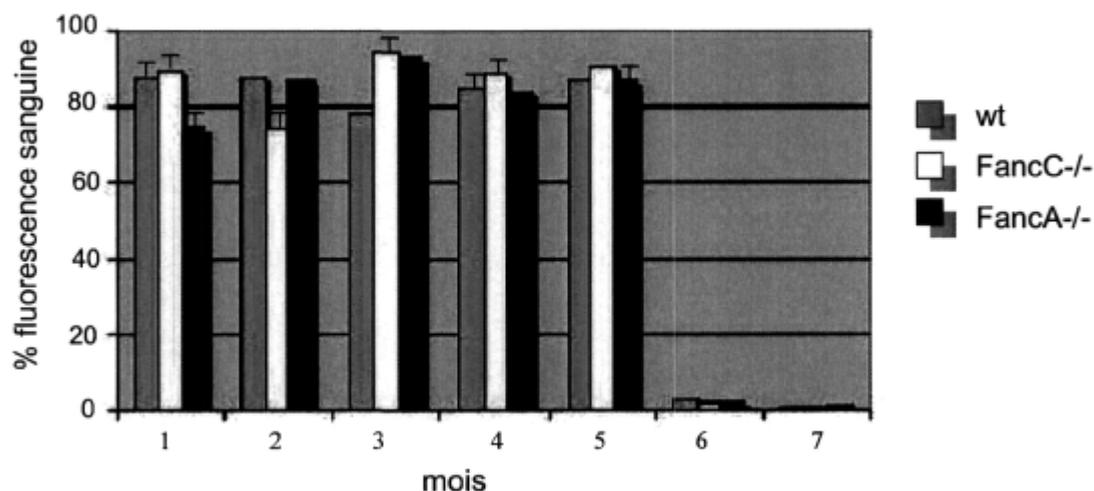


Figure 23 : Expression sanguine du transgène dans les souris secondaires

Analyse par FACS de l'expression sanguine du transgène *FancC-EGFP*, dans les souris secondaires (TR1). Les données sont une moyenne de sauvages (n=14) FancA^{+/+} (n = 12) et FancC^{+/+} (n = 8), +/- écart-type.

Les cinq premiers mois, les analyses sanguines mensuelles des receveuses (n = 34) ont démontré une expression stable de la fluorescence à un niveau constant compris entre 79% et 90 % chez les sauvages, entre 75 % et 90 % chez les FancC^{-/-} et entre 75 % et 90% chez les FancA^{-/-}.

Ces taux signaient non seulement le maintien du transgène, mais également la constance de son expression, dans l'ensemble des cellules de la circulation périphérique. Ces premières données confirment le maintien de l'expression du transgène dans les cellules circulantes, après la transplantation secondaire et ajoutent à la probabilité d'une atteinte des CSH primitives. Les cellules dites de LTR (*long terme reconstitution*) soient les CD34⁻ CD34⁺ et les CD34⁻ CD38⁻.

Au 6^{ème} mois post-chirurgie, toutes les souris de la TR1 ont cessé d'exprimer la fluorescence sanguine. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer la perte soudaine de fluorescence: la sensibilité de la partie *EGFP* aux variations physiologiques (pH, pression osmotique), une réaction du système immunitaire, une demi-vie du EGFP réduite par les expérimentations successives, une perte de la partie *EGFP* en raison de son caractère encombrant et inutile pour la cellule (folding, temps de maturation du fluorochrome), une mutation ponctuelle ou une atteinte de la protéine transgénique qui pourrait être tronquée. Mais la principale hypothèse évoque plutôt une translocation qui serait responsable de la perte partielle (*EGFP*) ou intégrale du transgène (*FancC-EGFP*). Une façon de répondre à ces interrogations est de soumettre une partie des souris secondaires à un traitement visant à estimer la résistance des cellules aux dommages causés par un agent pontant et de fait à évaluer la capacité de survie des animaux (courbes de survie).

2-3-3-b Estimation de la survie des souris secondaires

Le seul moyen de s'assurer de la fonctionnalité de la protéine transgénique *FANCC* est de soumettre les souris à des injections hebdomadaires de doses non létales de MMC. Cette stratégie place les souris dans un contexte de réparation qui à terme déclenche une aplasie chez les Fanconi non corrigées. Chez les sauvages ce traitement est sans conséquence sur la survie.

Après 14 semaines, d'un tel traitement, toutes les souris de la TRI ayant reçu la moelle totale de $FancA^{-/-}$ ($n = 5$), ainsi que la souris contrôle $FancC^{-/-}$ non corrigée ont succombé. Cette mort attendue contraste avec la survie des animaux secondaires transplantés à partir de moelle de souris sauvages et surtout celle de $FancC^{-/-}$ corrigées, confirmant non seulement la constance de l'expression du transgène, mais surtout la fonctionnalité de la protéine qu'il code. Cette réversion de l'hypersensibilité des souris $FancC^{-/-}$ à la MMC est le résultat majeur de tout traitement de correction génique.

Une autre méthode pour répondre à ces questions est de procéder à des tests clonogéniques réalisés *in vitro*, de façon à estimer l'atteinte des cellules progénitrices et leur capacité à proliférer et à générer des colonies dans un milieu sélectif (en présence de MMC).

2-3-3-c Test clonogénique sur la moelle totale de souris secondaires

Ce test permet d'estimer les propriétés hématologiques des cellules progénitrices en évaluant leur capacité de survie, leur aptitude à former des colonies ou CFU (colony forming unit) dans un milieu semi-solide en présence ou non de MMC. Le ratio du nombre de CFU en présence et en absence de MMC détermine le taux de survie des cellules (**figure 24**).

Réalisés avec les cellules de moelle totale de souris secondaires, avant leur utilisation dans la procédure de transplantation tertiaires (TR2), ces tests visent à estimer la fonctionnalité de la protéine transgénique FANCC. Le décompte des CFU capables de résister à la présence de l'agent mitogène (MMC), révèle que les cellules progénitrices des souris $FancC^{-/-}$ complémentées ont une croissance clonale comparable à celle des sauvages. Elles sont capables de survie, de prolifération et de différenciation au même titre que leurs homologues sauvages.

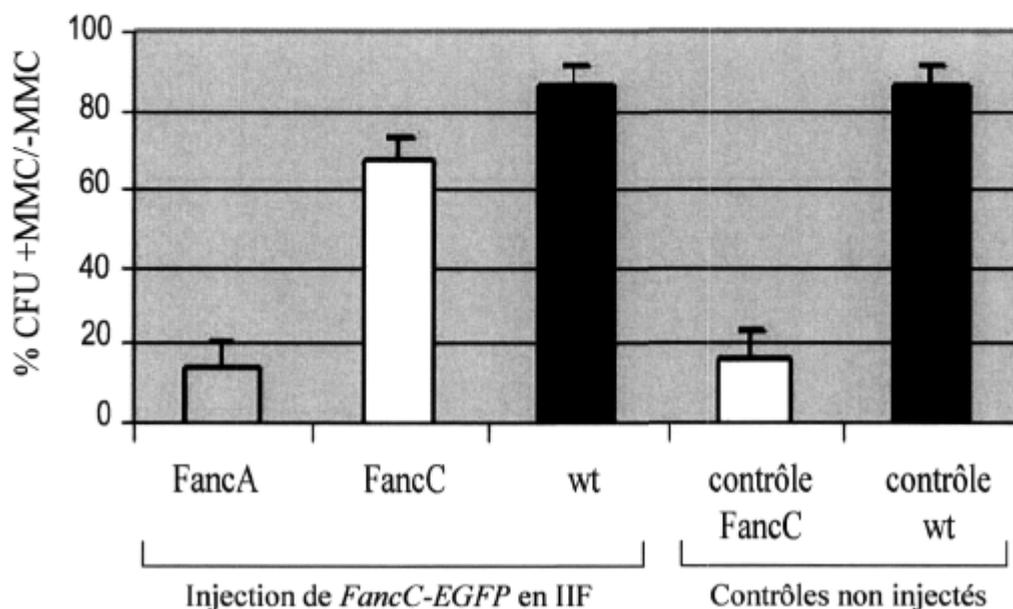


Figure 24 : Test de clonogénique sur la moelle totale de souris secondaires

Test clonogénique sur les cellules de moelle totale de souris secondaires TR1 ayant reçu la moelle de souris sauvages (n = 3). *FancA*^{-/-} (n = 1), *FancC*^{-/-} (n = 3), contrôles non complémentées: sauvages (n = 2), *FancC*^{-/-} (n = 2). Les cellules provenant des différentes souris sont cultivées en présence de MMC et le décompte des colonies est réalisé après 14 jours. Données en triplicata pour chaque souris, +/- écart-type.

L'expression du transgène *FancC-EGFP* dans les cellules déficientes en protéine FANCC promeut la croissance en présence de MMC. L'avantage conféré par cette expression est encore plus évidente quand les données sont comparées à celles de souris contrôles. La capacité de survie des cellules progénitrices *FancC*^{-/-} complémentées est de l'ordre de 70% en présence de MMC, soit une augmentation d'un facteur 6 comparativement à celle des souris *FancC*^{-/-} contrôle (non injectées) ou *FancA*^{-/-} (12 %).

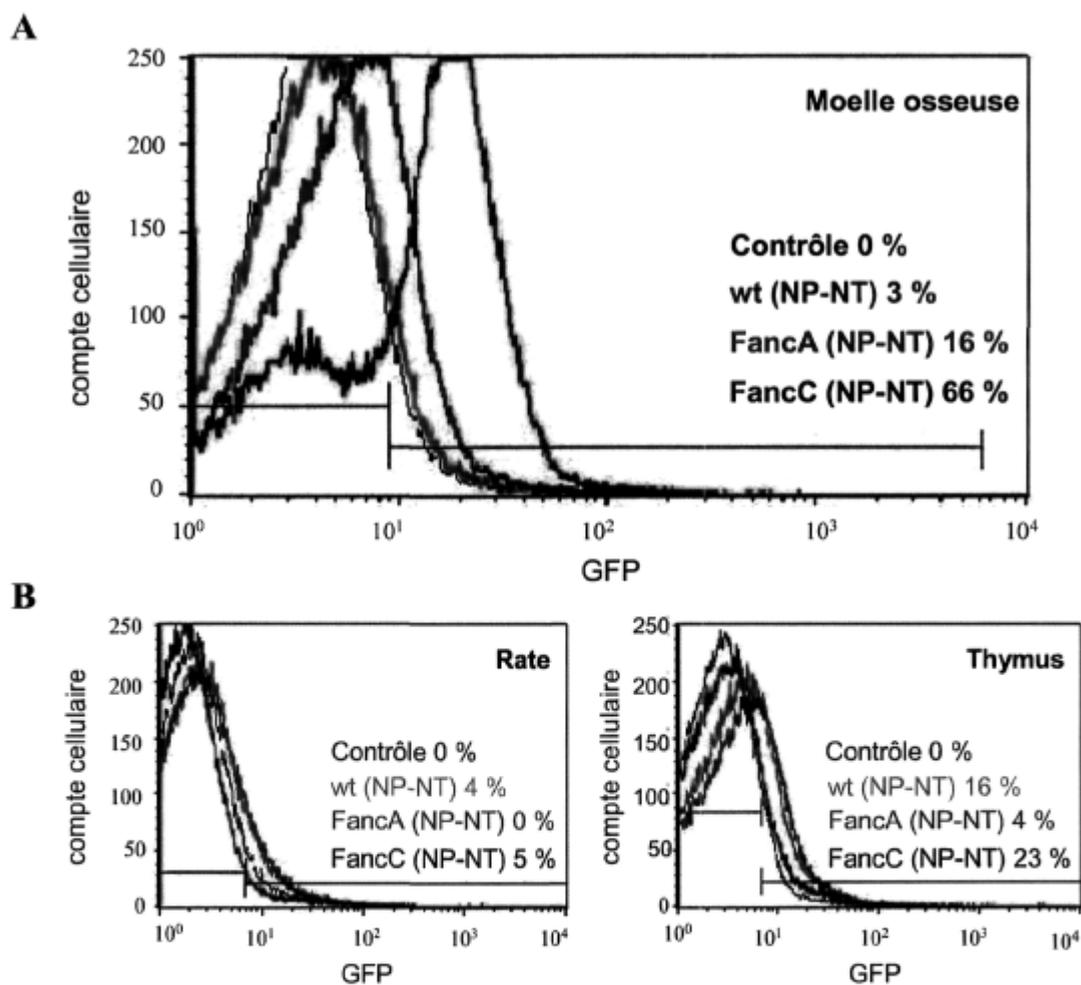
Il apparaît que les cellules progénitrices issues de souris *FancA*^{-/-} ne tirent aucun bénéfice de la correction génique par IIF du transgène *FancC-EGFP* et leur survie est comparable à celle des souris Fanconi contrôle, soit un taux moyen de CFU de 12%. Seuls les défauts cellulaires induits par la non-expression du gène *FancC*, peuvent espérer être corrigés, lors d'une transduction avec ce même transgène, signe de la spécificité de la correction génique. Les souris transplantées avec la moelle de souris sauvages IIF présentent une résistance à la MMC comparable à celle des contrôles sauvages. Ces données confirment que la procédure d'IIF ne perturbe aucunement le fonctionnement normal de la moelle et de ses cellules résidentes.

Enfin, comme en témoigne les résultats des tests clonogéniques, la perte de fluorescence sanguine et médullaire ne nuit en rien à la capacité de prolifération des cellules progénitrices *FancC*^{-/-} en présence de MMC, puisque leur complémentation est maintenue même après une transplantation secondaires.

Le bénéfice produit par l'IIF dans les souris primaires est donc conservé jusque dans la deuxième génération de souris. Pour déterminer la nature des cellules ciblées et corrigées par l'IIF, certains animaux secondaires issus de la TR1 sont utilisés, dans le cadre de procédures transplantations tertiaires (TR2).

2-3-3-d Expression médullaire du transgène dans les souris secondaires

Au 7^{ème} mois, les cellules médullaires des animaux secondaires (TR1) ayant reçu la moelle de souris primaires IIF ont fait l'objet d'analyses en cytométrie de flux (**figure 25A**). Les données recueillies ont permis de constater la présence du transgène *FancC-EGFP*, dans les cellules résidentes de la moelle, dans une proportion de 3 % pour les sauvages, 16 % pour les *FancA*^{-/-} et de 66 % pour les *FancC*^{-/-}. Ces dernières présentent un niveau en moyenne 20 fois plus élevé que celui des souris sauvages et 4 fois supérieur à celui des *FancA*^{-/-}.



Figures 25 : Expression du transgène dans les organes lymphoïdes de souris 2^{aires}

(A) Analyse par FACS des cellules médullaires prélevées au 6^{ème} mois, sur chacune des souris 2^{aires} (TR1) sauvages (n = 2) (vert), *FancA*^{-/-} (n = 2) (rose) et *FancC*^{-/-} (n = 2) (bleu) moelle osseuse de souris contrôle non injectée (noir). Profil d'une souris type représentative de son groupe génotypique.

(B) Analyse par FACS de l'expression splénique et thymique du transgène dans les souris 2nd sauvages 6^{ème} mois (n = 2) (vert), *FancA*^{-/-} (n = 2) (rose) et *FancC*^{-/-} (n = 2) (bleu), cellules de souris contrôle non injectée (noir). Résultat d'une souris type, dont le profil est représentatif de son groupe génotypique.

Il semble que la moelle osseuse sauvage favorise moins, le maintien des cellules FancC-EGFP⁺, à long terme que celle des souris FancA^{-/-}. Il est intéressant de remarquer que l'expression du transgène, dans la moelle des souris FancA^{-/-} est 5 fois supérieure à celle des sauvages. Bien que le transgène *FancC-EGFP* ne puisse en soi corriger le défaut génétique lié à la perte du gène *FancA*, les souris FancA^{-/-} semblent tirer un avantage suffisamment conséquent de l'expression du transgène *FancC-EGFP* pour le conserver dans une fraction non négligeable des cellules médullaires résidentes.

Les données ici recueillies sont d'autant plus intéressantes que les cellules sanguines des souris secondaires (TR1) n'exprimaient aucune fluorescence, pourtant celle-ci est retrouvée dans les cellules médullaires, dans des proportions importantes notamment pour FancC^{-/-}. Cette observation laisse supposer l'atteinte de cellules primitives qui ne peuvent prendre part au processus hématopoïétique dans un délai si court, confortant ainsi l'hypothèse de l'atteinte de cellules souches.

Parallèlement à l'analyse médullaire, un examen des organes lymphoïdes primaire et secondaire (thymus et rate) est réalisé sur les donneuses secondaires (**figure 41B**). Il démontre d'une part la normalité de ces organes, tant au niveau de leur poids, de leur taille que de leur souplesse (données non présentées). Une analyse en cytométrie de flux révèle par ailleurs, l'expression thymique du transgène dans une proportion relativement élevée, soit de 23 % pour la souris FancC^{-/-}, 16 % pour les sauvages et 4 % pour les FancA^{-/-}. La proportion de cellules spléniques exprimant la fluorescence est de 5 % chez les FancC^{-/-}, de 4 % chez les sauvages et nulle chez les FancA^{-/-}. Dans la rate, la présence de fluorescence n'est nullement surprenante, elle signe le maintien d'un vestige embryonnaire d'hématopoïèse splénique, dans le modèle murin, caractérisé par la présence massive de cellules Sca-1⁺. Ces cellules spléniques permettent conjointement à leurs homologues médullaires, à la régénération du système sanguin en particulier lors de situations hémorragiques ou infectieuses²⁸⁰.

Cette fluorescence disséminée est aussi la conséquence d'une migration cellulaire en vue d'une maturation subséquente (cellules en différenciation). De plus, dans l'organisme murin, il existe une thymopoïèse requérant le recrutement ponctuel de progéniteurs qui produiront des lymphocytes T matures, dans une période de temps relativement courte. Elle signifie également, comme l'ont montré Mazurier *et al*, que des cellules plus primitives sont capables de migrer d'un environnement médullaire à l'autre au moyen du véhicule sanguin²⁸¹.

Une étude plus ancienne évoquait déjà la migration des cellules médullaires primitives, hors de la moelle comme une nécessité à la redistribution des progéniteurs de long terme²⁸². Ce qui contribuerait au maintien de l'homéostasie en ravitaillant régulièrement les niches en CSH, de façon à occuper un espace laissé vaquant près la mort ou la différenciation. Par ailleurs, ces cellules pourraient constituer une source immédiate, pour un recrutement rapide après une perte sanguine massive²⁸².

2-3-4 Transplantations tertiaires de moelle totale de souris secondaires

2-3-4-a Expression sanguine du transgène dans les souris tertiaires

Dans le cadre de la procédure TR2, la moelle osseuse de chaque souris secondaire TR1 est transplantée, dans des receveuses tertiaires sauvages ($n_{\text{total}} = 18$), létalement irradiées. Après la transplantation et en dépit d'une fluorescence médullaire des donneuses, l'analyse sanguine régulière n'a pas permis de retrouver l'expression de la fluorescence, dans des proportions suffisantes pour permettre de conclure à la présence du transgène (**figure 26**). Les cellules EGFP retrouvées dans la moelle de souris secondaires n'ont visiblement pas pris part au processus de reconstitution les trois premières semaines.

L'absence de fluorescence, dans les cellules sanguines de souris tertiaires, contraste avec une représentativité supérieure à 80 % des cellules de donneuse (CD45.2).

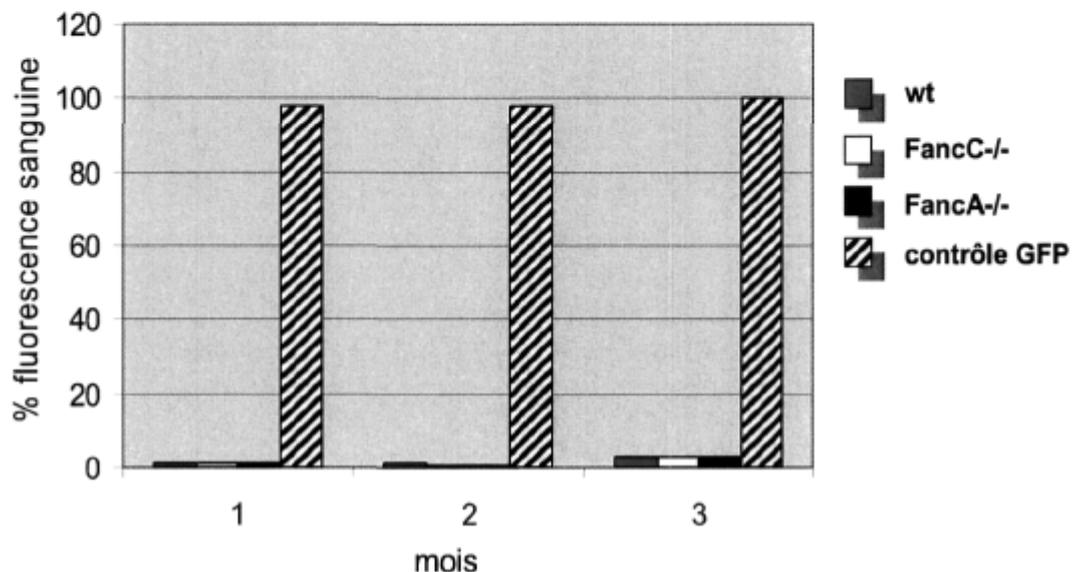


Figure 26 : Expression sanguine du transgène dans les souris tertiaires

Analyse par FACS de l'expression sanguine du transgène, chez les souris tertiaires (TR2). Les valeurs sont une moyenne de sauvages (n = 6), FancA^{-/-} (n=6) et FancC^{-/-} (n= 6), comparativement aux souris contrôles GFP, gracieuseté du Dr Luc Vallières, +/- écart-type.

Suggérant que la perte de fluorescence n'est aucunement la conséquence d'une perte des cellules de la donneuse. Ces observations suggèrent plutôt la perte partielle du transgène qui générerait alors une protéine transgénique tronquée ou d'une perte totale. Les tests clonogéniques (**figure 24**) démontraient pourtant la fonctionnalité de la protéine transgénique, l'atteinte se limiterait donc probablement à la partie *EGFP* du transgène.

2-4 Transduction par injection intra-fémorale et traitement à la MMC

La correction génique semble possible par IIF du transgène correcteur. Il serait cependant important de déterminer si une pression de sélection favoriserait une correction plus rapide et un réinvestissement massif des niches par les CSH complémentées. À cet effet, une seconde cohorte d'animaux sauvages, FancA et FancC ayant reçu une IIF du transgène *FancC-EGFP*, fait l'objet d'un traitement sélectif à base de MMC.

2-4-1 Évaluation de la correction génique par IIF et traitement

2-4-1-a Expression sanguine du transgène dans les souris primaires MMC- traitées

L'activité biologique de la protéine est cette fois estimée directement dans les souris primaires, pour ce faire une autre stratégie est utilisée. Elle consiste en l'administration de doses séquentielles non létales de MMC, dès la 7^{ème} semaine après la chirurgie fémorale, chez ces souris, le niveau d'expression du transgène est obtenu par un dosage sanguin du transgène (**figures 27 et 28**).

Les deux premiers mois, les observations des souris injectées traitées à la MMC sont les mêmes que celles réalisées dans la **figure 20**, pour les souris injectées non traitées. Ce n'est qu'à la 7^{ème} semaine que les souris sont séparées en fonction du traitement qu'elles reçoivent (+/- MMC). Au premier mois, le transgène est plus présent dans le sang circulant des souris sauvages (12 %) et des FancA^{-/-} (11 %), que dans celui des souris FancC^{-/-} (8 %).

Au deuxième mois, l'expression sanguine du transgène est réduite de moitié pour les souris sauvages et FancC^{-/-} et d'un facteur 6 pour les FancA^{-/-}. Cette réduction est inhérente au processus de renouvellement des cellules hématopoïétiques.

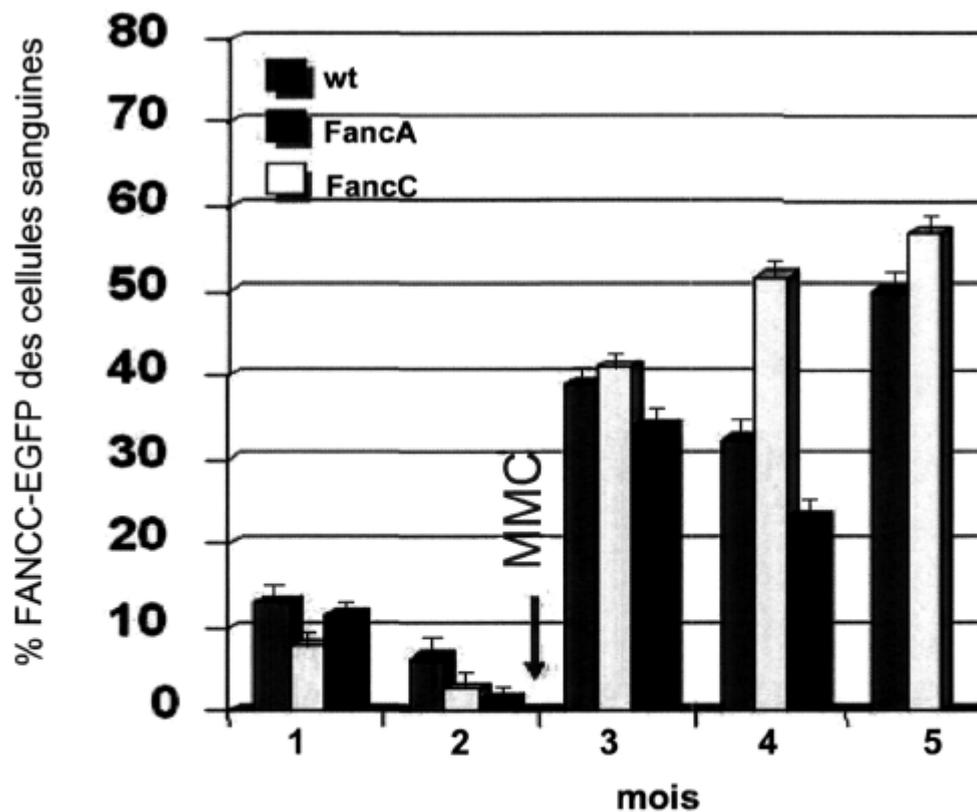


Figure 27 : Expression sanguine du transgène dans souris complémentées traitées

Analyse mensuelle par FACS de l'expression sanguine du transgène *FancC-EGFP*, sur une période de 5 mois, chez les souris IIF sauvages (n = 8), *FancA*^{-/-} (n = 6) et *FancC*^{-/-} (n = 8). Après le 2^{ème} mois, les souris reçoivent une injection hebdo-madaire d'un agent pontant, la MMC. (+/- Écart-type). Titre 10 x 10⁸ TU/mL

Dans tous les cas, la fluorescence signait l'expression du transgène et donc la présence de la protéine transgénique, dans les cellules du sang circulant et potentiellement dans les cellules mères, résidentes de la moelle et dont la nature restait à évaluer.

Cette seule expression sanguine ne suffit en revanche pas à garantir la fonctionnalité de FANCC-EGFP. Aussi, les cellules transduites sont analysées pour leur capacité à utiliser le transgène, dans un contexte qui fait habituellement défaut aux cellules Fanconi, celui de la réparation de l'ADN. À cette fin, les animaux ont reçu un traitement de MMC sur une base hebdomadaire. Grâce à la susceptibilité des cellules Fanconi aux agents pontant, il devenait possible de favoriser la survie et le maintien des cellules corrigées (**figure 28**). Cellules qui en exprimant une protéine transgénique fonctionnelle garantiraient la survie des animaux complémentés, soient les souris *FancC^{-/-}*. Alors que les cellules non corrigées, incapables de restaurer les dommages induits à leur matériel génétique, seraient orientées vers un processus apoptotique responsable à terme une aplasie médullaire progressive et létale pour ces animaux.

Lors des expériences recourant à la MMC, deux contrôles sont utilisés, d'une part, les souris sauvages capables de résister à des doses séquentielles non létales de MMC. D'autre part, les souris *FancA^{-/-}*, mutées pour le gène *FancA* ne peuvent prétendre à une correction génique par l'injection du transgène *FancC*.

Après trois semaines d'injection, une augmentation significative du niveau sanguin du transgène est notée, les proportions sont alors de 39 % chez les souris sauvages, 32 % chez les souris *FancA^{-/-}* et 41 % chez les souris *FancC^{-/-}*. Au fil des mois, tous les animaux majorent régulièrement le taux de fluorescence sanguine, en moyenne d'un facteur 8, comparativement au premier mois. La MMC a majoré la présence de cellules transduites, expliquant l'augmentation de fluorescence sanguine.

Chez les souris primaires, si les niveaux de fluorescence sont soumis à une hausse constante, ils n'en demeurent pas moins très fluctuants. Ceci est particulièrement vrai, chez les souris *FancC*^{-/-} où la fluorescence passe de 30 % le premier mois, à 51 % au 4^{ème} mois avant de se stabiliser à 55 % des cellules du sang circulant, au 5^{ème} mois. À la fin du traitement, soit après 15 semaines d'injection, l'augmentation moyenne de la fluorescence sanguine comparée à celle du 1^{er} mois, était d'un facteur 4 pour les souris sauvages (de 12 à 50 %), d'un facteur 3 pour les *FancA*^{-/-} (de 11 à 33 %) et d'un facteur 8 pour les *FancC*^{-/-} (8 à 55 %) démontrant non seulement le maintien mais également la prolifération des cellules transduites, indifféremment de leur appartenance génotypique.

Il peut paraître étonnant que les souris *FancA*^{-/-} et sauvages conservent l'expression du transgène à des niveaux si élevés, alors qu'aucune correction génique ne peut être envisagée dans les deux cas. L'expression du transgène est en réalité favorisée par de l'avantage sélectif qu'il confère. Il apparaît en réalité, qu'une surexpression de la protéine FANCC confère une résistance accrue au stress oxydatif et constitue de fait un avantage sélectif. Pourtant dès 7^{ème} semaine d'injection de MMC, les souris *FancA*^{-/-} manifestent les premiers symptômes aplasiques qui ont conduit au décès de tous les animaux après douze semaines de traitement. Par opposition, les souris *FancC*^{-/-} ont toutes survécu, confirmant que l'expression du transgène se double d'une activité biologique. La complémentation des cellules permet aux animaux de recouvrer une résistance à la MMC comparable à celle des sauvages. Ces analyses sanguines ont évalué les conséquences d'un traitement de sélection sur l'expression du transgène, démontrant très clairement, qu'il favorise la prolifération des cellules exprimant le *FancC-EGFP*, en réalisant tri sélectif à l'origine de l'augmentation de la fluorescence sanguine (**figure 28**).

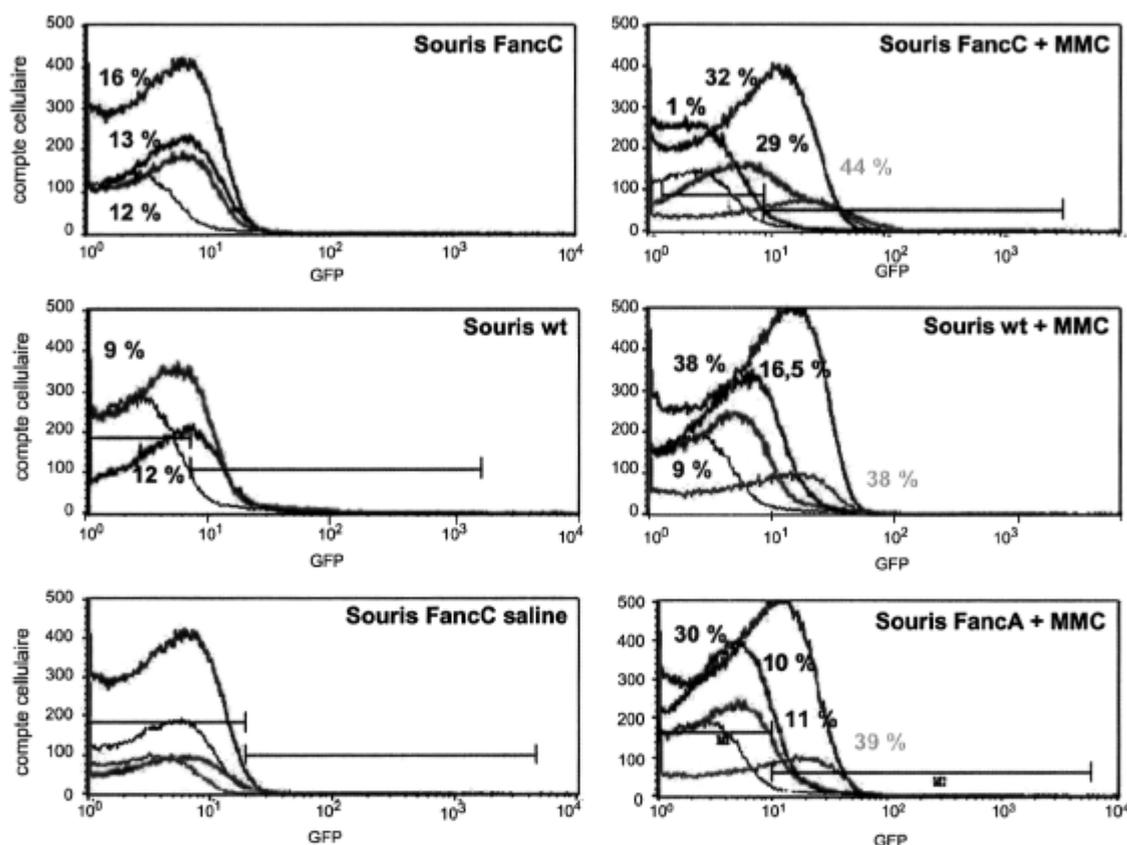


Figure 28: Modulation de l'expression sanguine du transgène *FancC-EGFP*

Analyse par FACS de la modulation de l'expression sanguine du transgène *FancC-EGFP* dans chaque souris, induite par le traitement hebdomadaire de MMC.

/// 1 mois, ||| 2 mois, — 3 mois, \\\ 4 mois. La colonne de gauche présente les animaux IIF non traités et celle de droite présente les animaux IIF traités à la MMC.

Les animaux $FancC^{-/-}$, comme les sauvages, ne développent aucun signe d'aplasie ou symptômes leucémiques et présentent des comptes cellulaires normaux, pendant toute la durée de l'expérience. Les cellules des souris $FancC^{-/-}$ sont donc efficacement complémentées par l'intégration du transgène *FancC-EGFP*.

La **figure 28** montre très clairement l'effet de la MMC sur l'expression du transgène et la modulation de la fluorescence, dans les souris qui la reçoivent. Cependant, lorsque les données de la **figure 27** sont comparées à celle de la **figure 20**, à l'état stationnaire, sans pression de sélection, environ 1/4 des cellules sanguines expriment le transgène, par opposition aux 2/3 observés en présence de MMC. Les animaux contrôles n'expriment quant à eux aucun signal de fluorescence sanguine.

Il apparaît que pour les mêmes périodes, les niveaux sanguins du transgène sont en moyenne augmentés de deux fois chez les souris traitées comparativement aux souris injectées en IIF mais non traitées. L'agent chimique permet une recolonisation des cellules corrigées qui envahissent alors l'environnement médullaire local (moelle osseuse) et périphérique (sang, organes lymphoïdes).

La pression de sélection MMC-induite a des conséquences cellulaires qui peuvent à terme menacer la survie même de l'organisme.

2-4-1-b Estimation de la survie des souris primaires MMC-traitées

L'analyse des conséquences d'un traitement à base de MMC a également fait l'objet d'un suivi à l'échelle de l'organisme murin dans son intégralité. En effet, si les injections de MMC permettent d'estimer l'activité biologique de la protéine transgénique et favorisent la sélection des cellules corrigées, c'est pour *in fine* garantir la survie des animaux complémentés. Aussi, une estimation de la survie aux injections de MMC, est réalisée sur les animaux $FancA^{-/-}$ et $FancC^{-/-}$ et comparée à celle des sauvages (**figure 29**).

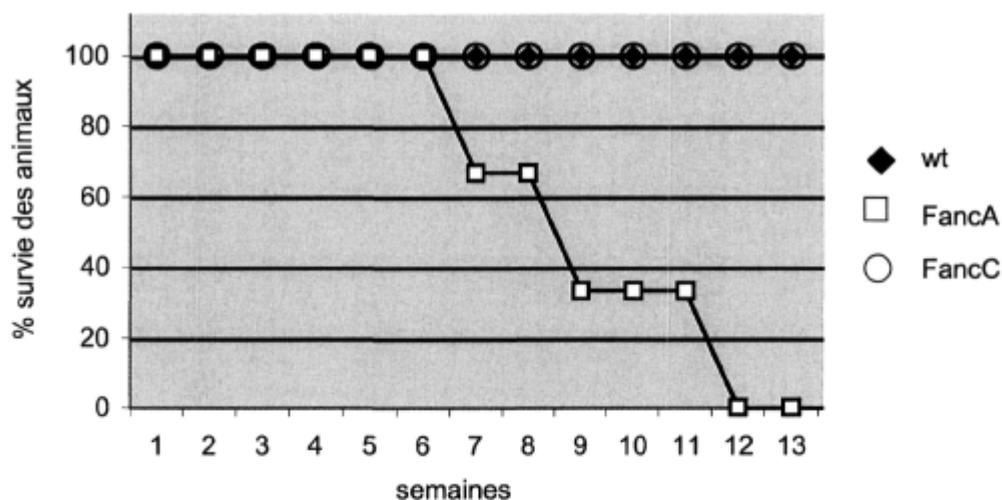


Figure 29 : Courbes de survie des souris complémentées et MMC-traitées

Estimation de la survie des souris IIF avec le transgène *FancC-EGFP* et traitées à la MMC sur une base hebdomadaire. Les souris sauvages sont utilisées comme contrôles positifs (n = 5), les souris *FancA^{-/-}* comme contrôle négatif (n = 3) et comparées aux souris *FancC^{-/-}* (n = 5).

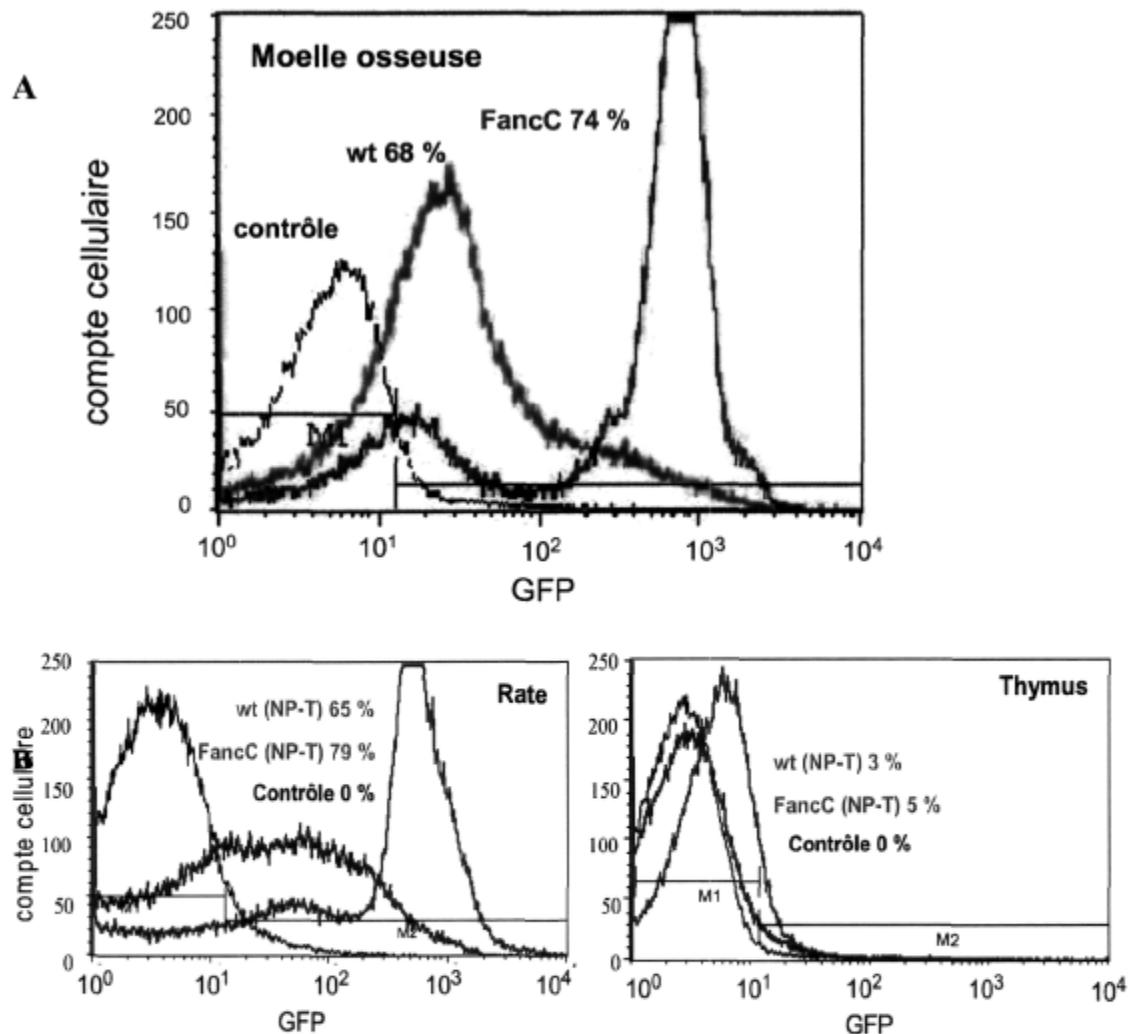
Cet examen devait déterminer si le transgène une fois exprimé est non seulement utilisé et intégré au processus biologique, mais surtout s'il est capable de rendre la souris résistante aux dommages induits par la MMC. Contrairement aux sauvages qui dans de telles circonstances survivent sans aucun effet secondaire, chez toutes les souris *FancA^{-/-}* les injections de MMC conduisent à terme, au développement d'une pancytopenie progressive conduisant à la perte de tous les animaux après 12 semaines de traitement. En revanche, sur les souris *FancC^{-/-}* IIF ce même test témoigne d'une résistance comparable à celle des sauvages et acquise grâce à la correction génique. Ainsi, la courbe de survie des animaux *FancC^{-/-}* se superpose à celle des sauvages et démontre une survie au delà de la 15^{ème} semaine de traitement.

L'IIF délivre un transgène qui corrige phénotypiquement les souris $FancC^{-/-}$ en s'intégrant et en exprimant de façon stable et durable, dans les processus cellulaires. L'ensemble de ce processus a permis d'évaluer l'efficacité de la correction génique par IIF et démontrer que cette méthode peut prétendre restaurer les pleines capacités hématopoïétiques des CSH Fanconi.

À ce stade, il est cependant impossible de déterminer la nature précise des cellules ciblées par la correction génique. Il pourrait tout aussi bien s'agir de cellules déjà engagées dans un processus de différenciation, de cellules progénitrices, de cellules précurseurs, comme il pourrait s'agir de cellules souches. L'identité et la nature des cellules corrigées, par l'IIF doivent pourtant être déterminées de façon plus précise, afin d'estimer la pérennité de la correction génique. Pour s'assurer de ce point, des expériences de transplantations secondaires sont réalisées, en utilisant comme donneuses les souris corrigées par IIF et traitées à la MMC.

2-4-1-c Expression médullaire du transgène dans les souris primaires MMC-traitées

Au 5^{ème} mois, lors du sacrifice, une fraction des cellules médullaires de toutes les souris primaires survivantes (sauvages et $FancC^{-/-}$) est conservée à des fins d'analyses comparatives (**figure 30**). Ce préalable à la transplantation permet de s'assurer la présence d'un nombre minimum de cellules exprimant le transgène. L'analyse en cytométrie de flux représente le profil type d'une souris de chacun des deux groupes génotypes et confirme la présence de cellules médullaires fluorescentes. Chez les souris $FancC^{-/-}$ près de 74 % expriment le transgène, contre 68 % chez les sauvages. L'examen des cellules médullaires issues de souris $FancC^{-/-}$ confirme le bénéfice de l'IIF, une fois corrigées, les cellules réinvestissent massivement l'environnement médullaire, au point de constituer au 5^{ème} mois, près de 80 % des cellules résidentes de la moelle. Cette surreprésentativité explique la résistance des animaux $FancC^{-/-}$ aux injections de MMC.



Figures 30: Expression du transgène dans les organes lymphoïdes de souris

IIF et traitées à la MMC

(A) Analyse par FACS de l'expression médullaire du transgène *FancC-EGFP*, au 5^{ème} mois dans les souris IIF et traitées 15 semaines à la MMC. Chaque souris est représentative de son groupe sauvage wt (n = 3) (vert) et *FancC*^{-/-} (n = 3) (rose), moelle contrôle de souris non injectée (noir).

(B) Profil d'expression du transgène dans les organes lymphoïdes, au 5^{ème} post-IIF, dans les cellules spléniques et thymiques de souris primaires IIF et traitées à la MMC: sauvages wt (n = 3) (vert) et *FancC*^{-/-} (n = 3) (rose), contrôle souris non injectée (noir).

Ces données sont également cohérentes avec l'avantage sélectif conféré par le transgène *FancC-EGFP* quel que soit l'appartenance génotypique des animaux, puisque les CSH médullaires le maintiennent massivement. Si ces données confirment l'expression du transgène dans les cellules de la moelle, il apparaît nécessaire de déterminer si son intégration s'est faite exclusivement et préférentiellement, dans un type cellulaire au détriment des autres. À cette fin, une autre fraction de la moelle totale est marquée et l'expression du transgène déterminée de manière lignée spécifique (**figure 31**).

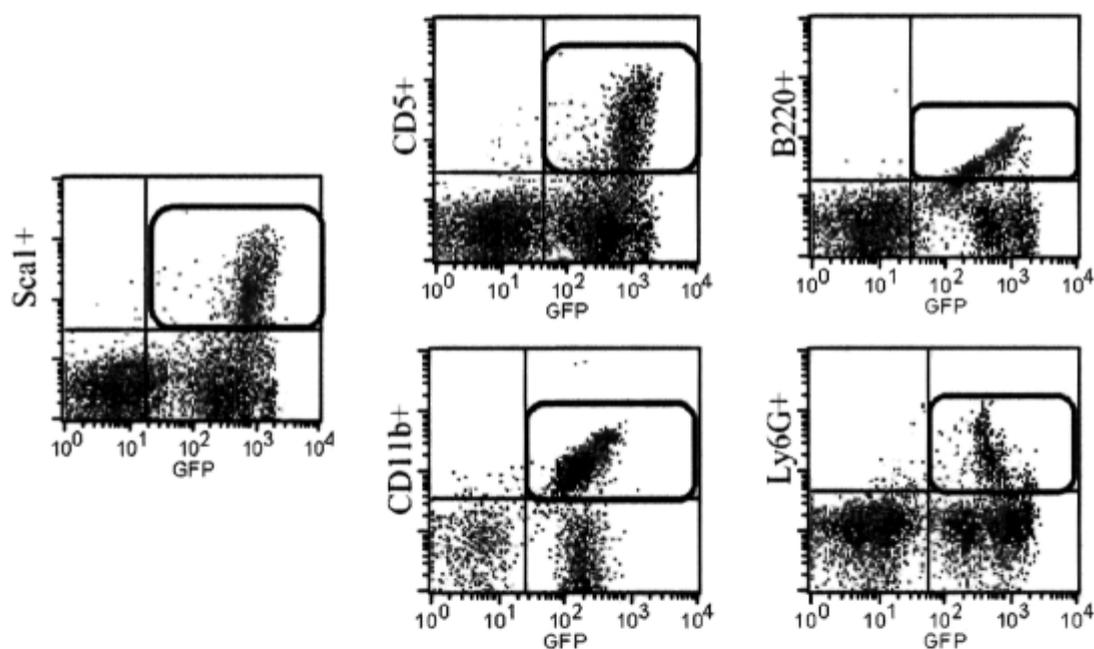


Figure 31 : Expression du transgène dans les lignées cellulaires médullaires

Analyse par FACS au 5^{ème} mois de l'expression du transgène *FancC-EGFP*, dans les différentes lignées cellulaires de la moelle d'une souris *FancC*^{-/-} type IIF et traitée à la MMC. Expression dans les progéniteurs (Sca-1⁺), lymphocytes T (CD5), lymphocytes B (B220), monocytes (CD11b) et granulocytes (Ly6G). Profil type d'une souris représentative.

Cet examen conclue à l'expression du transgène dans l'ensemble des lignées cellulaires tant différenciées, telles les cellules lymphoïdes (CD5 et B220), myéloïdes (CD11b et Ly6G) que primitives telles les cellules progénitrices (Sca-1⁺). Les cellules exprimant le transgène et détectées comme étant EGFP positives, constituent plus de 70 % des cellules résidentes de la moelle, ce qui rejoint, les données présentées à la figure 30 et conclue au réinvestissement massif de la niche médullaire par les cellules complémentées. Lors du sacrifice des donneuses primaires IIF traitées à la MMC, les organes lymphoïdes primaire et secondaire (thymus et rate) sont prélevés et analysés en cytométrie de flux (**figure 30B**), au cours de réactions de PCR (**figure 32**) et lors d'un examen histologique (**figure 33**). Le transgène est certes retrouvé dans les cellules résidentes de la moelle, dans les cellules du sang circulant, qui dérivent des premières, mais également dans les cellules spléniques et thymiques (**figure 30B**).

Une fluorescence moyenne de 65 % est retrouvée, dans les cellules spléniques des souris sauvages, contre 79 % chez les *FancC*^{-/-}. Ce qui témoigne encore une fois de la migration des cellules médullaires vers d'autres régions, mais surtout de l'avantage que représente les cellules complémentées tant pour les Fanconi, que pour les sauvages. L'analyse splénique des souris *FancC*^{-/-} révèlent d'ailleurs la présence de deux populations cellulaires (2 pics), qui auraient probablement intégré un nombre de copies différentes. Quant à l'expression thymique du transgène, elle est de 5 % dans les souris *FancC*^{-/-} et 3 % chez les sauvages.

L'ADN génomique isolé à partir d'échantillons cellulaires médullaires, spléniques et thymiques d'animaux corrigés et traités à la MMC est analysé en PCR. (**figure 32**).

Les résultats de la réaction de PCR sur l'ADN génomique confirment l'intégration du transgène dans le génome murin (bande 300 pb). Ce matériel est retrouvé dans la rate, le thymus et la moelle de tous les animaux IIF et traités à la MMC, indépendamment de leur génotype.

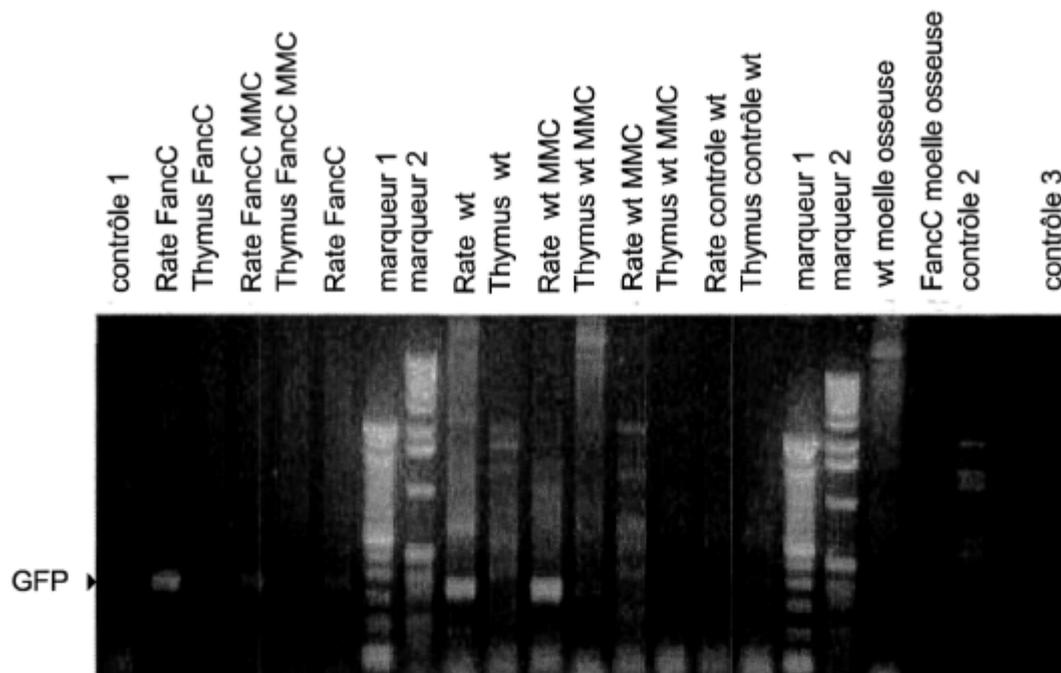


Figure 32 : PCR *EGFP* sur l'ADN génomique des organes lymphoïdes

PCR du transgène *EGFP* réalisée sur l'ADN génomique de rate (R), de thymus (T) et de moelle osseuse des souris IIF traitées à la MMC. C1: contrôle négatif de PCR, C2: contrôle positif cellules 293T transfectées avec plasmide pSin-*FancC-EGFP*, C3: contrôle positif ADN de cellules transfectées, M1: marqueur de poids moléculaire 100 pb, M2: marqueur de poids moléculaire 1kb. Le produit de PCR *FancC-EGFP* a un poids attendu d'environ 300 pb.

Si ces données confirment la présence de la construction exogène dans le génome, elle ne peut toutefois pas garantir son expression et son utilisation par la machinerie cellulaire.

Au regard des bandes obtenues, quelles que soient les souris, l'intégration thymique du transgène apparaît comme étant de moindre intensité, que l'intégration splénique, rejoignant les données obtenues lors de l'analyse en cytométrie de flux (**figure 30B**). Cette observation tient d'une réalité propre à l'organisme murin, soit le maintien d'un vestige embryonnaire d'hématopoïèse splénique. Lesquelles recrutent massivement des cellules médullaires au nombre desquelles les cellules souches.

L'analyse médullaire présente également une bande plus intense pour les souris $FancC^{-/-}$ qui reflète le nombre de copies intégrées par la cellule et semble nous orienter vers une intégration polyclonale du transgène. Par ailleurs, l'avantage sélectif que confère l'expression du transgène aux souris $FancC^{-/-}$ expliquerait le maintien et surtout l'augmentation du nombre de cellules corrigées comparativement aux sauvages. Les animaux contrôles (non IIF) confirment la spécificité du produit de PCR, puisqu'aucune bande n'est détectable à 300 pb quels que soient les tissus.

2-4-1-d Coupes histologiques de sternum de souris primaires MMC-traitées

L'impact combiné de la transduction et du traitement à la MMC, sur la structure interne des organes lymphoïdes (sternum, rate et thymus) est observé au moyen d'analyses histologiques. Prélevés 5 mois après la chirurgie fémorale, sur des animaux $FancA^{-/-}$, $FancC^{-/-}$ et sauvages traités ou non à la MMC, les coupes spléniques et thymiques n'ont révélé aucune différence significative et ne sont donc pas présentés.

En revanche, l'examen des coupes histologiques de sternum permet d'apprécier la reconstitution de l'architecture sternale des souris $FancC^{-/-}$ corrigées (**figure 33**). Le remodelage est encore plus flagrant chez les souris $FancC^{-/-}$ après un traitement de 15 semaines à la MMC, la correction génotypique leur permet de présenter un phénotype comparable à celui des sauvages, en terme de densité cellulaire et de structure de l'os hématogène.

Par opposition, la moelle des souris $FancA^{-/-}$ présente des défauts majeurs quant à l'organisation interne du sternum dont la cellularité est réduite de façon drastique après le traitement à la MMC. Ces animaux exposent par endroits une moelle désertique expliquant l'hypoplasie mortelle rapportée plus haut.

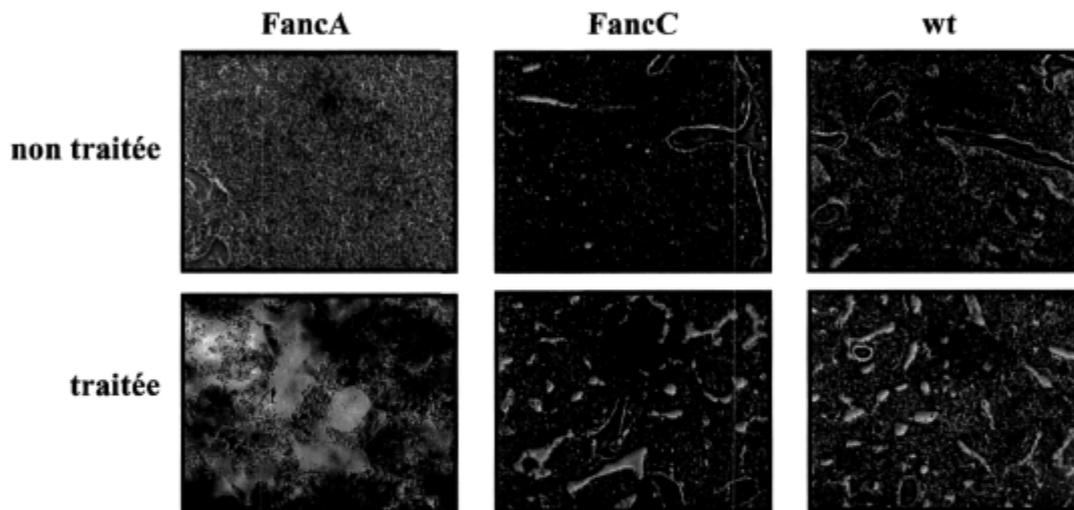


Figure 33 : Coupes histologiques du sternum de souris injectées traitées ou non

Photo en microscopie de coupes longitudinales de sternums prélevés 5^{ème} mois après l'IIF de souris représentative de chaque groupe $FancA^{-/-}$, $FancC^{-/-}$ et sauvage (wt), IIF non traitées ou injectées et traitées à la MMC, pendant 15 semaines. Coloration à l'hématoxyline-éosine, grossissement (x20).

Ces données confirment les résultats voulant que la MMC exerce une pression de sélection en faveur des cellules corrigées²⁸³. Si cette préférence pour les cellules corrigées est sans conséquence dans le cas des sauvages, elle conduit à envahissement médullaire chez les $FancC^{-/-}$ et à une déplétion chez les $FancA^{-/-}$.

Une fois encore, afin que l'atteinte des cellules souches soit évaluée, l'étape de transplantation est un préalable indispensable. Aussi, à cette fin, des expériences de transplantations secondaires sont réalisées à partir de cellules médullaires des souris primaires corrigées et traitées. Les procédures de transplantations sont détaillées au **tableau 6**.

Tableau 6 : Répartition des souris primaires au cours des transplantations

Génotype/ Traitement	Souris wt	Souris FancA ^{-/-}	Souris FancC ^{-/-}	Décès wt	Décès FancA ^{-/-}	Décès FancC ^{-/-}
NT	5 (TR1)	3 (TR1)	5 (TR1)	0	0	0
T	5 (TR3)	3	5 (TR3)	0	3	0

Abréviations : NT non traitées à la MMC, T traitées à la MMC

Le tableau est indicatif du nombre et de l'appartenance génotypique de chaque animal utilisé pour chacune des procédures expérimentales entre parenthèses. Les décès sont présentés dans la partie droite du tableau.

2-4-2 Transplantations secondaires de moelle totale de souris I^{aires} MMC-traitées

2-4-2-a Expression sanguine du transgène dans les souris secondaires

Au cours de l'expérience TR3, les souris sauvages (n = 5) et FancC^{-/-} (n = 5) ayant survécu aux injections séquentielles de MMC, sont sacrifiées et leurs cellules médullaires transplantées en série dans des receveuses secondaires sauvages létalement irradiées (n_{total} = 16). L'irradiation détruit le système hématopoïétique des receveuses et contraint les cellules transplantées à le reconstituer *de novo* en générant l'ensemble des lignées hématopoïétiques. Après la transplantation, l'expression de la fluorescence sanguine est évaluée par cytométrie de flux, dans toutes les souris transplantées (TR3) (**figure 34**).

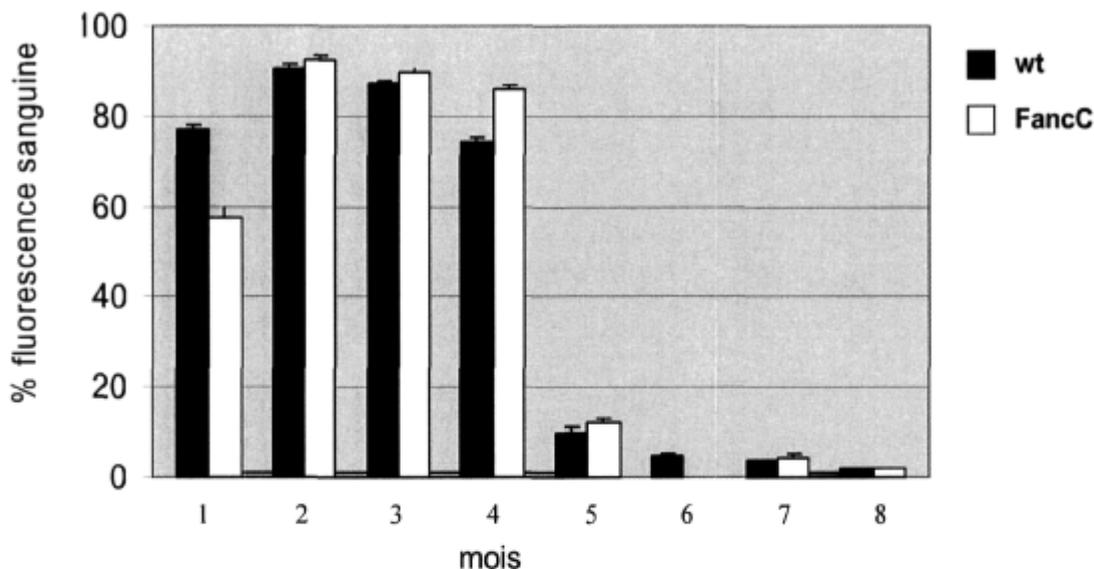


Figure 34 : Expression sanguine du transgène dans souris secondaires

Analyse mensuelle par FACS de l'expression sanguine du transgène *FancC-EGFP*, chez les souris secondaires transplantées avec la moelle totale des souris IIF traitées à la MMC (TR3). Chaque colonne représente une moyenne avec sauvages ($n = 8$) et les $FancC^{-/-}$ ($n = 8$), +/- écart-type.

Dès le premier mois suivant la transplantation, l'expression de la fluorescence est retrouvée, à des niveaux très élevés, dans toutes les souris receveuses ($n = 16$). Les souris sauvages secondaires ayant reçu une moelle sauvage, le transgène est retrouvé dans 77 % des cellules sanguines. Dans les souris transplantées avec la moelle $FancC^{-/-}$, 67 % des cellules du sang circulant expriment le transgène. Ces données permettent d'impliquer les CSH et plus précisément les STR que sont les $CD34^+ CD38^+$ et $CD34^+ CD38^-$, seules capables de générer des cellules myéloïdes et lymphoïdes, en l'espace de 3 semaines.

Après deux mois, le niveau du transgène dans le tissu sanguin devient comparable chez toutes les souris (wt et *FancC*^{-/-}) et atteint un taux moyen de 90 %. Ce niveau se maintient à des valeurs comprises entre 80 % et 90 %, sur une période consécutive de cinq mois. Ce qui permet cette fois d'impliquer la participation des cellules LTR, en charge de la reconstitution de long terme et constituées des CD34⁺.

De façon à s'assurer que l'expression du transgène n'est pas restreinte à une seule lignée cellulaire, les analyses en cytométrie de flux des cellules sanguines ont utilisé des marquages spécifiques des différentes lignées cellulaires (**figure 35**).

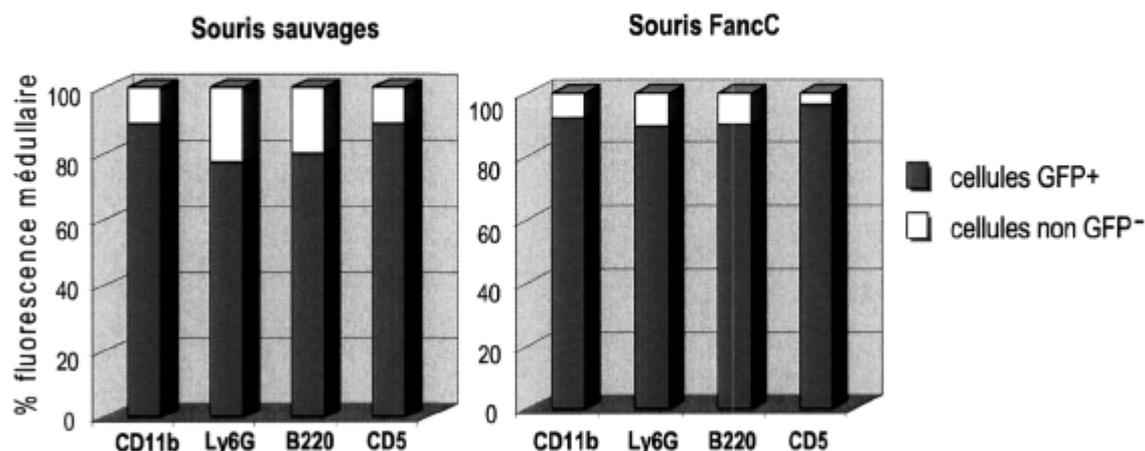


Figure 35 : Expression du transgène dans les différentes lignées sanguines

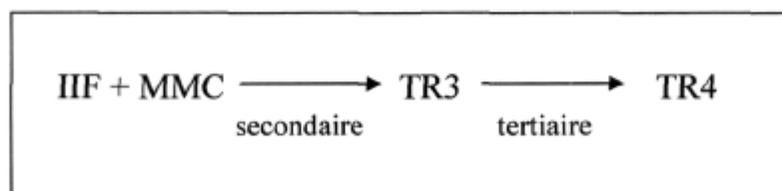
Analyse par FACS de l'expression sanguine du transgène *FancC-EGFP*, dans les différentes lignées cellulaires des souris secondaires (TR3) (n = 16) au 2^{ème} mois. Expression des lymphocytes T (CD5), lymphocytes B (B220), monocytes (CD11b) et granulocytes (Ly6G).

L'expression du transgène est retrouvée, dans toutes les lignées cellulaires, en circulation dans le sang, tant lymphoïdes que myéloïdes. La correction génique n'est donc pas spécifique à une lignée, mais recouvre toutes les cellules hématopoïétiques, elle a donc probablement atteint une ou plusieurs cellules primitives.

Il est également intéressant de constater que les niveaux de fluorescence dans les souris secondaires sont moins sujets à d'importantes fluctuations que ne le sont les niveaux dans les donneuses primaires.

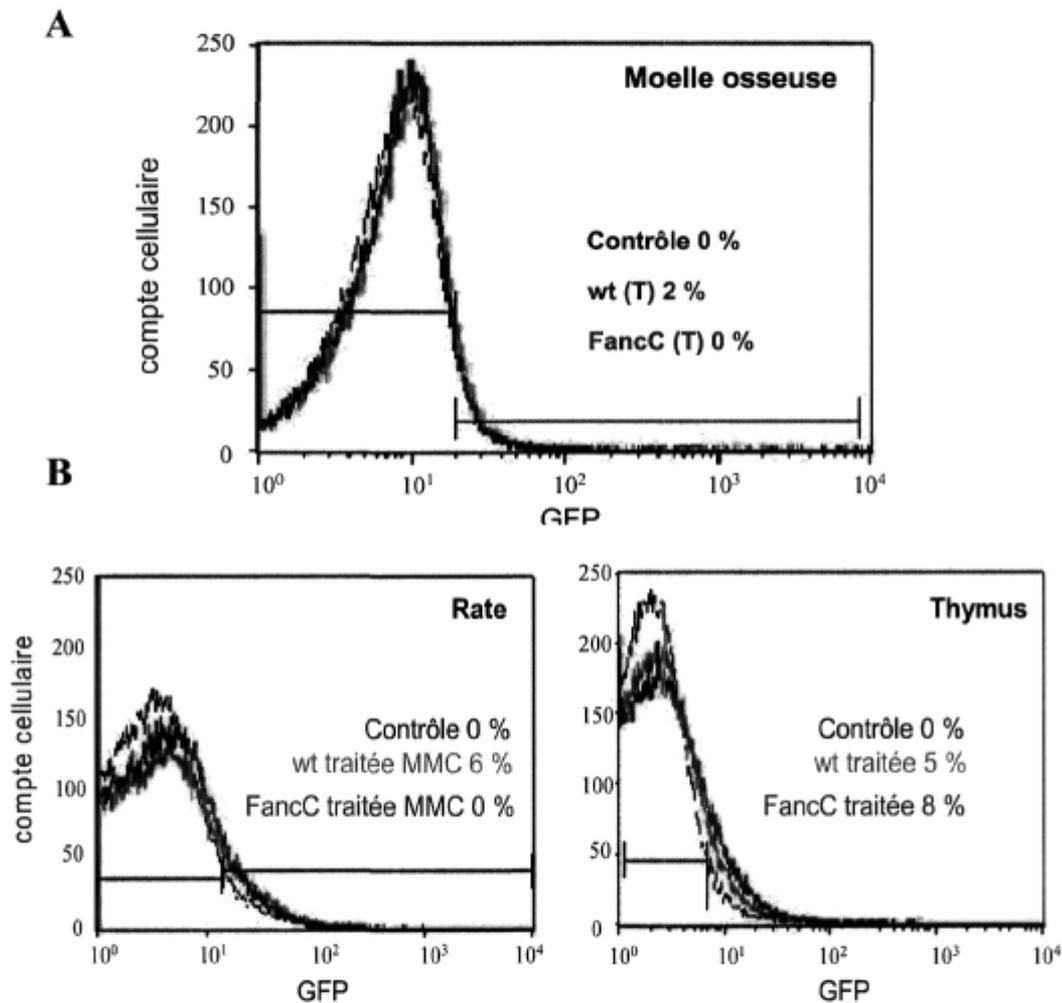
Au-delà du 4^{ème} mois post-chirurgie fémorale, l'expression de la fluorescence sanguine s'est brusquement interrompue, laissant suggérer une fois de plus une atteinte de l'intégrité de la structure transgénique. Plusieurs autres hypothèses évoquées plus haut peuvent expliquer cette disparition soudaine, l'élément le plus important est de déterminer si cette absence signifiait la perte de la correction génique. L'évaluation de la fonctionnalité de la protéine transgénique (résistance à la MMC) et l'efficacité des transplantations tertiaires devraient permettre de répondre à cette interrogation. Les animaux issus de la transplantation secondaire TR3 sont donc sacrifiés et leur moelle analysée en cytométrie de flux et intégrée à des procédures clonogéniques et de transplantations tertiaires (TR4) représentées au **tableau 7**.

Tableau 7 : Séquence expérimentale pour les souris IIF et traitées



2-4-2-b Expression médullaire du transgène dans les souris secondaires

Les animaux sacrifiés au 8^{ème} mois, ont fait l'objet de diverses analyses, au premier chef desquelles, un examen de la fluorescence médullaire (**figure 36**).



Figures 36 : Expression du transgène dans les organes lymphoïdes de souris 2^{aires}

(A) Analyse par FACS de l'expression du transgène *FancC-EGFP*, dans les cellules médullaires de souris secondaires TR3 représentatives de leur groupe. (B) Analyse par FACS de l'expression du transgène dans la rate et le thymus d'une souris secondaire (TR3). Chaque souris est représentative de son groupe, sauvages (n = 3) (vert), *FancC*^{-/-} (n = 3) (rose) et cellules de souris contrôle non injectée (noir).

L'étude de la moelle totale des souris secondaires n'a pas conclu à l'expression du transgène *FancC-EGFP*. Pourtant, ces mêmes cellules extraites des souris primaires lors de la procédure TR3 exprimaient une fluorescence de 68 % pour les sauvages et 74% chez les *FancC^{-/-}*. Cette absence de fluorescence pourrait signifier la perte du transgène dans son intégralité ou en partie. Elle pourrait également être le signe d'une correction génique limitée à des cellules progénitrices ou précurseurs de court terme, à durée de vie plus courte et qui disparaîtraient au fil du temps. L'examen en cytométrie de flux des organes lymphoïdes de souris secondaires *FancC^{-/-}* a évalué à 8%, le nombre de cellules thymiques exprimant le transgène, alors qu'aucun signal n'est exprimé dans les cellules spléniques (**figure 36B**), alors que chez les souris *FancC^{-/-}* primaires, les taux étaient de 5 % au niveau thymique et de 79 % au niveau splénique.

2-3-6-c Test clonogénique sur la moelle totale de souris secondaires

Comme l'ont montré, les injections de MMC *in vivo*, l'expression de la protéine FANCC est indispensable au maintien de l'intégrité génique et à la survie de l'organisme murin. Ce postulat a permis de déterminer, lors des expériences précédentes que la perte de fluorescence n'était pas automatiquement liée à la perte de fonction de la protéine transgénique. Pour en confirmer le maintien, d'autres tests clonogéniques sont ici réalisés. Les cellules médullaires totales sont placées, dans un milieu nutritif semi-solide, supplémentée de 5 nM de MMC, dose que l'on sait létale pour les cellules Fanconi. Après une incubation de 14 jours, le compte de colonies cellulaires (CFU) est réalisé. Ces taux sont ensuite comparés à ceux de souris contrôles représentées par les souris sauvage et *FancC^{-/-}* non injectées (**figure 37**). Le profil des cellules *FancC^{-/-}* issues de souris secondaires (TR3), confirme le maintien et l'intégrité fonctionnelle du segment *FancC* du transgène et ce, en dépit de notre incapacité à l'identifier par la fluorescence.

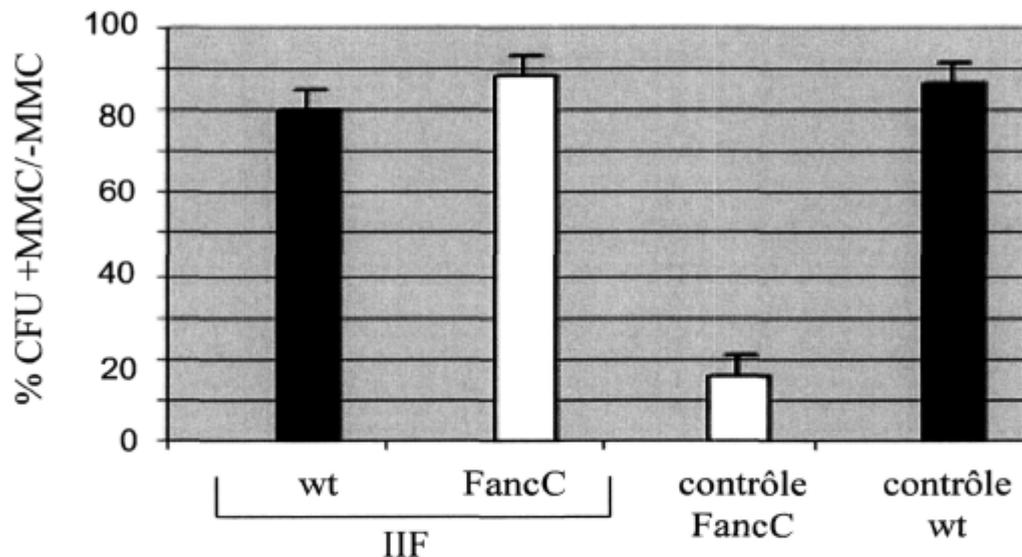


Figure 37 : Test clonogénique sur les cellules médullaires de souris secondaires

Test clonogénique sur les cellules de moelle totale de souris 2^{aires} TR3 en présence de MMC. Les animaux dans l'encadré IIF reçu le transgène *FancC-EGFP* par chirurgie fémorale : souris sauvages (n = 2) et *FancC*^{-/-} (n = 2). Les animaux contrôle souris sauvages (n = 2) et *FancC*^{-/-} (n = 2), n'ont fait l'objet d'aucune expérimentation. Chaque colonne est une moyenne de 6 valeurs, +/- écart-type.

En effet, le présent test clonogénique témoigne de la résistance des cellules médullaires de souris *FancC*^{-/-} corrigées dont le taux de survie en présence de MMC est de l'ordre de 90 %, soit une augmentation de 75 % comparativement aux cellules contrôles de souris *FancC*^{-/-} qui en pareilles circonstances, n'ont un taux de survie que de 26 %.

De plus, l'observation des colonies formées par les cellules sauvages et $FancC^{-/-}$ corrigées révèle la présence de différentes lignées cellulaires, signe de la présence d'un parent plus immature, aux capacités de différenciation plus grandes. Les CFU issues des progéniteurs complémentés génèrent différentes lignées cellulaires CFU-GM, BFU-E et CFU-M (données non présentées), descendants d'une même cellule mère (une cellule mère entourée de colonies satellites).

Ces observations confirment l'intégration du transgène dans plusieurs cellules progénitrices. Les cellules $FancC^{-/-}$ complémentées, dans la première génération de souris, conservent donc leurs habiletés en matière de reconstitution, de prolifération et de résistance à la MMC. Par ailleurs, il est à noter que la survie des cellules $FancC^{-/-}$ complémentées surpasse de 10 % celle des cellules sauvages ayant fait l'objet d'une IIF et d'une sélection par la MMC et de 20 % comparativement aux cellules complémentées mais non triées (figure 24). Cette majoration confirme le bénéfice du traitement à la MMC chez les Fanconi complémentés.

2-4-3 Transplantations tertiaires de moelle totale de souris secondaires

Les souris ayant reçu le transgène lors d'une chirurgie fémorale, sont traitées, pendant 15 semaines consécutives par des injections non létales de MMC. Les animaux ayant survécu ($FancC^{-/-}$ et wt) sont inclus dans une première procédure expérimentale de transplantation de moelle la TR3. La moelle osseuse de ces souris secondaires (TR3) est transplantée en série dans des receveuses tertiaires sauvages, lors de la TR4 ($n_{total} = 12$). En dépit de l'absence de fluorescence médullaire, les cellules de moelle totale sont tout de même transplantées (TR4).

2-4-3-a Expression sanguine du transgène dans les souris tertiaires

Les expériences de transplantations tertiaires visent à démontrer que la correction génique atteint les CSH en particulier les LTR capable de générer des cellules STR (CD34⁺) à l'origine de la descendance hématopoïétique. La reconstitution du processus hématopoïétique dans ces receveuses conclu à la fonctionnalité des CSH *FancC*^{-/-} corrigées qui une fois complémentées dans les souris primaires deviennent capables de proliférer et de régénérer pour la troisième fois consécutive, un organisme receveur dans son intégralité (cellules sanguines et immunitaires).

Les caractéristiques phénotypiques restaurées par la correction génique sont maintenues, en dépit des proliférations successives induites par les traitements à la MMC et les transplantations. Pourtant, cette reconstitution n'est pas à elle seule suffisante pour démontrer l'expression du transgène, aussi des analyses sanguines mensuelles sont effectuées sur l'ensemble des animaux receveurs (**figure 38**).

Ces études sont menées en dépit du fait que la fluorescence médullaire n'était plus détecté chez les donneuses secondaires. Il était envisageable à ce stade, que les quelques cellules *FancC-EGFP*⁺ soient trop peu nombreuses pour être identifiées en cytométrie de flux. En revanche, elles peuvent être sollicitées dans le cadre d'une transplantation et conduire à l'apparition de la fluorescence dans les souris tertiaires.

Au premier mois, chez les receveuses tertiaires la fluorescence est exprimée dans moins de 4 % des cellules du sang circulant et cette proportion se réduit à moins de 2 %, au deuxième mois. Ces proportions ne sont pas suffisantes pour conclure à l'expression du transgène. Bien qu'aucune fluorescence sanguine n'ait été retrouvée, les cellules sanguines circulantes des receveuses sont constituées à plus de 85 % les cellules des donneuses.

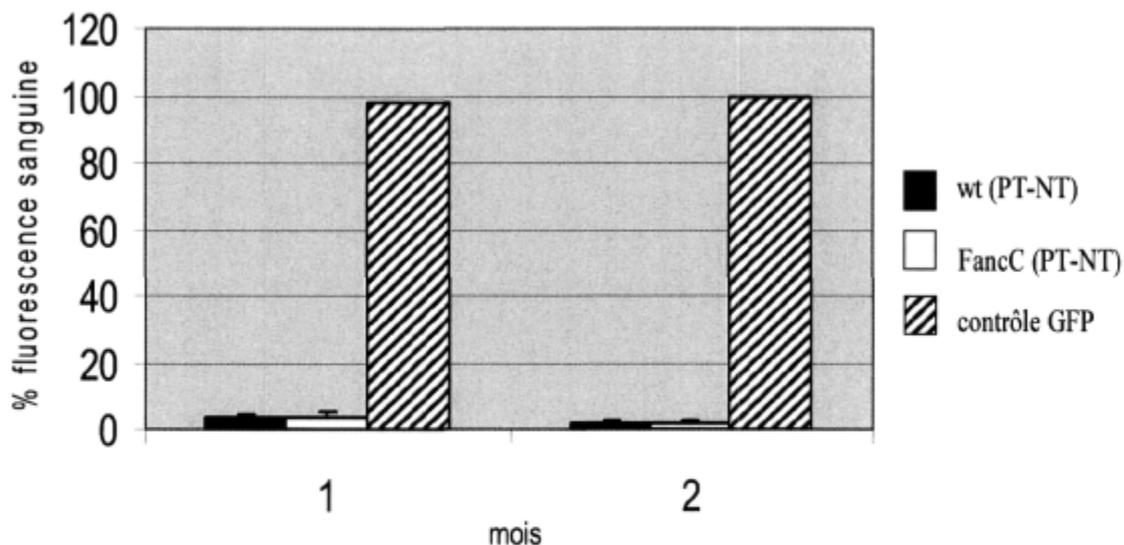


Figure 38 : Expression sanguine du transgène dans les souris tertiaires

Analyse mensuelle par FACS de l'expression sanguine du transgène *FancC-EGFP* dans les souris tertiaires (TR2). Sauvages (n = 6) et *FancC*^{-/-} (n = 6).
Abréviations : PT pré-traitées, NT non traitées, +/- écart-type.

Ces taux sont non seulement des indicateurs de la prise de la greffe, mais surtout ils confirment le maintien chez la receveuse tertiaire, des cellules de la donneuse primaire. Bien que maintenues et exploitées par l'organisme receveur, lors de la reconstitution hématopoïétique, les CSH mettent un terme à l'expression de la fluorescence transgénique. Pour éprouver plus avant l'activité de la protéine, un test de survie est réalisé que les souris tertiaires.

2-4-3-b Test de survie des souris tertiaires

Pour vérifier le maintien de l'expression de la protéine transgénique et valider son activité biologique, une évaluation de la résistance des souris aux injections de MMC est entreprise. À l'exception des souris contrôle *FancC*^{-/-} non corrigées, aucune mortalité des animaux transplantés n'est rapportée, après 14 semaines de traitement. Cette observation confirme l'expression du transgène, la fonctionnalité de la protéine et son activité dans les souris *FancC*^{-/-} génétiquement modifiées. Une nouvelle approche est testée, qui devait permettre de délivrer le gène correcteur, sans impliquer le recours à une étape *ex vivo*. À cet effet, la faisabilité d'une administration par injection intraveineuse du vecteur lentiviral porteur du gène *FancC-EGFP* a fait l'objet d'une évaluation. Elle n'a cependant pas permis de retrouver l'expression du transgène dans aucune des cellules sanguines, suggérant la destruction rapide du stock viral, par le système immun des souris, au premier chef duquel se trouve le complément.

3- Thérapie génique par correction *in vivo*-Discussion

3-1 L'administration sanguine, une veine tentative

Compte tenu du fait que la correction *ex vivo* ne constitue pas une véritable option thérapeutique pour les patients Fanconi¹⁹⁷, de nouveaux procédés de thérapie génique sont évalués et doivent tenir compte des principales caractéristiques des CSH Fanconi. Ces particularités sont liées à l'hypersensibilité des CSH Fanconi à la culture *ex vivo*¹⁹⁷, aux cytokines²⁸⁴, aux radiations²⁸⁵ et à leur nombre réduit (1-10 % du contenu normal en CD34⁺).

3-2 Les injections intra-fémorales : parcours d'un transgène

3-2-1 De l'expression à l'activité biologique

L'efficacité du transfert viral par IIF permet d'obtenir des niveaux de fluorescence compatibles avec ceux d'autres équipes qui ont recours aux protéines de fusion.

Les souris corrigées présentent des taux sanguins normaux et comparables à ceux des souris sauvages, pour les différentes lignées cellulaires lymphoïdes et myéloïdes. L'expression du transgène est également retrouvée, dans les cellules thymiques et spléniques, ce point est lié à une caractéristique propre au modèle murin, qui conserve un vestige embryonnaire d'une hématopoïèse splénique²⁸⁶. Comme les sauvages, les souris *FancC*^{-/-} complémentées, maintiennent pendant toute la durée de l'expérimentation des comptes sanguins normaux et ne présentent aucun signe pré-leucémique. Les progéniteurs hématopoïétiques peuvent à la fois résider dans la moelle osseuse et circuler dans le sang, selon un procédé complexe et une régulation partiellement comprise, dans lesquelles des molécules d'adhésion et des cytokines jouent un rôle majeur. Cette mobilité pourrait entre autres expliquer que la fluorescence ait été retrouvée dans les deux fémurs des souris, lors des premières expérimentations (IIF-1).

Si la présence du transgène dans les CSH *FancC*^{-/-} est aisément compréhensible, elle l'est moins dans les souris sauvages et *FancA*^{-/-}, qui la maintiennent à des niveaux élevés. D'une part parce que les souris sauvages disposant déjà de deux copies fonctionnelles de ce gène, ne devraient pas en avoir l'utilité et d'autre part parce que les souris *FancA*^{-/-}, mutées pour le gène *FancA*, ne peuvent prétendre à aucune correction médiée par le transgène *FancC*. En réalité, cette situation s'explique par l'avantage que confère, son lié à une surexpression du gène *FancC*²⁸⁷, responsable d'un effet anti-apoptotique¹¹⁸ et protecteur.

Ces fonctions anti-apoptotiques²⁸⁸ expliquent comment sa surexpression avantage les cellules, leur permettant de résister aux dommages induits par certaines cytokines (TNF α et IFN γ)^{132,56,262,263,289} et par le système Fas ligand²⁹⁰. Ces expériences ont également montré qu'il est possible de recourir aux vecteurs lentiviraux pour corriger efficacement les CSH, même primitives. Dans le cadre de l'IIF, les animaux reçoivent une dose unique de vecteur viral porteur du transgène *FancC* couplé au marqueur *EGFP*.

Les premières manifestations du transgène confirment son intégration dans les cellules, elles ne garantissent en revanche aucunement sa fonctionnalité. La correction phénotypique des cellules transduites est mesurée en rapport avec l'activité biologique de la protéine FANCC-EGFP codée par le vecteur lentiviral. Son évaluation, chez une trentaine de souris se fait grâce à l'usage de la MMC. Cette drogue agit directement sur l'ADN en générant des structures particulières (ponts interbrins), extrêmement toxiques, au point de nécessiter une réparation rapide des dommages, à défaut de conduire à la mort cellulaire par apoptose. Contrairement aux sauvages, les cellules Fanconi exposées à la MMC sont incapables de corriger les dommages induits. Leur croissance est alors arrêtée, les anomalies chromosomiques s'accumulent, jusqu'à conduire à la mort cellulaire. Lorsque ce phénomène est reproduit à l'échelle d'un organisme entier, il conduit à l'épuisement des réserves de CSH. À terme, les animaux Fanconi sont condamnés à une mort certaine, des suites d'une aplasie médullaire sévère²⁹¹.

Lors d'une stimulation par la MMC, la protéine FANCC agit comme un interrupteur entre l'apoptose et la nécrose²⁹². Alors que, 4 à 6 injections successives suffisent habituellement à provoquer une pancytopenie létale chez les animaux nullizygotes²⁷¹, les Fanconi corrigées présentent une survie comparable à celle des sauvages. Confirmant l'expression du transgène et la production d'une protéine fonctionnelle intégrée à la machinerie cellulaire soit dans ce cas de figure, au processus biologique de réparation de l'ADN.

L'usage de la MMC permet ainsi d'augmenter rapidement les niveaux de fluorescence en sélectionnant les cellules complémentées. De fait, la MMC induit préférentiellement la survie des cellules corrigées, donc les cellules *FancC-EGFP*⁺ qui acquièrent un avantage compétitif pour la repopulation de la moelle osseuse et de toutes les autres niches. Sur une période plus longue (5 mois), l'environnement médullaire de ces animaux est reconstitué de cellules corrigées dotées d'habiletés leur permettant de résister aux dommages MMC-induits et de lutter contre l'apparition d'une aplasie médullaire létale. L'administration de *FancC-EGFP* confère, à tous les animaux nullizygotes, une résistance améliorée aux injections de MMC. Cet avantage compétitif a déjà fait l'objet d'études dans le cadre d'autres tentatives de correction des CSH FA^{276,293}. L'ensemble des procédures valident l'effectivité de la correction génique par IIF et prouvent que cette méthode peut prétendre restaurer les pleines capacités des cellules Fanconi et corriger les défauts hématologiques des animaux.

3-2-2 Correction phénotypique à court terme

La survie des souris traitées à la MMC confirme l'atteinte des cellules STR, lesquelles garantissent à court terme la production régulière de cellules hématopoïétiques. La réalisation d'essais clonogéniques conforte la fonctionnalité des cellules progéniteurs, par la maintien du transgène. La survie des cellules progénitrice de souris complémentées non traitées est de 70 % comparativement à une survie de 90 % pour les souris complémentées et traitées.

La pression de sélection exercée au moyen de la MMC²⁸³, enrichie la moelle osseuse de cellules corrigées ce qui se traduit par une survie majorée de 20 %, relativement à leurs homologues issus de souris primaires non traitées à la MMC (TR1) et de 10 % comparativement aux sauvages. L'administration de MMC comme agent de sélection uniquement dans le cadre d'un traitement post-chirurgie (NP-T) s'avère donc bénéfique dans le modèle murin.

La transduction lentivirale de CSH préserve donc les pleines capacités des cellules sauvages, tout en garantissent le maintien des processus d'autorenouvellement, de reconstitution et de différenciation à long terme dans les cellules complémentées.

En dépit du fait que la fluorescence n'ait pu être observée, dans aucune des colonies formées à partir des cellules de souris $FancC^{-/-}$ complémentées, leur résistance aux dommages induits par la MMC et leur capacité de prolifération et de différenciation, suffisent à confirmer l'expression du transgène et son utilisation dans un contexte biologique qui fait habituellement défaut aux Fanconi. Leur croissance équivaut alors celle de souris sauvages.

Enfin, dans les souris $FancC^{-/-}$, la correction se manifeste également sur la structure interne du tissu qui subit un véritable remodelage consécutif à l'invasion cellulaire. Les analyses histologiques permettent de constater une recolonisation massive de l'os hématogène, par les cellules des souris $FancC^{-/-}$ complémentées. Les cellules complémentées recolonisent massivement les organes hématogènes, en témoignent l'expression du transgènes dans des régions anatomiquement éparces (rate, thymus, sternum), alors que l'injection était locale, notion qui est vérifiée par plusieurs groupes²⁹⁴.

3-2-3 Correction phénotypique à long terme

La réalisation de transplantations successives (secondaires et tertiaires) permet de déterminer rétrospectivement le caractère souche d'une cellule. Les reconstitutions post-transplantation exigent une capacité de prolifération et de différenciation des LTR les plus primitives, que sont les CD34⁺. Seules les cellules qui pourront inlassablement proliférer et se différencier, au cours des transplantations consécutives, pourront se prévaloir de la qualité de cellules souches.

De précédentes études ont démontré que l'atteinte des CD34⁺ lors de transductions lentivirales est non seulement possible mais surtout très efficace²⁴³, atteignant des niveaux relativement élevés qui selon les équipes et les vecteurs, varient de 45%²⁸⁸ à 97%²⁹⁵. Dans un contexte Fanconi, de tels niveaux constituent une véritable manne, les cellules corrigées disposant alors d'un avantage sélectif¹⁹², pourront proliférer et ainsi augmenter leur nombre. D'ailleurs, le Dr Bataille parvient ainsi à majorer de 25 % la proportion de cellules corrigées par l'usage de MMC²⁹⁶.

Les résultats des essais clonogéniques sur les souris primaires et secondaires, ont également démontré l'aptitude des cellules progéniteurs de souris secondaires et tertiaires FancC^{-/-} corrigées, à former des colonies en présence de MMC. La croissance et la différenciation des CFU témoignent d'une correction des CSH de long terme, permettant à trois générations de souris de recouvrer des facultés comparables à celles de leurs homologues sauvages. Cette complémentarité génotypique est maintenue à long terme qui se traduit par une correction phénotypique, observée en d'autres circonstances²⁹¹. Ce qui suggère très clairement que les IIF atteignent les cellules capables d'expansion dotées de capacités de reconstitution médullaire, à court, moyen et long terme.

Par ailleurs, la capacité du transgène à corriger phénotypiquement plusieurs générations de cellules Fanconi, est le signe d'une intégration stable et durable, dans la structure nucléaire de plus primitives d'entre elles. Il serait intéressant à ce stade, d'observer si la correction lentivirale, en plus de restaurer la capacité de réparation l'ADN²⁷³, est capable de réverter les anomalies du cycle cellulaire²⁹⁷.

Le transgène délivré aux souris primaires est retrouvé, dans les cellules sanguines et médullaires de toutes les receveuses secondaires, il a donc atteint les cellules CD34⁻ capables d'autorenouvellement et de reconstitution à long terme (LTR), ainsi que les CD34⁺ en charge de la reconstitution à court terme (STR).

3-2-4 Disparition du marqueur GFP

Un point reste cependant en suspens, celui de l'arrêt d'expression du gène traceur *EGFP*, l'altération de ce gène au cours du temps peut être invoquée uniquement pour les CSH les plus âgées.

L'éventualité qui paraît la plus acceptable serait une durée de vie limitée, une élimination progressive par le système immunitaire, voire une altération de la séquence *EGFP* (mutation ponctuelle, délétion, recombinaison), une inactivation au cours du temps²⁹⁸ ou une intégration du transgène sous forme épisomale²⁹⁹.

En effet, l'intégration dans les cellules infectées, du VIH-1 ou des vecteurs lentiviraux dérivés du VIH-1 implique une transcription inverse de l'ARN viral en une copie d'ADN double brin. Par la suite, cet ADNc viral s'intègre dans le chromosome de la cellule hôte, mais une fraction d'ADNc linéaire produit par les cellules infectées par les vecteurs lentiviraux (transfection) se referme sous forme de cercles, qui ne peuvent alors plus s'intégrer puisqu'ils ne sont plus des substrats pour la machinerie virale d'intégration³⁰⁰.

Plusieurs travaux avaient jusqu'alors conclu que les formes circulaires épisomales étaient incapables d'intégration, mais surtout incapables d'expression, puisque l'intégration est nécessaire à l'expression du transgène^{238,239}. Mais les récents travaux du Dr Terskikh prouvent le contraire, il est possible pour une structure épisomale non seulement de pourvoir à l'expression du transgène qu'elle contient, mais également de se maintenir sur plusieurs générations de cellules^{300,301}. D'ailleurs les structures épisomales contenant des séquences EGFP, sont capables d'une expression de fluorescence suffisante pour être détectable par FACS³⁰¹. Il n'en reste pas moins que les formes épisomales, n'étant pas intégrées de façon stable dans le génome sont perdues et leur expression décroît avec le temps, soit diluées par les divisions cellulaires successives, soit par « silencing » de son expression. Cette perte pouvant affecter des cellules primitives comme les cellules souches ou les cellules progénitrices, ce qui expliquerait la disparition du EGFP dans toutes les lignées de cellules différenciées. La disparition de fluorescence pourrait donc être la conséquence d'une perte de telles structures. Les transgènes de nature épisomale pourraient d'ailleurs constituer une alternative à l'expression protéique dépourvue de risques mutationnels associés aux événements d'intégration.

Le mécanisme alternatif qui pourrait être évoqué pour souligner l'expression incomplète du transgène est la variabilité induite par la position du transgène dans l'hétérochromatine, proche des régions centromériques et télomériques du chromosome. La structure de l'hétérochromatine dans ces régions exerce une répression sur des gènes euchromatiques situés à proximité^{302,303}.

Il pourrait également être question de la production d'une protéine transgénique tronquée pour sa partie EGFP ou encore d'une réaction immunitaire contre la partie EGFP. Bien que cette dernière possibilité soit peu réaliste compte tenu de la localisation exclusivement intracellulaire de la protéine FANCC-EGFP.

Il est à noter que plusieurs équipes rapportent que certaines variations liées au pH (acidité), à la température³⁰⁴ ou à la pression osmotique sont responsables de la perte d'expression de la protéine EGFP.

Il est également important de garder à l'esprit que le temps de maturation du fluorochrome³⁰⁵, ajouté au temps de repliement de la partie EGFP (folding) totalise une durée moyenne de 30 minutes³⁰⁶, mais elle peut s'étendre à 90 min³⁰⁷, ce qui représente un véritable fardeau pour la cellule qui le cas échéant pourrait se départir de l'encombrant EGFP.

Dans ce même ordre d'idées, les cellules eucaryotes sont connues pour avoir développé un grand nombre de stratégies, leurs permettant de se défendre contre l'ADN étranger³⁰⁸ et particulièrement contre les intégrations virales^{309,310}. Au nombre de ces stratégies sont retrouvées la méthylation, la désacétylation d'histones³¹¹, la condensation de la chromatine³¹² et la présence de larges bandes d'hétérochromatine compacte constituant des barrières transcriptionnelles interrompant la transcription virale³¹³. De plus, la méthylation d'éléments viraux transcriptionnels est associée à l'inhibition ou *silencing* de la transcription des gènes³¹⁴.

Une autre hypothèse existe et prévaut généralement dans les équipes qui utilisent le marqueur EGFP en fusion. En effet dans ce cas, il se produit fréquemment une réduction significative, voire une inactivation de l'une ou l'autre des protéines en fusion et parfois même des deux. Ainsi, les travaux du Dr Yu rapportent une réduction de la fluorescence du gène placé en seconde position, allant parfois jusqu'à le rendre indétectable en cytométrie³¹⁵. Il apparaît justement que la structure de notre construction virale délivre un gène monocistronique, résultat d'une fusion du gène du gène *FancC* en amont et du gène *EGFP* en aval. Cependant, de telles constructions monocistroniques expriment un niveau de fluorescence majoré comparativement à des constructions bis-cistroniques recourant à une séquence *IRES* (*internal ribosomal entry site*).

Une autre piste qui pourrait évoquée est la préférence des vecteurs dérivés de VIH-1 à transduire plus efficacement des cellules en phase qui prolifèrent ou qui sont à l'arrêt G_1/S ou G_2 comparativement à celles en phase G_0 . Cette particularité tient au fait qu'une cellule en phase G_0 prolongée bloque progressivement la reverse transcription du génome du vecteur²³⁸. La majorité des cellules transduites auraient donc été des cellules progénitrices et précurseurs, les cellules souches n'auraient que peu ou pas étaient transduites, expliquant à terme la disparition de la fluorescence.

D'autres équipes observent une disparition de la fluorescence chez les receveuses secondaires, alors que les souris primaires étaient $EGFP^+$. Cette disparition peut signifier une inactivation du transgène par silencing, et ce en dépit de l'utilisation d'un vecteur SIN. dans des cellules progénitrices ou dans des cellules souches, comme le suggèrent les travaux de l'équipe du Dr Tahara-Hanaoka³¹⁶.

Enfin, un point apparaît dans de nombreuses publications ayant recours à une correction génique par IIF^{294,317}, l'analyse de la fluorescence n'est habituellement entreprise qu'entre la 3^{ème} et la 20^{ème} semaine suivant l'injection. Cette investigation limitée dans le temps suggère une fluorescence également temporellement limitée.

Les travaux du Dr Worsham vont jusqu'à démontrer une réduction d'un facteur 5 à 10 du niveau de fluorescence, au-delà du 4^{ème} mois²⁹⁴, ce qui est en droite ligne des observations faites au cours de ce travail. Néanmoins, les transplantations et les tests clonogéniques contribuent à confirmer le maintien du transgène *FancC* et son activité biologique, ce qui in fine est l'élément essentiel à la validité de l'IIF.

Bien que ces hypothèses soient individuellement valident et très attrayantes, elles ne sont pleinement satisfaisantes dans notre procédure, en raison d'une disparition de la fluorescence brutale et rapide. Alors que tout porte à croire que la transduction par IIF est de nature polyclonale, il est surprenant de constater que toutes les cellules, chez toutes les souris perdent subitement l'expression du marqueur GFP, qu'elles soient en circulation ou résidentes de la moelle.

La perte de fluorescence pourrait être une résultante de toutes ces conjectures. Mais les hypothèses le plus probables pour expliquer cette disparition seraient d'invoquer une perte lors d'un phénomène de recombinaison ou la correction génique préférentielle de cellules progénitrices, dont la durée de vie serait limitée.

3-2-5 Quel traitement de sélection privilégier ?

De plus grandes quantités de cellules FANCC-EGFP⁺, sont retrouvées après l'administration répétée de doses non létales de MMC, grâce à la pression de sélection exercée en faveur des cellules corrigées^{283,296}. À court terme, cette procédure concourt à l'augmentation de la fluorescence sanguine. Ce traitement seul est utilisé, sans qu'aucune toxicité cellulaire ne soit observée, dans la première, deuxième ou troisième génération de souris. Pourtant les données expérimentales ici présentées démontrent que la moelle osseuse d'animaux non traités à la MMC est également capable de générer d'importants niveaux de fluorescence sur plus long terme. Au point, qu'après quelques mois, ces taux égalent ceux exprimés par la moelle des souris traitées à la MMC, notion déjà observée document²⁹⁶. Il apparaît ainsi que l'environnement médullaire exerce une certaine forme de pression, lui permettant d'éliminer naturellement les cellules non corrigées, alors que celles complémentées recolonisent graduellement la niche. Ces données sont d'autant plus encourageantes qu'en clinique, l'usage de la MMC comme traitement de sélection est peu recommandé en raison des dommages qu'il induit. Comme en témoignent les niveaux sanguins des souris primaires et secondaires, ainsi que leurs taux de survie, l'étape de sélection chimique MMC n'aurait donc pas un caractère obligatoire et ne serait aucunement nécessaire à une meilleure correction génique dans le contexte Fanconi. Lors des transplantations, la fluorescence sanguine chez les receveuses secondaires est comparable à celle d'animaux ayant reçu une moelle traitée ou non à la MMC.

La particularité des cellules médullaires extraites des souris primaires non traitées, est d'être constituée d'un amalgame cellulaire ou mosaïsme, dans lequel coexistent des cellules corrigées et des cellules non corrigées. Lesquelles une fois transplantées sont probablement éliminées au profit des corrigées, capables d'une prolifération plus rapide et d'une meilleure reconstitution.

Par ailleurs, les données permettent de constater que la fluorescence cellulaire des receveuses secondaires, comparativement à celle des souris primaires est élevée et peu sujette aux variations, les cinq premiers mois (75-90 %). Ces observations sont explicables de diverses manières. D'une part, dans un contexte de reconstitution, la moelle osseuse de l'organisme receveur, utilise préférentiellement les cellules capables de prolifération et de différenciation, soient les cellules corrigées.

D'autre part, la reconstitution favorise une prolifération basée sur le modèle de l'expansion (cf **figure 9**) et vise à reconstituer dans les plus brefs délais, un processus hématopoïétique complet et fonctionnel. La conséquence immédiate étant l'expansion massive des cellules associée à l'expression toute aussi massive de fluorescence cellulaire.

3-2-5 Les avantages immédiats

Dans le cadre de l'IIF, les virions sont délivrés *in situ* au moyen d'une injection unique directement, dans la cavité médullaire. Ils se retrouvent d'emblée, dans un milieu regorgeant de cellules maximisant les chances de transduire des CSH, de la plus primitive résidente à celle, en route vers la circulation sanguine. Dans ce procédé aucune étape de purification ou de stimulation par les cytokines n'est requise et une injection unique suffit à cibler les cellules. Ce qui limite le stress inhérent aux manipulations et l'entrée en cycle intempestive favorisée par le cocktail de cytokines habituellement d'usage *in vitro*. Par ailleurs, les CSH sont maintenues dans leur environnement natif, en présence de l'ensemble de signaux médullaires et des interactions nécessaires à leur maintenance et à leur survie. Quand on connaît les particularités des CSH de patients Fanconi, cet élément constitue sans conteste le plus

grand atout de l'IIF. Enfin, contrairement à la thérapie génique *in vitro*, la stratégie *in vivo* permet de se départir de l'étape d'irradiation des souris. La destruction du système immunitaire des animaux primaires n'est donc plus un pré-requis et octroie de fait aux souris primaires une meilleure résistance aux infections d'origines bactériennes, microbiennes ou virales. Dans la même perspective, l'IIF abolit les risques de rejet de greffe ou de mort par maladies opportunistes, puisque tout le processus de correction génique a lieu, *in vivo*, dans le fémur du malade. L'étape cruciale consiste à délivrer le gène avec une grande efficacité, ce qui suppose d'atteindre le maximum de cellules et préférentiellement les plus quiescentes.

La procédure est rendue d'autant moins aisée dans un cadre clinique et s'avère particulièrement délicate, puisque l'état d'aplasie avancée, dans lequel se trouvent les patients, la pauvreté de leur moelle et l'extrême fragilité des CSH restantes, réduit à la fois le nombre de cellules corrigeables et les bénéfices de la complémentation si elle survient trop tardivement.

4- Thérapie génique par correction *in vivo*-Conclusion

Chez les patients Fanconi, la correction génique *in vitro* est sur la scellette, en raison des désagréments majeurs lui sont associés. Coupées de leur environnement natif, les CSH ne reçoivent plus les signaux endogènes nécessaires au maintien de leurs caractéristiques fonctionnelles. Cultivées en présence d'un cocktail de cytokines, les CSH entrent de manière forcée dans le cycle cellulaire, favorisant leur différenciation et la perte de leur capacité d'autorenouvellement³¹⁸. Ces éléments sont autant de facteurs négatifs altérant les capacités de homing³¹⁹ et de prise de la greffe³²⁰. Ces conséquences de la culture *in vitro* observées pour les CSH sauvages sont plus marquées, lors de l'usage de CSH Fanconi¹⁹⁷. Cette première série de travaux jette les bases d'un traitement novateur de correction génique par injection intra-fémorale (IIF), qui pourrait présenter d'importants bénéfices pour les patients Fanconi.

La technique de transfert génique *in situ*, délivre les vecteurs viraux directement, dans la cavité médullaire et tire ainsi avantage du support naturel de la moelle, en maintenant les interactions nécessaires à la viabilité et à la fonctionnalité des CSH. Le protocole de transduction ne fait ici aucun usage d'une pré-stimulation des cellules au moyen de cytokines, d'aucune purification cellulaire ou de quelconques manipulations *ex vivo*.

Son efficacité clinique se traduit par l'expression de la protéine transgénique FANCC-EGFP, dans toutes les cellules différenciées du sang périphérique et les cellules primitives de la moelle osseuse. La correction *in situ* par IIF va au-delà de la simple expression du transgène dans les cellules médullaires et sanguines. Elle permet aux cellules transduites d'intégrer le transgène, dans un cycle biologique et de l'employer, lors de processus cellulaires particuliers (prolifération et réparation). L'activité fonctionnelle de la protéine transgénique se manifeste, *in vitro*, par l'augmentation des colonies hématopoïétiques et la résistance à la MMC, lors de tests clonogéniques. *In vivo*, elle se reflète par l'augmentation de la fluorescence sanguine, la survie aux injections séquentielles de MMC et l'amélioration permanente de la cellularité de la moelle osseuse de toutes les souris nullizygotés $FancC^{-/-}$. Le phénotype cellulaire de sensibilité aux agents pontant des $FancC^{-/-}$ est reverté et l'organisme est doté de nouvelles CSH capables de reconstituer localement les réserves, mais contribuant également, à l'échelle de l'organisme tout entier, à assurer sa survie et sa pérennité, dans un contexte habituellement problématique aux Fanconi.

L'exposition à un agent pontant atteste de la fonctionnalité de la protéine, en restaurant l'intégrité du processus de réparation des lésions à l'ADN. Le recours à des doses non ablatives promet l'enrichissement des cellules transduites²⁷³. Pourtant, il apparaît que les effets de ce traitement ne font que reproduire à plus grande vitesse les effets naturels de la moelle, elle-même capable en quelques mois de favoriser une recolonisation médullaire massive des cellules complémentées.

Cette approche médiée par une exposition unique aux vecteurs lentiviraux, assure une correction génique efficace des STR autant que des LTR des souris *FancC^{-/-}* en témoigne son maintien sur 3 générations successives de souris, confirmant l'atteinte des cellules primitives quiescentes.

Ces résultats apparaissent particulièrement encourageants, tant du point de vue de leur réalisation technique et que de leur efficacité thérapeutique. Cette procédure s'est avérée capable de corriger et de traiter les manifestations hématologiques particulières à la pathologie Fanconi.

Cependant, à ce stade de l'expérimentation, l'imperfection des modèles doit à nouveau être évoquée. Certaines divergences phénotypiques entre la souris Fanconi et le patient humain empêchent d'extrapoler à l'Homme l'intégralité des données obtenues jusqu'alors, du moins sans avoir au préalable redéfini le contexte physiologique. La différence majeure tient au fait que dans les conditions stationnaires, l'hématopoïèse des souris Fanconi est virtuellement normale. Contrairement aux patients, les souris ne développent pas spontanément de défauts majeurs de la moelle osseuse (aplasie et leucémies), ce qui de fait inscrit ces résultats hors contexte clinique. Il est aujourd'hui établi que dans certaines conditions de stress particulières, comme celle induite après une exposition à la MMC, la moelle des souris est altérée et un état d'aplasie médullaire déclenché^{34,271}. Aussi, en dépit de résultats encourageants, il n'est pas encore permis de conclure à l'efficacité thérapeutique de notre stratégie, avant qu'une réévaluation ne soit réalisée dans un cadre plus proche de la réalité des malades.

L'efficacité d'une telle procédure reste néanmoins tributaire du titre viral^{321 322}, avec un effet plateau obtenu au delà de certains titres, démontrant une saturation des cellules à l'égard de la transduction.

CHAPITRE III

LA THÉRAPIE GÉNIQUE *IN VIVO* DANS UN MODÈLE APLASIQUE

Avant-propos

J'ai réalisé l'intégralité des expériences présentées dans ce troisième chapitre. J'ai procédé à la réalisation de l'état aplasique chez les souris Fanconi avant d'estimer leur correction génique après IIF du gène correcteur. L'analyse des échantillons sanguins des souris ayant fait l'objet d'une chirurgie, à l'étude les tests de résistance à la MMC *in vivo* et les tests clonogéniques *in vitro* sont réalisés par mes soins. À la suite des transplantations, les analyses sanguines ont été réalisées avec le support technique de Marie-Chantal Delisle et Valérie Bourdages.

1- Introduction

Les expériences présentées au chapitre précédent confirmaient l'efficacité thérapeutique d'une correction génique médiée par une injection *in situ* du transgène correcteur. Cette procédure particulièrement facile d'accès et limitant les effets conjugués de la manipulation et de la culture *in vitro*, permet une correction des déficits hématopoïétiques des souris et restaure leur capacité de résister aux dommages induits à leur matériel génétique. Pourtant, cette stratégie n'a pas dévoilé ses potentialités dans le contexte clinique Fanconi, un contexte au sein duquel, les patients présentent une aplasie médullaire plus ou moins sévère, réduisant les stocks de CSH. Cette diminution pourrait affecter l'efficacité de la correction génique et *in fine* altérer l'amélioration de l'état des malades. Aussi, une nouvelle procédure devra explorer la capacité d'atteindre et de corriger les CSH dans un organisme aplasique.

2- Matériels et méthodes

Plusieurs des procédures expérimentales utilisées dans cette partie ont été préalablement évoquées dans le chapitre II, à la section Matériels et méthodes. Sauf dans le cas de modifications majeures, elles ne seront donc pas présentées à nouveau.

2-1 Techniques de biologie moléculaire

2-1-1 Immunobuvardage : préparation des échantillons

Les cellules HeLa et HEK 293T, sont lavées deux fois au PBS (*Phosphate Buffered Saline*) et décollées au moyen de la trypsine. Le tampon de lyse Sten (Tris 50mM pH 7.6, NaCl 150mM, 0,5 % Triton X, 0,2 % NP40, complete cocktail inhibiteur antiprotéase Roche) est ensuite ajouté aux cellules. Le tout est déposé sur glace, pendant 20 min. Les lysats récoltés sont transférés, dans un tube eppendorf et dilués dans du tampon de charge (125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 20 % glycérol; 4 % SDS; 0,005 % bleu de bromophénol; 600µM βmercaptho-éthanol), avant d'être chauffés 5 min à 90°C et chargés sur gel d'acrylamide. Les CSH ne nécessitent pas de lyse, le tampon de charge 4X est directement placé au contact du culot à raison de 10⁶ cellules/20 µL. Le lysat est chauffé 5 min à 90°C puis chargé sur gel d'acrylamide.

2-1-2 Immunobuvardage : séparation par gels SDS-PAGE

Les gels de polyacrylamide sont coulés en laboratoire, leur pourcentage en acrylamide varie suivant la taille de la protéine d'intérêt et le degré de séparation souhaité. La composition du gel est la suivante: acrylamide-bis 29:1 (N, N'-Methylene-bis-acrylamide, BioRad); SDS-Tris (375 µM Tris-HCl pH 8,8; 0,1 % SDS); 0,1 % TEMED (N, N, N, N tetra-méthyl-éthylène diamnine, BioRad); 0,65 µM ammonium persulfate (Sigma). La composition du gel d'empaquetage est de: 6 % acrylamide-bis 29:1 (Invitrogen); SDS-Tris (125 µM Tris-HCl pH 6,8; 0,1 % SDS); 0,1 % TEMED et 0,65 µM ammonium persulfate.

Une fois le gel polymérisé, les puits sont lavés individuellement à l'aide d'une seringue et de tampon de migration 1X (0,1 % SDS (m/v) BDH; 0,3 % Tris (m/v) Baker; 1,4 % glycine (m/v) Baker). Pour la migration, 500 mL de ce tampon servent à immerger le gel qui est ensuite chargé, chaque puit recevant un équivalent d'extraits protéiques préalablement chauffés (5 min, 90°C), un puit est réservé au marqueur de poids moléculaire (BenchMark Pre-Stained Protein Ladder, Invitrogen). La migration se fait à voltage constant (125 V), pendant environ 90 min, jusqu'à ce que le front de migration (représenté par le tampon de charge) sorte du gel. Des gels à gradients précoulés (4-12 % et 4-20 % Tris-Acetate NuPAGE, Novex, USA) sont également utilisés. Ils sont dans un premier temps rincés à l'eau distillée (bande protectrice et peigne ôtés), avant d'être placés dans l'appareil à électrophorèse (XCell SureLock Mini-Cell, Novex, USA), la migration se fait à 150 V, pendant environ une heure.

2-1-3 Immunobuvardage : transfert par électrobuvarbage

Une fois la migration sur gel terminée, les protéines peuvent être transférées par électrobuvarbage, sur une membrane PVDF de 0.2 μm (Amersham). Le procédé est le même que le gel soit coulé au laboratoire ou commercial. La membrane doit au préalable être activée, à cet effet elle est pré-humidifiée par immersion, dans un bain de méthanol pendant 10 sec, rincée 5 min, dans de l'eau distillée, puis dans le tampon de transfert (0,15 % Tris (m/v); 0,72 % glycine (m/v), 20 % méthanol (v/v)), dans lequel elle peut être laissée jusqu'au montage des cassettes de transfert. Ce montage réalisé, dans un bain de tampon de transfert, se constitue comme suit : sur la face négative de la cassette, sont déposés dans l'ordre, un premier bloc éponge humidifié, deux feuilles de papier Whatman (VWR scientific), le gel d'acrylamide (ôté des bords inférieur et supérieur), la membrane de PVDF (les bulles d'air sont éliminées par pression), deux feuilles de papier Whatman et le second bloc d'éponge. La cassette est ensuite refermée et placée dans l'appareil de transfert (BioRad), accompagnée d'un bloc de glace. Le transfert est lancé à un ampérage constant (400 mA) pour 1 h ou pour la nuit (100 mA).

2-1-4 Immunobuvardage : immunorévélation des protéines

Une fois le transfert terminé, la membrane chargée de protéines est rincée, dans une solution de TBS-T pH 7,5 (1,2 % Tris (m/v); 1,8 % NaCl; 0,1 % Tween20) et saturée dans une solution TBS-T 5 % lait écrémé (m/v), pendant 1 h ou toute la nuit, sous agitation, afin de bloquer les sites non spécifiques. Elle est ensuite incubée 1 h sous agitation à TP, en présence de l'anticorps primaire dilué dans une solution de TBS-T supplémentée de lait écrémé 1 %. Après trois rinçages de 5 min dans du TBS-T, la membrane est incubée 1h, sous agitation en présence de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort (HRP). La membrane est rincée trois fois 5 min dans du TBS-T, avant que la révélation des protéines ne soit amorcée, par la mise au contact de la membrane et d'un mélange équivolume de solutions commerciales de chemiluminescence intensifiée (ECL enhanced chemiluminescence, Amersham Biosciences), pendant 1 min. Le surplus liquide est épongé par une feuille de papier Whatman, la membrane est ensuite exposée, en chambre noire sur des films autoradiographiques (Super X, Fudji medical X-Ray film) qui sont analysés à l'aide d'un PhosphoImager (Biorad).

2-2 Expérimentations animales

Plusieurs des procédures utilisées dans cette partie sont identiques à celles énoncées au chapitre II, à la section Matériel et méthodes. Aussi, pour une meilleure clarté du document, elles ne feront pas l'objet d'un nouveau rappel.

2-2-1 Création d'un état aplasique

Afin de situer l'étude dans un contexte proche de celui des patients Fanconi, un état aplasique est induit, sur tous les animaux destinés à recevoir le transgène. La procédure est illustrée à la **figure 1**.

L'aplasie est induite chimiquement par un pré-traitement à la MMC, à raison d'une dose par souris (0,3 mg/kg)²⁷¹, délivrée en intra-péritonéale, dans un volume total de 200µL, 5 jours avant la chirurgie fémorale corrective. Les animaux aplasiques (n = 32) sont alors dits pré-traités et notés PT et sont ensuite répartis en fonction du traitement reçu, après l'acte chirurgical. Certaines recevront un traitement hebdomadaire de MMC et seront dites traitées (T), d'autres ne recevront pas de traitement de MMC et seront dites non traitées (NT). Deux cohortes sont disponibles et identifiées comme suit : (PT-NT) et (PT-T) et ce pour chacun des trois génotypes sauvage (wt), FancA^{-/-} et FancC^{-/-}. Dans tous les cas, des échantillons sanguins sont régulièrement analysés en cytométrie de flux, pendant 6 mois. Au-delà de cette période, les animaux sont ensuite sacrifiés et leur moelle intégrée à des procédures clonogéniques ou de transplantations secondaires, comme celles décrites aux paragraphes 1-3-5 et 1-3-6.

2-2-2 Correction génique par injection intra-fémorale

La procédure de correction génique par IIF est identique à celle présentée au paragraphe 1-3-2, du chapitre II du présent document.

2-2-2 Suivi de l'expression du transgène

La procédure de suivi du transgène est identique à celle présentée aux paragraphes 1-3-3 à 1-3-7, du chapitre II du présent document (**figure 39**).

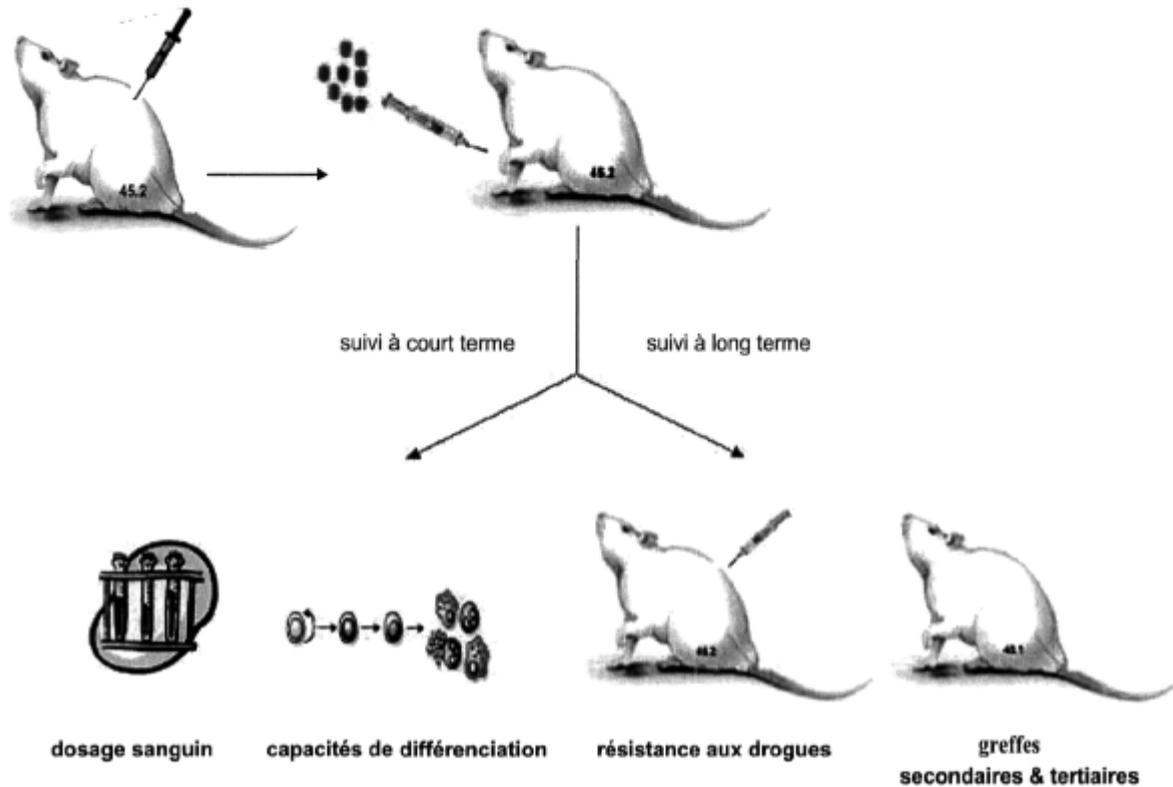


Figure 39 : Procédures de suivi du transgène après IIF dans un modèle aplasique

Les animaux reçoivent 5 jours avant l'IIF, une dose de MMC de façon à induire un traitement aplasiant. Après la correction génique, un examen de l'expression du transgène est réalisé par dosage sanguin, estimation de la capacité de différenciation, résistance aux drogues (MMC) et lors de transplantations successives (secondaires et tertiaires).

3-Résultats

3-1 Injection intra-fémorale et correction génique des souris aplasiques

3-1-1 Traitement aplasiant & cohortes

Au cours de cette troisième partie, un état d'aplasie médullaire est volontairement créé, dans les modèles utilisés. Cet état chimiquement induit permet de disposer de deux cohortes pour chacun des trois génotypes, réparties comme suit: souris pré-traitées (PT) sauvages wt (n = 12), *FancC*^{-/-} (n = 12) et *FancA*^{-/-} (n = 8) qui reçoivent par IIF, le transgène *FancC-EGFP*. La moitié de ces animaux traités, reçoit sur une base régulière par des injections séquentielles non létales de MMC (T). La répartition des animaux au cours de procédures expérimentales est résumée au **tableau 8**.

Tableau 8 : Répartition des souris aplasiques au cours des transplantations

Génotype/ Traitement	Souris wt	Souris <i>FancA</i> ^{-/-}	Souris <i>FancC</i> ^{-/-}	Décès wt	Décès <i>FancA</i> ^{-/-}	Décès <i>FancC</i> ^{-/-}
PT-NT	6 (TR5)	4	6 (TR5)	0	2	0
PT-T	6 (TR6)	4	6 (TR6)	0	3	2

Le tableau indique la nombre et l'appartenance génotypique de chaque animal utilisé l des procédures expérimentales entre parenthèse. Les décès sont présentés dans la partie droite du tableau. *Abréviations : PT pré-traitées à la MMC (traitement aplasiant), NT non traitées à la MMC, T traitées à la MMC.*

Le temps après lequel survient le décès est représenté sous forme de courbe de survie à la **figure 45**

3-1-2 Expression sanguine du transgène dans les souris (PT-NT)

Pour évaluer l'impact et juger du bénéfice thérapeutique de l'IIF dans un contexte clinique, plusieurs étapes de l'étude présentée au chapitre II sont reproduites. Un premier niveau consiste à examiner, sur une période de 6 mois, le niveau sanguin du transgène *FancC-EGFP*, dans chacun des groupes génotypiques de souris aplasiques non traitées à la MMC (**figure 40**).

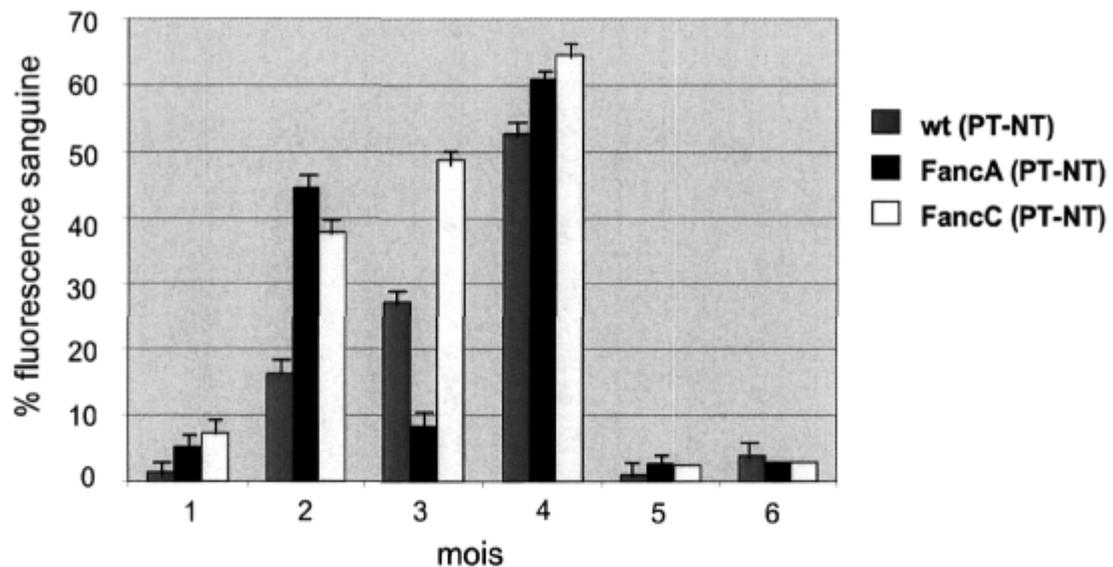


Figure 40 : Expression sanguine du transgène dans les souris aplasiques

Analyse par FACS de l'expression sanguine du transgène *FancC-EGFP* dans les souris aplasiques sauvages (n = 6), *FancA*^{-/-} (n = 4) et *FancC*^{-/-} (n = 6), +/- écart-type. Titre 10×10^8 TU/mL. Abréviations : PT pré-traitées, NT non traitées.

Au premier mois, l'expression du transgène est retrouvée en moyenne dans moins de 2 % des cellules sanguines des souris sauvages (PT-NT), contre 5 % chez les *FancA*^{-/-} et 7 % chez les *FancC*^{-/-}. Ces niveaux sont majorés respectivement de 4 à 16 fois au 2^{ème} mois et continuent d'augmenter graduellement, jusqu'au 4^{ème} mois. À cette date, la représentativité du transgène est de 52 % dans les cellules sanguines des sauvages, 61 % chez les *FancA*^{-/-} et 65 % chez les *FancC*^{-/-}. Par ailleurs, les souris (PT-NT) expriment des niveaux de fluorescence majorés comparativement à ceux évoqués lors de précédentes expériences dans les modèles non aplasiques. Cet état semble améliorer à brève échéance, l'expression du transgène, dont l'expression est maximisée et conforte la faisabilité de l'IIF dans un contexte aplasique.

3-1-3 Expression médullaire du transgène dans les souris (PT-NT)

Compte tenu du fait qu'au 5^{ème} mois, ces animaux ont brutalement réduit leurs niveaux d'expression sanguins du transgène, une partie d'entre eux est sacrifiée et leur moelle soumise à une première série d'analyse en cytométrie de flux.

Les animaux aplasiques (PT-NT) sont sacrifiés et leur moelle comparée à celle des souris non aplasiques (NP-NT) et contrôles (**figure 41**).

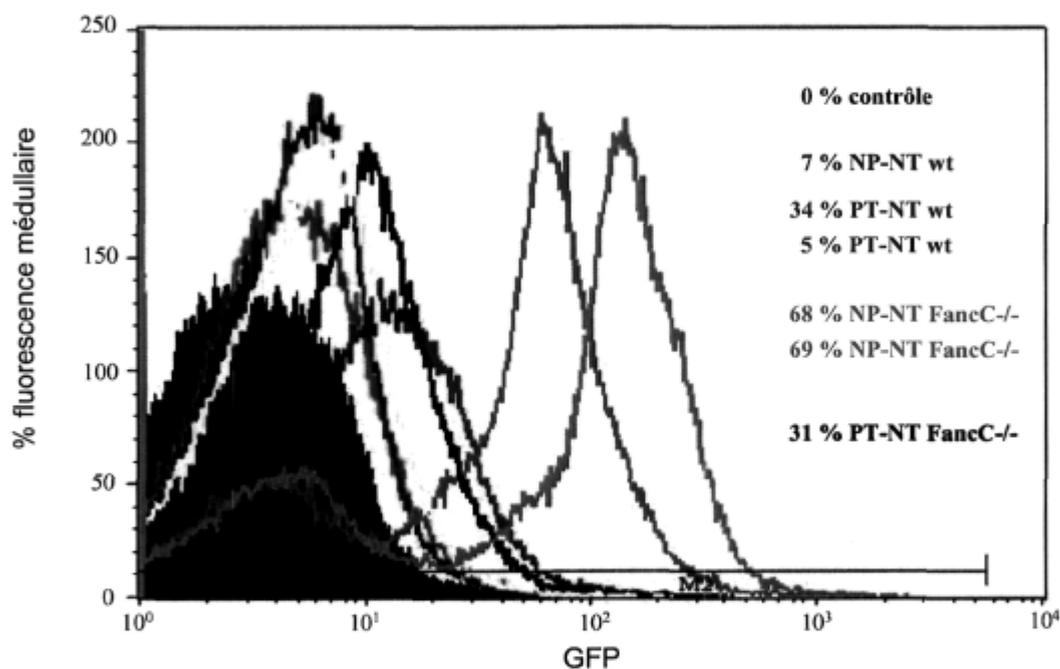


Figure 41 : Profil d'expression médullaire du transgène dans les souris injectées

Analyse par FACS de l'expression médullaire du transgène *FancC-EGFP*, chez les souris aplasiques non traitées (PT-NT), sauvages ($n = 11$) et *FancC*^{-/-} ($n = 12$), au 6ème mois post-chirurgie. Le niveau de fluorescence médullaire est comparé pour les mêmes temps, à celui des souris n'ayant fait l'objet d'aucun traitement à la MMC, soit (NP-NT) *FancC*^{-/-} ($n = 2$) et sauvages ($n = 2$). Les images sont représentatives des souris de chaque traitement et pour chacun des groupes génotypiques. *Abrév.* NP: non pré-traitée, PT: pré-traitée, NT: non traitée. Titre 10×10^8 TU/mL

L'examen en cytométrie de flux révèle qu'en moyenne 20 % des cellules résidentes de la moelle de souris aplasiques *FancC*^{-/-} (PT-NT), exprime le transgène. Le même pourcentage est retrouvé, dans les cellules de souris sauvages (PT-NT). Lorsque l'étude est reproduite en présence des cellules médullaires en provenance d'animaux (NP-NT), plus de la moitié des cellules résidentes expriment le transgène (68 %), soit un taux trois fois supérieur à celui des souris aplasiques (PT-NT).

En limitant la présence du transgène, l'état aplasique paraît à longue échéance, moins avantageux pour les animaux. Chez les individus sauvages (NP-NT), près de 7 % des cellules médullaires maintiennent l'expression de *FancC-EGFP*. Bien que les niveaux de fluorescence sanguins se soient écroulés au 5^{ème} mois, passant de 60 % à moins de 5 %, les valeurs obtenues lors de l'analyse médullaire démontrent le maintien d'une fluorescence locale restreinte aux cellules résidentes chez les animaux (PT-NT).

3-1-4 Test clonogénique sur les CSH (PT-NT)

L'analyse des propriétés hématologiques des progéniteurs est évaluée en présence de MMC et permet de conclure à l'expression du transgène dans ces cellules et à la fonctionnalité de la protéine (**figure 42**). La procédure pré-traitement réduit la prolifération des cellules progéniteurs *in vitro* et leur résistance à la MMC.

Le seul état aplasique suffit à induire réduire de 25 % la capacité de survie en milieu sélectif, qui passe de 55 % chez les souris *FancC*^{-/-} (PT-NT) à 80% chez les *FancC*^{-/-} (NP-NT). Les mêmes conséquences sont observées chez les sauvages, pour lesquelles la capacité de survie est très légèrement réduite (10 %), après un traitement aplasiant.

Cependant, la fonction du transgène est maintenue et la correction génique par IIF reste profitable, puisque la capacité de survie des CSH *FancC*^{-/-} (PT-NT) est améliorée de près de 3 fois, en comparaison de celle des souris *FancC*^{-/-} contrôles non corrigées (< 20 %).

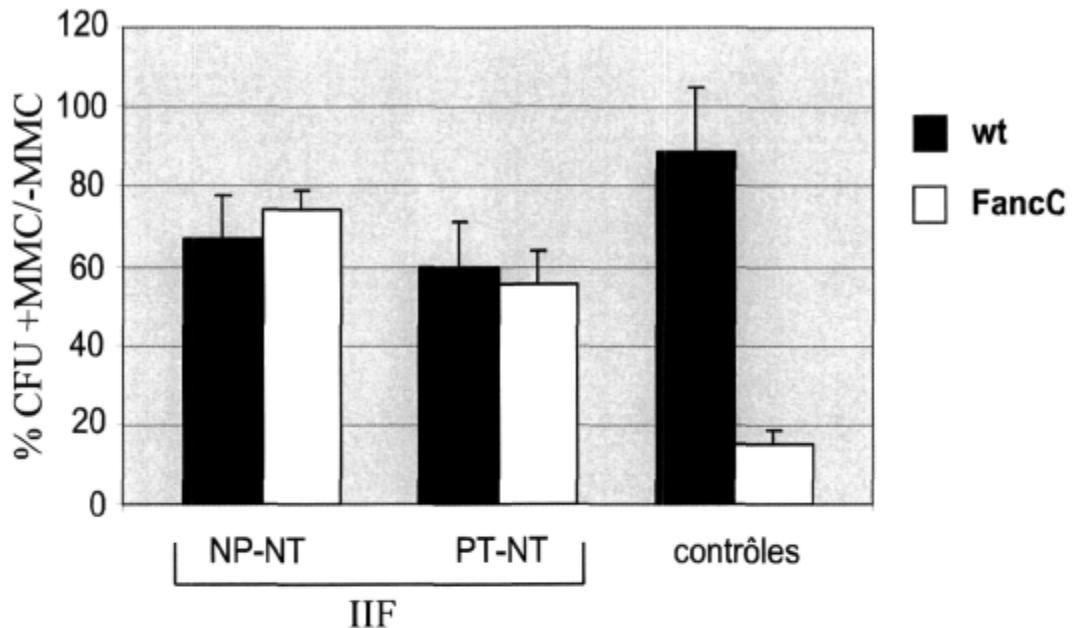
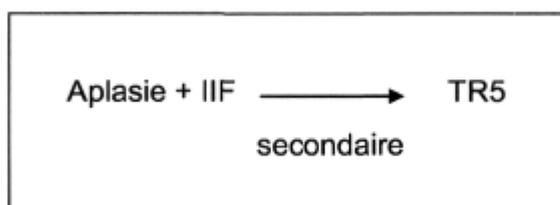


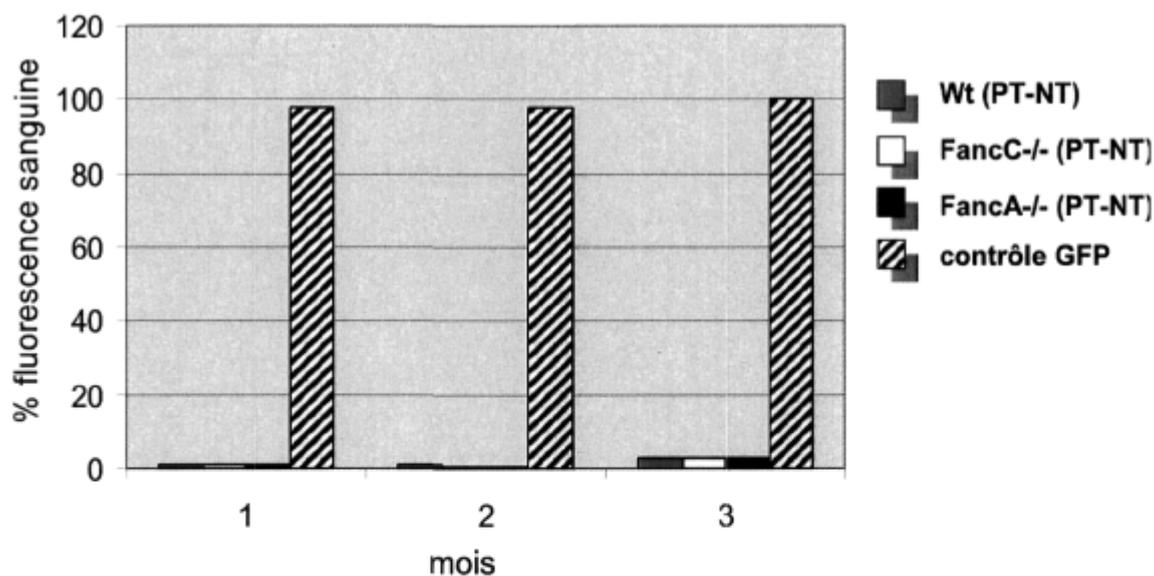
Figure 42 : Test clonogénique des CSH médullaire de souris aplasiques

Test clonogénique sur les cellules de moelle totale selon les traitements pré et post-opératoires administrés aux souris. Chaque colonne est une moyenne de 6 à 12 valeurs, les animaux dans l'encadré IIF ont fait l'objet d'une chirurgie fémorale délivrant le transgène *FancC-EGFP*. Les animaux contrôle n'ont fait l'objet d'aucune expérimentation. +/- écart-type. *Abrév.* NP: non pré-traitée, PT: pré-traitée, NT: non traitée.

Si la fluorescence sanguine confirme l'expression du transgène, elle ne permet en revanche pas de déterminer la nature exacte des cellules qui l'expriment. L'exploration des conséquences à long terme, par le biais de transplantations secondaires s'avère donc d'autant plus nécessaire que le transgène ne peut plus être simplement suivi, dans le sang circulant. Ces procédures détermineront si les cellules LTR peuvent être atteintes en situation aplasique. La procédure expérimentale suivie est présentée au **tableau 9**.

Tableau 9 : Séquence expérimentale pour les CSH de souris (PT-T)*3-1-5 Transplantations secondaires**3-1-5-a Expression sanguine du transgène dans les souris secondaires*

Au 6ème mois, les souris (PT-NT) sont sacrifiées et leur moelle transplantée en série (TR5), dans des souris sauvages létalement irradiées (n = 23). L'expression sanguine du transgène est évaluée lors d'analyses sanguines en cytométrie de flux (**figure 43**).

**Figure 43 : Expression sanguine du transgène dans les souris secondaires**

Analyse par FACS de l'expression sanguine du transgène *FancC-EGFP*, chez les souris secondaires transplantées avec une moelle de souris IIF (PT-NT). Souris sauvages (n = 11), *FancA*^{-/-} (n = 12), *FancC*^{-/-} (n = 12). Les souris GFP servent de contrôle positif de fluorescence, +/- écart-type.

La prise de la greffe est confirmée par l'état des souris et la présence dans le sang circulant des receveuses de plus de 80 % de cellules de la donneuse primaire 45.2 (données non présentées). Ces deux points valident la capacité des CSH FancC^{-/-} (PT-NT) complémentées à régénérer *de novo* un processus hématopoïétique.

La correction semble atteindre les cellules dotées des capacités de prolifération et d'auto-renouvellement, y compris dans un contexte aplasique.

Bien que toutes les lignées soient retrouvées, dans des proportions normales dans la circulation de ces souris et à des niveaux comparables à ceux des sauvages; plus de 3 mois après la transplantation, aucune souris n'exprime de fluorescence sanguine.

Ces données sont d'autant plus importantes que les cellules médullaires transplantées exprimaient des niveaux de fluorescence qui laissaient supposer une expression chez les receveuses (**figure 41**).

3-2- Injection intra-fémorale et correction génique des souris aplasiques traitées

3-2-1 Expression médullaire du transgène dans les souris (PT-T)

D'autres expériences menées de façon conjointe sur une seconde cohorte de souris aplasique ont permis d'estimer les effets d'un traitement hebdomadaire de MMC (PT-T) (**figure 44**).

Dans cette cohorte, tous les animaux (PT-T) expriment le transgène dans le sang circulant, à hauteur de 5% chez les sauvages, 12 % chez les FancA^{-/-} et 16 % chez les FancC^{-/-}. Lorsque les profils sanguins des cohortes (PT-T) sont confrontés à ceux des (PT-NT), l'expression sanguine du transgène apparaît majorée de 2 fois chez les souris premières comparativement secondes.

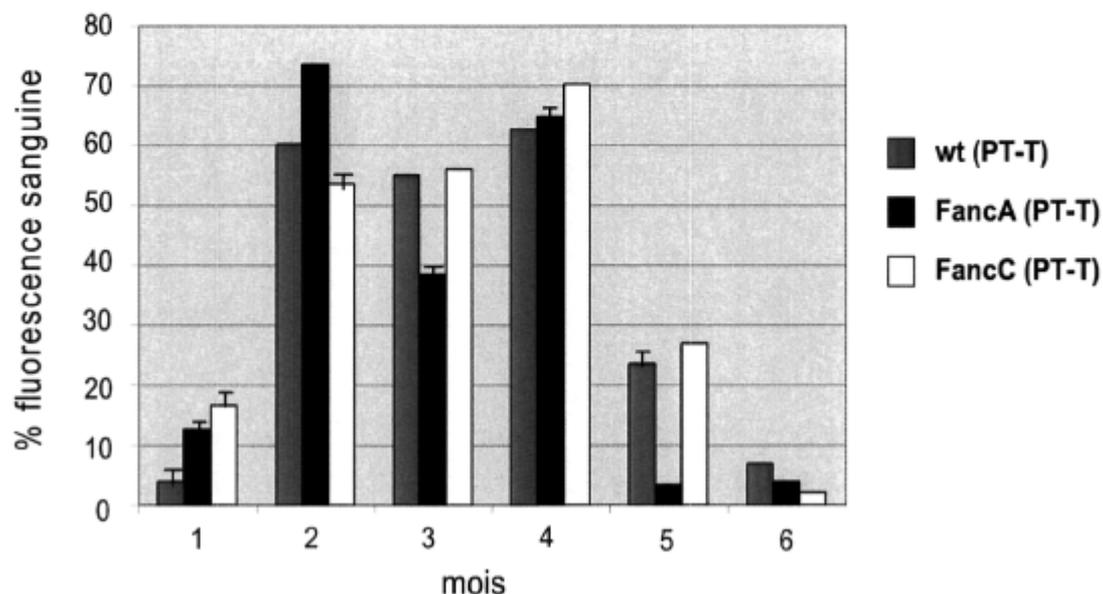


Figure 44 : Expression sanguine du transgène dans les souris aplasiques traitées

Analyses mensuelles par FACS de l'expression sanguine du transgène *FancC-EGFP*, dans les souris aplasiques traitées par des injections hebdomadaires de MMC (PT-T). Souris sauvages (n = 6), *FancA*^{-/-} (n = 4) et *FancC*^{-/-} (n = 6), +/- écart-type. Titre : 9×10^8 TU/mL

La comparaison des (PT-T) aux (NP-T) révèle cette fois une majoration de 3 à 4 fois des premières en regard des secondes, pour les mêmes périodes. Les souris (PT-T) atteignent un niveau maximal de fluorescence sanguine dès le 2^{ème} mois avec 60 % chez les wt, 73 % chez les *FancA*^{-/-} et 55 % chez les *FancC*^{-/-}. L'aplasie semble encore avoir un effet bénéfique, du moins les premiers temps, sur l'expression du transgène. Au quatrième mois, le bénéfice du traitement de sélection est annulé, les souris (PT-NT) expriment une fluorescence équivalente à celle des souris (PT-T).

Conformément aux résultats du chapitre II, les animaux sauvages et les $FancA^{-/-}$ (PT-NT) maintiennent l'expression du transgène *FancC-EGFP* dans des proportions parfois équivalentes à celles des $FancC^{-/-}$, et ce, hors de toute pression de sélection. Enfin, contrairement aux souris primaires, les taux de fluorescence dans les souris secondaires sont moins sujets à d'importantes variations et restent relativement constants au cours des 5 premiers mois.

Les travaux de McCauslin et *al.* avaient déjà fait mention d'un tel phénomène³¹⁷. Jusqu'alors, nous n'avons évalué les conséquences du double traitement (PT-T), que lors de procédures *in vitro*.

Parallèlement à l'examen des paramètres sanguins, une estimation de la survie des animaux (PT-T) est entreprise. Cette procédure vise non seulement à évaluer la fonctionnalité de la protéine transgénique *in vivo*, mais également à estimer les conséquences à long terme de la combinaison de traitements (PT-T) sur les souris Fanconi génétiquement corrigées.

3-2-1-a Survie des souris (PT-T)

La survie des souris aplasiques traitées à la MMC sur une base hebdomadaire est suivie sur une période de 15 semaines consécutives, afin d'évaluer la capacité de l'organisme génétiquement corrigé à résister aux dommages subcellulaires cumulés à l'état aplasique (**figure 45**). Une telle estimation a permis de dresser un tableau plus complet des conséquences induites par la double procédure aplasie médullaire et sélection à la MMC. Si en terme de fluorescence sanguine, l'expression du transgène finit par s'équivaloir, entre (PT-NT) et (PT-T). En revanche, au niveau de l'état général, les souris Fanconi sont nettement plus affectées lorsqu'un traitement de sélection chimique est associé à un état aplasique. Alors que les souris sauvages sont indifférentes à ces procédures, 100 % des souris $FancA^{-/-}$ sont mortes entre la 11^{ème} et la 15^{ème} semaine d'injection, des suites de ce traitement.

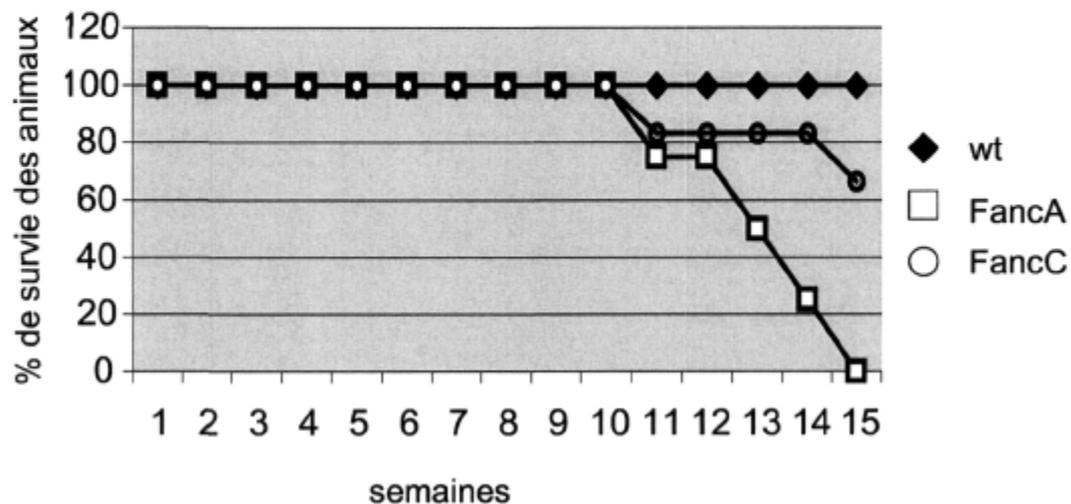


Figure 45 : Survie des animaux aplasiques traités à la MMC

La survie des animaux aplasiques traités par des injections hebdomadaires de MMC (PT-T) est examinée sur une période de 15 semaines consécutives. Souris sauvages (n =6), FancA^{-/-} (n = 4) et FancC^{-/-} (n =6).

Chez les souris aplasiques FancC^{-/-} la mortalité induite par le traitement est de 33 %. Dans tous les cas, les animaux Fanconi présentent une aplasie médullaire sévère réduisant de façon drastique les comptes sanguins de toutes les lignées cellulaires, conduisant à une mortalité certaine (donnée non présentée). En endommageant de façon définitive le stock de cellules souches, le traitement provoque de graves préjudices chez les Fanconi, qui ne peuvent survivre. Il est donc probable que le double traitement affecte les STR autant que les LTR

Il est cependant à préciser que la mortalité des souris FancC^{-/-} complémentées est inférieure à celle des FancA^{-/-} témoignant de quelques bénéfices conférés par la correction génique chez ces animaux.

Un défaut de coagulation a conduit à la perte de deux souris de la cohorte $FancC^{-/-}$ (PT-T), lors de prélèvements d'échantillons sanguins. Bien qu'aucune analyse des mégacaryocytaire n'est été effectuée, tout porte à croire qu'il s'agit d'une thrombocytopénie²⁷⁵, premier signe d'une aplasie médullaire. Après 15 semaines de traitements successifs, l'examen sanguin d'une souris $FancC^{-/-}$ (PT-T) révèle une élévation des taux de granulocytes et de monocytes sanguins, respectivement de 13 et 17 fois supérieures à la normale. Cet animal présentait tous les signes reliés au développement d'une pathologie maligne de type leucémie myéloïde aiguë (LMA) (**figure 46**).

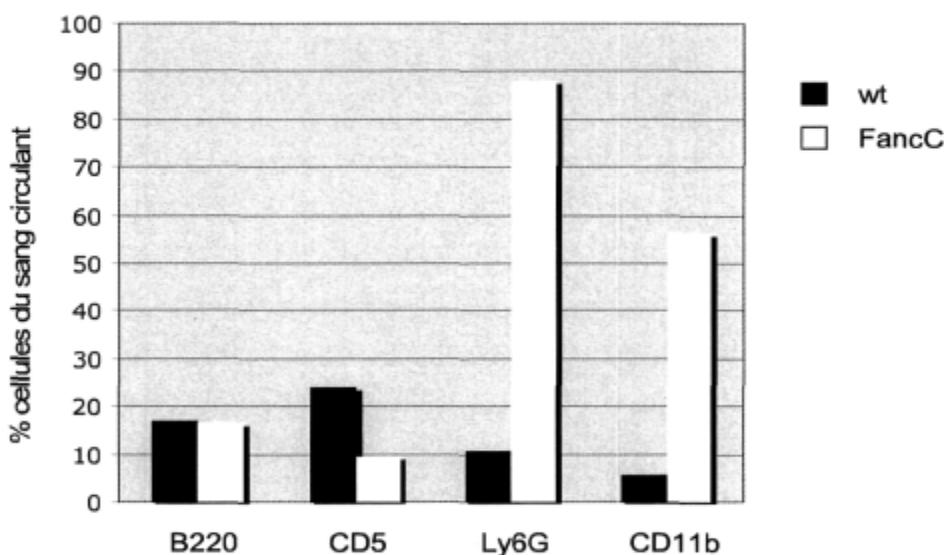


Figure 46 : Profil d'expression des lignées cellulaires dans une souris leucémique

Analyse par FACS du niveau sanguin des différentes lignées cellulaires, dans une souris contrôle et une souris aplasique traitée à la MMC (PT-T), pendant 15 semaines. Lymphocytes B (B220), lymphocytes T (CD5), granulocytes (Ly6G) et monocytes (CD11b).

Les analyses sanguines et médullaires de cet animal n'ont pas permis de retrouver l'expression de la fluorescence (données non présentées).

Des analyses plus approfondies des coupes histologiques sternales pourraient permettre de confirmer et d'illustrer cette prolifération aberrante. Résultante de l'aplasie médullaire, cette pathologie est rapportée dans 9 % des cas d'anémie de Fanconi³²³ et est associée à une aberration chromosomique (translocation 3q26-29)³²⁴.

Par ailleurs, un tel phénomène est d'autant plus possible, qu'il est démontré qu'en de rares occasions, une intégration aléatoire d'un vecteur viral peut conduire à une mutagenèse intentionnelle, événement déclencheur d'une leucémie myéloïde sévère, causée par une hématopoïèse anormale qui se déclare après transplantation dans des receveuses secondaires et devient létale dans les receveuses tertiaires³²⁵. Théoriquement les chances pour que l'activation d'un proto-oncogène ait lieu sont minces (10^{-7}). Pourtant, de récentes découvertes tendent à démontrer que l'intégration du VIH se produit préférentiellement dans les régions actives du génome, majorant le risque d'une mutagenèse intentionnelle si l'un des vecteurs lentiviraux s'intègre dans les mêmes sites que le VIH-1 sauvages³²⁶. De plus, les vecteurs lentiviraux sont capables de multiples intégrations dans les CSH, quand le titre viral (MOI) est élevé, l'inverse est également vérifié³²⁷, ce qui contribue à maximiser encore les risques théoriques.

3-2-3 Expression médullaire du transgène

Comme pour les expériences précédentes, la fluorescence tend à disparaître au-delà du 5^{ème} mois, chez toutes les souris primaires. Lorsque ces animaux sont sacrifiés au 6^{ème} mois, aucune fluorescence n'est retrouvée dans les cellules résidentes de la moelle, indépendamment des génotypes des souris (FancC^{-/-} ou sauvages).

Cette observation corrélée à la disparition de fluorescence sanguine semble indiquer une perte partielle ou totale du transgène ou une dégradation de sa partie *EGFP*. Afin de fournir une preuve de l'occurrence du transgène et de la fonctionnalité de la protéine transgénique, des tests clonogéniques sont réalisés sur les cellules de moelle totale.

3-2-4 Test clonogénique des CSH (PT-T)

Une fraction des cellules de moelle totale des souris (PT-T) est placée en culture, dans un milieu semi-solide supplémenté de MMC (**figure 47**).

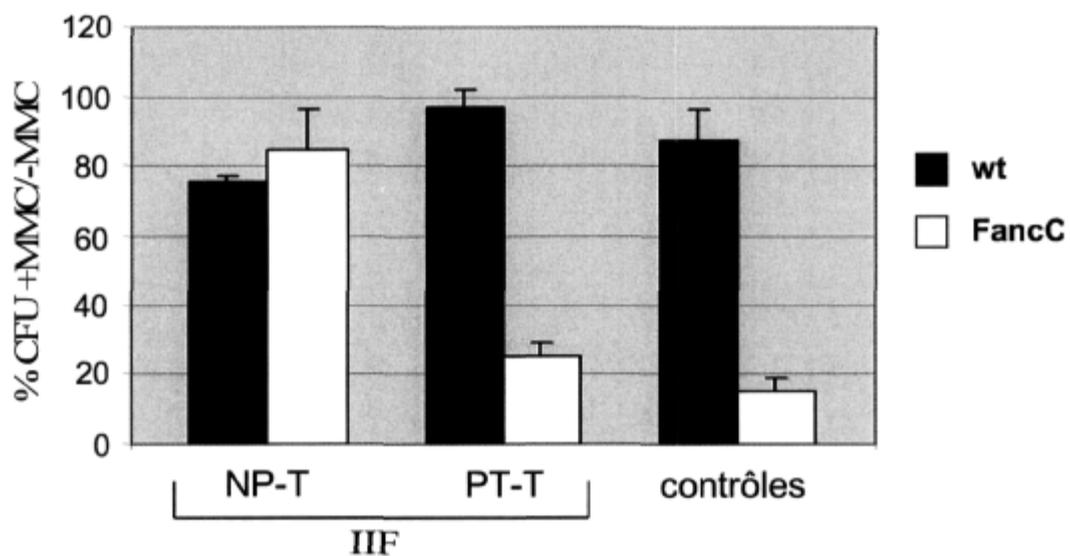


Figure 47 : Test clonogénique de cellules de moelle totale de souris (PT-T)

Test clonogénique sur les cellules de moelle totale selon les traitements pré et post-opératoires administrés aux souris. Les animaux dans l'encadré IIF ont fait l'objet d'une chirurgie fémorale délivrant le transgène *FancC-EGFP*. Les animaux contrôle n'ont fait l'objet d'aucune expérimentation. Chaque colone est une moyenne de 6 à 12 valeurs, +/- écart-type. *Abrév.* NP: non pré-traitée, PT: pré-traitée, NT: non traitée.

Ces tests vont ainsi déterminer si l'arrêt de l'expression de la fluorescence chez les souris aplasiques primaires est lié à la perte complète et définitive du transgène *FancC-EGFP*.

L'analyse comparative de CFU constituées par les cellules progénitrices de souris complémentées *FancC^{-/-}* (NP-T) et *FancC^{-/-}* (PT-T), révèle que l'aplasie associée à la pression de sélection fait perdre à ces animaux tout bénéfice de la correction génique.

Le test clonogénique valide ainsi les observations faites antérieurement aux transplantations. Pour les CSH sauvages, les combinaisons (PT-NT) et (PT-T) n'affectent nullement la capacité de survie, de prolifération et de différenciation des cellules. Les transplantations de telles cellules n'engendrent aucune conséquence néfaste chez les receveuses. En revanche, lorsqu'on se transpose dans un contexte Fanconi, il apparaît que les cellules progéniteurs *FancC^{-/-}* sont extrêmement sensibles à l'association des deux stratégies (PT-T). Alors que la capacité clonogénique est de 60% chez les souris *FancC^{-/-}* (PT-NT), de 12 % chez les (PT-NT), elle passe à moins de 25% dans le cadre d'une association (PT-T), soit un niveau comparable à celui des souris contrôles *FancC^{-/-}* (< 23%). En dépit d'une correction génotypique établie, les Fanconi exposées à une telle combinaison perdent tout bénéfice de la thérapie génique. *In vitro*, elle se traduit par une incapacité des cellules progénitrices médullaires à proliférer, se différencier et survivre, en présence de MMC. Ce qui conforte les données obtenues *in vivo* et illustrées par la courbe de survie (**figure 45**), le double traitement nuit à la survie des souris primaires en annihilant les réserves de LTR.

En revanche, la réversion de la sensibilité à la MMC et l'expression de comptes sanguins normaux suggèrent que la combinaison (PT-T) est peu nuisible à court terme, mais stable à long terme. Il est alors possible d'évoquer non seulement l'atteinte des cellules STR, des progénitrices, mais également celle des cellules responsables du fonctionnement hématopoïétique à plus long terme, les LTR (cellules souches).

3-2-5 Examen des coupes histologiques de sternum de souris (PT-NT) et (PT-T)

Les taux de mortalité des souris Fanconi aplasiques traitées à la MMC, contrastent non seulement avec ceux obtenus chez les souris sauvages (PT-T). Mais surtout avec ceux des souris Fanconi aplasiques non traitées (PT-NT) lesquelles ont toutes survécu, sans qu'aucun désordre clinique ne soit rapporté. Au 6^{ème} mois, l'examen des coupes histologiques des animaux aplasiques illustrent les conséquences du traitement de sélection qui module l'environnement médullaire de façon plus importante dans un contexte aplasique (**figure 48**).

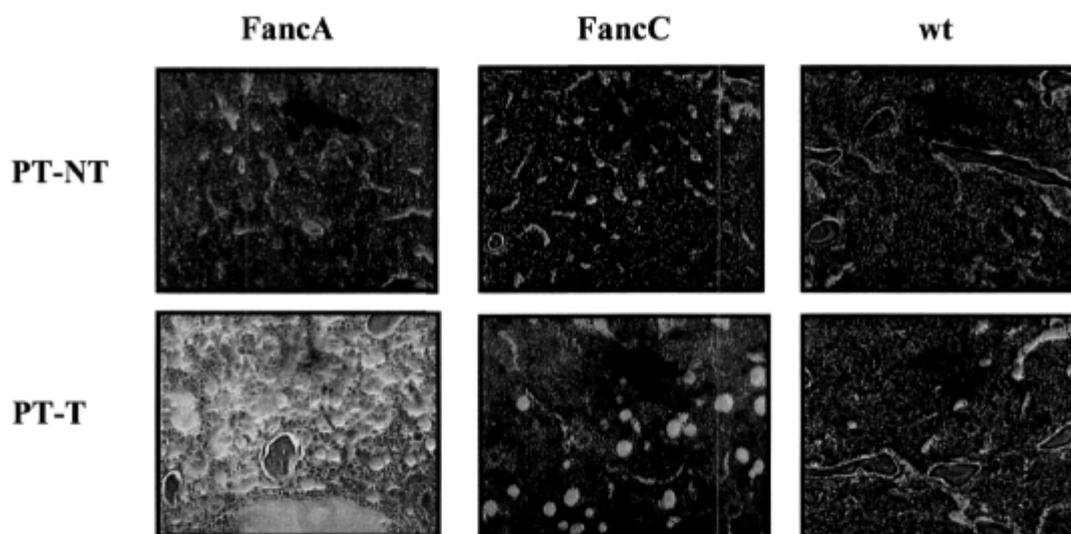


Figure 48 : Coupes histologiques du sternum de souris primaires

Aspect du tissu sternal de souris primaires IIF issues des cohortes (PT-NT) et (PT-T). Les prélèvements sont effectués au 6^{ème} mois et après 15 semaines de traitement à la MMC pour les animaux (PT-T). Images représentatives de chaque groupe. Les tissus sont colorés à l'hématoxyline-éosine, grossissement x20. *Abrév.* PT: pré-traitée, NT: non traitée, T: traitée.

Quelle que soit leur appartenance génotypique, la moelle de toutes les souris (PT-NT) est comparable à celle des sauvages. La moelle des souris $FancA^{-/-}$ (PT-NT) présente des signes modérés d'atrophie, qui ne sont toutefois pas suffisants pour affecter la survie des animaux.

L'examen histologique des coupes d'animaux Fanconi (PT-T) témoigne de l'effet induit par un traitement combinant aplasie et expositions répétées d'agent pontant. Les coupes sternales montrent clairement l'effet délétère du traitement hebdomadaire de MMC, sur les souris $FancA^{-/-}$ et plus modérément sur les $FancC^{-/-}$.

Les souris $FancA^{-/-}$ exposent une moelle déplétée, à la cellularité réduite, corrélée à la réduction des comptes cellulaires observés, lors des analyses sanguines. Les CSH ne sont plus en mesure de reconstituer la moelle, un état d'aplasie est avéré, condamnant à brève échéance l'animal, dont le décès est constaté dans les semaines suivantes.

Si les sections de moelle des souris sauvages et $FancC^{-/-}$ (PT-NT) étaient comparables, celles des animaux $FancC^{-/-}$ (PT-T) démontrent combien cette combinaison de traitement est préjudiciable à l'efficacité de l'IIF, en témoignant certaines zones à la cellularité réduite. Les conséquences sont certes moins flagrantes que pour les $FancA^{-/-}$, mais à terme elles conduiront aux mêmes résultats, soient une réduction des comptes sanguins et la mort de l'animal. Cette observation conforte l'hypothèse émise précédemment voulant que la combinaison (PT-T), annihile à long terme, les bienfaits de la correction génique. Ces effets impliquant à la fois les cellules progénitrices, mais possiblement les cellules plus primitives (LTR).

Une souris $FancC^{-/-}$ est morte consécutivement à l'apparition d'une aplasie médullaire massive associée à une altération quantitative des cellules de la trame médullaire (**figure 49**).

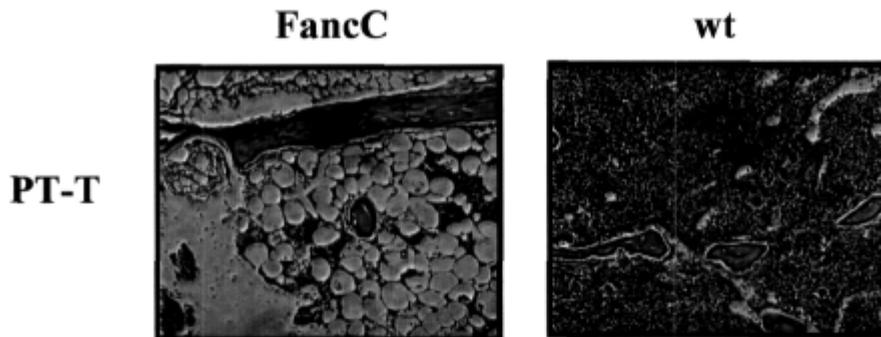


Figure 49 : Coupes histologiques du sternum d'une souris primaire non corrigée

Aspect du tissu sternal d'une souris primaire $FancC^{-/-}$ (PT-T) morte comparativement à celui d'une souris sauvages (PT-T), respectivement après 12 et 15 semaines d'injections de MMC. Les tissus sont colorés à l'hématoxyline-éosine, grossissement x 20. *Abrév.* PT: pré-traitée, NT: non traitée, T: traitée.

Cette raréfaction cellulaire secondaire au traitement séquentiel par l'agent pontant conduit à l'émergence d'une hypoplasie médullaire. Chez les animaux Fanconi y compris ceux qui sont complétés, le bénéfice du traitement est perdu, car la moelle déjà profondément affectée par la déplétion aplasique, ne répond plus aux continues demandes de régénération, exigées par le traitement hebdomadaire. Il est également envisageable que dans ces souris, la correction n'ait pas atteint les CSH ou un nombre suffisant d'entre elles. En raison du décès de cet animal, aucune procédure de transplantation n'a pu être réalisée. Pour confirmer la correction génique des cellules souches et les effets de la combinaison de traitements, des transplantations secondaires sont réalisées, en recourant la moelle totale des animaux (PT-T) survivants.

3-2-6 Transplantations secondaires de souris (PT-T)

3-2-6-a Survie post-transplantation secondaire à partir de CSH (PT-T)

Afin de démontrer la fonctionnalité du transgène et son intégration dans les cellules souches de la moelle, des transplantations secondaires sont réalisées, avec le concours de CSH de souris (PT-T) $FancC^{-/-}$ et sauvages (TR6). En raison de la forte mortalité, les souris $FancA^{-/-}$ (PT-T) primaires n'ont pu faire l'objet d'une telle procédure.

La partie précédente démontrait que l'aplasie seule n'interférait que modestement avec le processus de correction génique, en revanche, nous avons ici la confirmation des dangereuses complications résultant de l'association (PT-T). Au 6ème mois, la moelle osseuse des souris primaire est prélevée et transplantée en série dans des souris sauvages létalement irradiées. La survie des receveuses secondaires sauvages est examinée, les quinze premiers jours post-transplantation, suivant qu'elles aient reçu la moelle de souris sauvages ou $FancC^{-/-}$ (PT-T) (**figure 50**).

Tous les animaux ($n = 6$) ayant reçu une greffe médullaire en provenance de la souris $FancC^{-/-}$ (PT-T) sont morts dans un délai de 7 à 10 jours après la transplantation (TR6). Il apparaît que cette combinaison de traitements a également un effet dévastateur sur les LTR de souris complémentées $FancC^{-/-}$, avec un taux de mortalité de 100%, pour les animaux faisant usage de ces cellules, lors d'une transplantation.

À l'échelle de l'organisme aplasique, les injections séquentielles de MMC, empêchent la correction et se traduisent par une mortalité massive des souris primaires, signifiant l'atteinte des CSH en charge de la reconstitution rapide (STR). Alors que la mortalité des souris secondaires, dans un délai inférieur à 12 jours renforce l'idée d'une atteinte des CSH responsables de la reconstitution rapide de long terme (LTR).

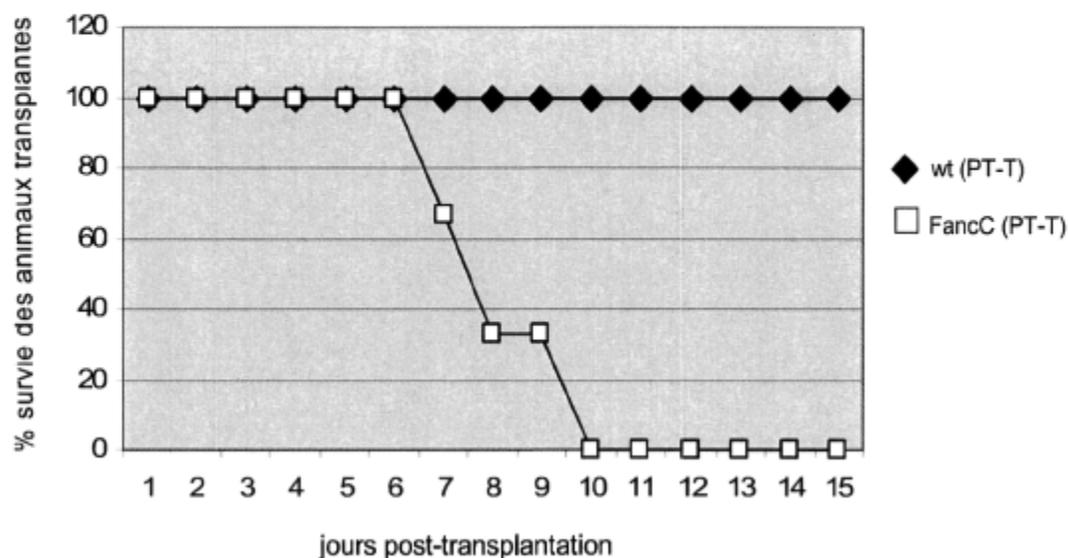


Figure 50 : Survie post-transplantation des souris receveuses d'une moelle (PT-T)

Analyse de la survie post-transplantation des souris secondaires selon qu'elles aient reçu la moelle totale de donneuses (PT-T) sauvages (n = 5) ou *FancC*^{-/-} (n = 6).

Abrév. PT: pré-traitée, T: traitée.

3-2-6-b Expression sanguine du transgène dans les souris secondaires

Les analyses sanguines sont réalisées sur des animaux ayant survécu à la procédure de transplantation TR6, soient exclusivement sur les animaux sauvages (**figure 51**).

Ces dosages n'ont pas permis de retrouver l'expression du transgène à des niveaux probants dans les souris secondaires. Pourtant les cellules du sang circulant des souris secondaires sont constituées à plus de 90 % de cellules de la donneuse primaire 45.2. L'absence de fluorescence n'est donc pas liée à une disparition des cellules de la donneuse, mais bel et bien à une altération de la portion *EGFP* du transgène.

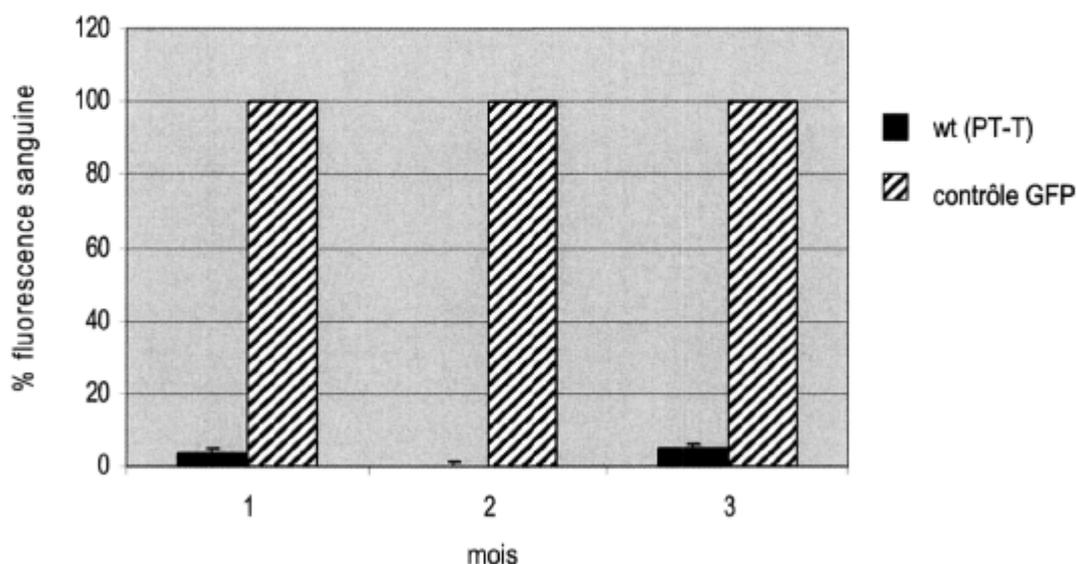


Figure 51 : Analyse sanguine des souris secondaires

Analyse par FACS de l'expression sanguine du transgène *FancC-EGFP*, chez les animaux secondaires ($n = 6$), receveuses d'une moelle de souris sauvages (PT-T), (\pm écart-type). *Abrév.* PT: pré-traitée, T: traitée.

3-2-6-c Expression de la protéine transgénique

Des analyses protéiques sont effectuées à partir d'une fraction des CSH non transplantées, issues des diverses souris primaires, *FancC*^{-/-} et sauvages, traitées ou non à la MMC. L'anticorps dirigé contre la forme murine de la protéine FANCC n'étant pas disponible, les analyses par immunobuvardage ont fait appel à un anticorps dirigé contre la séquence EGFP de la protéine transgénique (90 kDa). L'immunobuvardage reproduit à deux reprises sur plusieurs souris de chacun des groupes mentionnés a permis de constater la présence de la protéine transgénique FANCC-EGFP, dans les CSH médullaires de souris pré-traitées (**figure 52**).

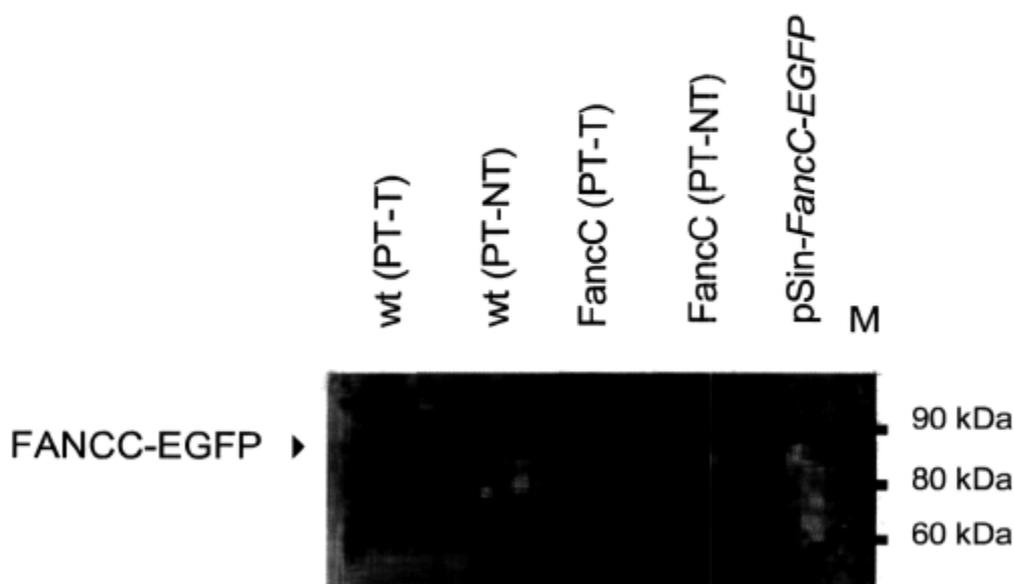


Figure 52 : Expression de la protéine transgénique dans les souris (PT)

Analyse par immunobuvardage de l'expression protéique de FANCC-EGFP, dans les cellules médullaires des souris (PT-T) et (PT-NT). Volume déposé de 10^6 cellules/20 μ L. Extrait protéique de 293T transfectées avec le plasmide pSin-FancC-EGFP contrôle positif, M: marqueur de poids moléculaire. Sondage primaire α -souris GFP (1/500), secondaire α -souris (1/20 000). *Abrév.* PT: pré-traitée, NT: non traitée, T: traitée.

L'administration hebdomadaire de MMC se traduit par une augmentation de l'intensité de la bande à 90 kDa, mais également des bandes plus basses, lesquelles pourraient évoquer la présence d'autres isoformes de la protéine transgénique. Le profil d'expression de la protéine est modulé suivant le traitement (+/- MMC) que reçoivent les souris. Cette notion évoquée lors des analyses en cytométrie de flux, se trouve confirmée par les analyses protéiques.

Certaines bandes dans le cadran inférieur du gel, apparaissent de façon récurrente. Compte tenu de la spécificité de l'anticorps EGFP, il est probable que les bandes sont probablement le signe de modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation ou la glycosylation de la protéine transgénique. Elles peuvent également correspondre à des formes tronquées sur une région plus ou moins étendue de EGFP de la protéine transgénique, ce qui expliquerait la perte de fluorescence. Il est important de constater que les nombreuses isoformes protéiques étaient déjà présentes chez les souris primaires qui pourtant maintenaient l'expression de la fluorescence (**figure 52**). Il est possible qu'à long terme, la cellule ait trouvé plus avantageux de ne conserver que l'expression de certaines de ces isoformes au détriment de la protéine complète. L'expression préférentielle d'une protéine FANCC-EGFP délestée d'une région plus ou moins importante du segment EGFP est à évoquer. Ce point serait en conformité avec la théorie voulant que la partie EGFP est particulièrement encombrante pour une cellule qui pourrait alors chercher à s'en départir. Lorsque les analyses sont reproduites avec les CSH des souris secondaires (**figure 53**), l'expression de la protéine transgénique n'est plus retrouvée à la taille attendue. L'immunobuvardage révèle alors la présence de plusieurs isoformes, sans que la bande de 90 kDa ne soit retrouvée. En revanche, des bandes inférieures évoquées à la **figure 52**, sont retrouvées, confortant notre hypothèse d'une expression préférentielle d'une protéine FANCC-EGFP-tronquée. Cette éventualité expliquerait l'absence de fluorescence dans les échantillons sanguins et le maintien de la correction génique. Ces données sont confirmées à deux reprises, par le recours aux animaux de même génotype et ayant reçu les mêmes traitements.

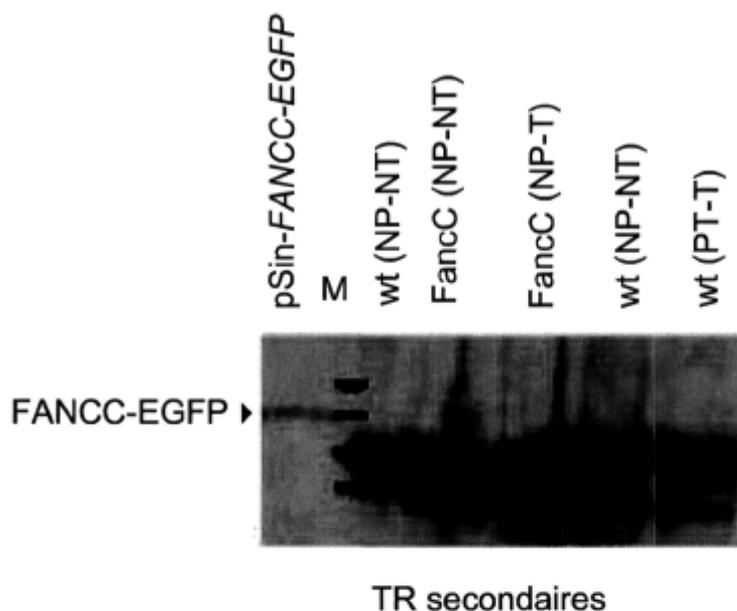


Figure 53 : Expression protéique transgénique dans les souris secondaires

Analyse par immunobuvardage de l'expression protéique de FANCC-EGFP, dans les cellules médullaires des souris secondaires, selon que la moelle qu'elles aient reçues soit issue de souris (NP-NT) sauvages ou *FancC*, de souris (NP-T) sauvages ou *FancC* ou encore de souris sauvages (PT-T). Volume déposé de 10^6 cellules/20 μ L. Extrait protéique de cellules 293T transfectées avec le plasmide pSin-*FancC*-EGFP contrôle positif, M: marqueur de poids moléculaire. Sondage primaire α -souris GFP (1/500), secondaire α -souris (1/20 000). Abrév. PT: pré-traitée, NT: non traitée, T: traitée.

Lorsque les mêmes échantillons font l'objet d'une étude au niveau de l'ARNm, l'expression de la portion *EGFP* est retrouvée tout autant que celle de la portion *FancC*, suggérant une modulation au niveau post-transcriptionnel (données non présentées).

4- Thérapie génique *in vivo* dans le modèle aplasique-Discussion

Les données obtenues au chapitre précédant se révélèrent particulièrement encourageantes, bien que leur condition de réalisation soit éloignée de la réalité clinique des patients. Les expériences ont donc fait l'objet d'une réévaluation sur des animaux $FancA^{-/-}$ et $FancC^{-/-}$ aplasiques après un pré-traitement à la MMC. Ce pré-traitement (PT) qui précède la chirurgie fémorale est suffisant pour mimer l'aplasie médullaire chez les souris Fanconi, en revanche, il est sans conséquence sur les souris sauvages^{1,291}.

Dans un tel contexte, il apparaît que les comptes sanguins sont normaux et l'expression de la fluorescence est maintenue, dans toutes les lignées cellulaires circulantes à des niveaux constants, quel que soit le groupe génotypique, et ce pendant plus de 5 mois. Les niveaux de fluorescence sont très élevés et frôlent les 80 %, rejoignant les valeurs obtenues sur des CSH humaines (91%) par le groupe du Dr Karlsson, dont les travaux ont également utilisé des vecteurs lentiviraux de troisième génération³²⁸. Ces données suggèrent une intégration stable du transgène, dans le génome de cellules primitives, capables de prolifération à court terme ($CD34^+$) et à long terme ($CD34^-$).

À l'exception d'une majoration du pourcentage de fluorescence les trois premiers mois, qui pourrait être autant attribuable au titre viral qu'à l'état aplasique; aucune différence significative n'a été observée entre les souris (PT) et celles qui ne l'étaient pas (NP). Ce qui laissait supposer une efficacité équivalente de l'IIF, indépendamment du statut médullaire. Cependant, l'examen de l'effet d'un traitement à la MMC sur les animaux aplasiques (PT-T) est plus inquiétant. La majorité des animaux Fanconi (PT-T) sont morts d'une aplasie médullaire dû à plusieurs semaines de traitement de sélection à la MMC. Les transplantations secondaires et les tests clostrogéniques ont démontré que les animaux secondaires receveurs d'une moelle pré-traitée (PT) ne semblaient pas plus souffrir d'un défaut de correction, que leurs homologues non aplasiques (NP).

En revanche, dans les $FancC^{-/-}$, la combinaison (PT-T) représente un cadre défavorable à l'exercice d'une transplantation secondaire, qui devient létale pour les receveuses. La surstimulation médullaire engendrée par l'association (PT-T) épuise très certainement les réserves de STR et de LTR, empêchant la reconstitution à court terme dans les souris primaires et à long terme dans les souris secondaires. Ces données sont confirmées par les tests clonogéniques, en présence de MMC, au cours desquels les CSH de souris $FancC^{-/-}$ (PT-T), présentent un profil d'expression qui s'apparente plus à celui des souris nullizygotés utilisées comme contrôles négatifs, qu'à celui des cellules sauvages. Ces dernières données ne sont pas complètement négatives pour les patients Fanconi, puisque d'une part, la correction phénotypique, bien qu'amointrie, est maintenue dans un contexte aplasique. D'autre part, le fait de ne pas recourir à une étape de sélection chimique ne représente pas un défaut majeur en soi, les expériences de transplantations du chapitre II et celles utilisant les cellules (PT-NT) ayant démontré que l'environnement médullaire est capable d'exercer *in situ*, sa propre pression de sélection. Les données sont confirmées au niveau clinique puisqu'il est rapporté ayant quelques rares cas, les patients Fanconi peuvent présenter une réversion génétique associée avec une amélioration des fonctions hématopoïétiques^{64,329}. *In vivo*, les CSH humaines corrigées ont un avantage prolifératif qui leur permet à terme de reconstituer progressivement une moelle fonctionnelle. Ces données sont les résultats de plusieurs expériences différentes, qui ont recouru à l'utilisation de plusieurs surnageants différents et de tout autant de souris. Il est donc permis au vu de l'ensemble de ces variables de conclure que cette thérapie est effective dans le modèle murin.

Pour ce qui a trait à la disparition de la fluorescence sanguine et médullaire les mêmes hypothèses que celles émises au chapitre II ont été formulées. En conformité avec les données évoquées, le choix du marqueur GFP est une solution intéressante qui permet une quantification directe du pourcentage de cellules transduites autant que du niveau d'expression du transgène dans chaque cellule. Mais dans le contexte Fanconi, un tel traceur n'est nullement indispensable, puisqu'il est possible de sélectionner les cellules transduites sur la base d'une résistance acquise.

5- Thérapie génique *in vivo* dans le modèle aplasique-Conclusion

Les CSH sont l'exemple le plus classique et le mieux étudié de cellules souches adultes, leur incroyable potentiel d'auto-renouvellement et leurs exceptionnelles capacités prolifératives, les rendent capables de générer une grande variété de types cellulaires aux fonctions diverses. Ces principales propriétés suffisent à comprendre l'engouement qui entoure leur usage, dans un cadre médical. Elles constituent les cibles idéales à l'introduction permanente de gènes dans l'organisme, en fournissant toute la vie durant l'expression du transgène. De fait, elles représentent un outil thérapeutique fantastique pour le traitement d'une grande variété de maladies immunes^{330,331} et hématologiques³³², qu'elles soient acquises ou congénitales³³³. Plusieurs caractéristiques de l'AF la rendent admissible à la correction par thérapie génique: l'absence de traitement, implication d'un gène unique et l'avantage sélectif *in vivo* des CSH corrigées^{329,334}.

En dépit d'évidents atouts de l'approche corrective par un transfert *in vitro*, une telle stratégie reste un procédé aussi délicat que périlleux, notamment en raison d'une faible proportion des CSH chez les patients souvent en état d'aplasie avancée, d'une fragilité, de la perte des capacités d'auto-renouvellement et de prolifération des CSH et de l'augmentation du processus apoptotique, après un séjour *in vitro*^{129,276}. Les patients sont d'autant plus difficiles à traiter par thérapie génique conventionnelle que l'état hypoplasique de leur moelle ne leur permet pas de disposer d'un nombre suffisant de CSH et de progéniteurs^{193,296}. Dans ces conditions, il est courant que les patients Fanconi expriment des niveaux dramatiquement bas de cellules CD34⁺, avec dans certains cas une réduction de 90 à 99 % par rapport à la normale. Par ailleurs, ces cellules n'obéissent pas aux mêmes règles que celles des personnes non malades, elles ne répondent notamment pas aux signaux de mobilisation sanguine (G-CSF).

Les attentes décevantes entourant l'usage des vecteurs viraux en clinique, ajoutent à la difficulté et expliquent que la procédure n'ait pas fourni les résultats escomptés^{196,335,336}. À l'ensemble de ces facteurs limitant ajoutons que la correction génique *in vitro* reste tributaire de la purification des CSH. En effet, si la correction *ex vivo* cible une population choisie, toute la subtilité réside, dans la capacité à purifier convenablement les CSH, de façon à exclure d'autres cellules plus différenciées ou plus primitives, car non identifiables. Toutes ces limitations freinent le recours aux CSH Fanconi, dans les procédures de greffes autologues, compromettent le transfert de gènes à visée thérapeutique et s'opposent à la création de banques de cellules souches primaires purifiées, disponibles à la demande, telles qu'elles peuvent exister pour d'autres catégories de cellules souches. En définitive, la complémentation *in vitro* ne semble donc pas convenir au contexte clinique Fanconi. Seul un transfert génique *in vivo* permettrait de se départir des toutes ces contraintes, tout en garantissant une efficacité de correction minimale. L'efficacité de l'IIF est améliorée par la non-manipulation des CSH, par l'action ciblée des particules virales, dans un environnement natif et par le maintien d'un système immunitaire complet.

Cette étude démontre les potentialités d'une nouvelle approche de transfert génique *in situ*, dont l'usage pourrait avoir un impact significatif dans le traitement de nombreuses pathologies. L'IIF représente une stratégie novatrice qui facilite l'accès à une grande variété de CSH présent dans la cavité médullaire et abolit les difficultés rencontrées lors d'un transfert génique par culture *in vitro*³³⁷. Cette procédure concourt au maintien des propriétés fonctionnelles des CSH. Enfin, elle n'implique aucune stimulation par les cytokines, qui pourrait activer des voies de signalisation non désirées et potentiellement représenter un risque de mutagenèse intertionnelle.

Dans un souci d'analogie avec la forme humaine, la correction *in vivo* est reproduite sur les animaux ayant fait l'objet d'un traitement aplasiant. Ces animaux expriment le transgène a des niveaux importants dans le sang et la moelle. Transplantées à des receveuses secondaires, la moelle osseuse des souris primaires s'avère capable de reconstitution un processus hématopoïétique complet et durable assurant la survie des animaux. L'expression du transgène dans les souris secondaires confirme que la modification génétique a atteint des cellules en charge de la reconstitution de long terme, des précurseurs aux cellules souches. Cette correction génique se maintient sur plusieurs générations cellulaires, dans un cadre de multi-différenciation et de maturation, sans que le contexte aplasique ne paraisse en réduire l'efficacité.

En revanche, le statut aplasique de la moelle nuit à l'étape de sélection au moyen de la MMC qui à long terme devient létale pour les animaux Fanconi, même corrigés. L'action conjuguée de ces deux traitements (aplasie et MMC) conduit à un épuisement médullaire. La pression de sélection agressive exercée par l'agent chimique, ne laisse pas le temps aux souris de reconstituer leurs réserves de CSH. Il apparaît que le traitement de sélection n'est aucunement nécessaire, puisque la moelle en est également capable. Cette pression de sélection produite naturellement par l'environnement médullaire est certes plus lente, mais sans préjudice pour la survie.

Il apparaît ici très clairement qu'en dépit du contexte aplasique, les avantages de l'IIF sont maintenus. Les animaux peuvent se prévaloir des avantages dispensés par une correction génique *in situ* par IIF, permettant d'envisager cette stratégie comme une nouvelle approche clinique pour les patients Fanconi. En revanche, l'association (PT-T) est à proscrire dans un contexte clinique. Cependant, le succès clinique d'une telle procédure reste néanmoins tributaire non seulement du titre viral, mais plus encore d'une intervention précoce et donc d'un diagnostic rapide, afin que le stock de CSH soit suffisant pour permettre une correction génique.

La thérapie génique hématopoïétique revêt un potentiel médical d'autant plus attractif que le nombre de maladies hématologiques pourraient à l'avenir être traitées par l'expression de gènes sauvages dans les CSH. De plus, certaines données expérimentales, notamment celles relatives à la migration des cellules médullaires permettent d'envisager corriger d'autres maladies génétiques en procédant par transduction intra-fémorale. En effet, la migration des cellules médullaires à travers et vers d'autres organes, au sein desquels elles peuvent être séquestrées, leur permettraient de participer à une correction locale. La capacité de traverser l'organisme dans son entier, permet d'espérer la correction de nombreux déficits via la production locale de la protéine ou de l'enzyme manquante susceptible de guérir les défauts spécifiques à chaque organe. Par ailleurs compte tenu du fait que certaines cellules de la moelle osseuse participent également à la constitution de certains organes comme le foie^{338,339} ou les muscles³⁴⁰, plusieurs portes thérapeutiques sont ouvertes.

Mais la moelle osseuse et ses précieuses CSH sont loin de constituer une nouvelle caverne d'Ali Baba. Tout comme les cellules somatiques de mammifères ont une capacité d'expansion limitée, il est probable qu'il existe un certain nombre de divisions cellulaires au-delà desquelles les CSH ne peuvent aller contre la sénescence³⁴¹.

En dépit de l'indiscutable succès des CSH, dans certaines de thérapies humaines (troubles métaboliques³⁴²), rares sont les patients qui peuvent aujourd'hui, réellement s'en prévaloir. Les principales restrictions particulièrement dans le cas de l'AF, sont essentiellement liées à la barrière immunologique, dans les cas de greffes allogéniques, à la pathologie elle-même et surtout à la difficulté d'accroître le nombre de CSH sans qu'elles ne perdent leurs potentiels.

Par ailleurs, le recours aux vecteurs viraux, indispensable aux procédures de correction génique est vivement controversé. Le problème majeur réside dans l'acceptabilité de tels vecteurs, comme agents thérapeutiques. Si de nombreuses expériences démontrent leur supériorité pour le transfert génique dans les CSH, leur utilisation chez l'Homme soulève des problèmes de sécurité. Bien que la possibilité d'obtenir, lors de la préparation et de l'utilisation, la formation accidentelle de particules virales infectieuses soit exclue, Inquiétudes que tentent de dissiper les nouvelles générations de lentivirus²³⁸.

Les dangers qu'ils représentent et les perturbations qu'ils peuvent engendrer sur le fonctionnement d'un organisme fragilisé sont discutables. Délivrer de façon efficace un gène dans des CSH qui ne se divisent pas constitue l'étape majeure, dans le cadre d'une thérapie génique chez les humains en général. Cette difficulté est exacerbée par les caractéristiques des CSH des patients Fanconi dont la fragilité limite la prolifération et la différenciation *in vitro* et surtout les rend réfractaires à toute forme de transduction par des vecteurs rétroviraux³⁴³.

CHAPITRE VI

PERSPECTIVES

À ce stade de l'expérimentation, il serait intéressant de chercher à déterminer plus avant la nature exactes des clones présents dans chaque animal et dans différentes régions anatomiques (*fémurs, sternum, rate, thymus*). Certains clones obtenus après transduction médullaire pourraient avoir préférentiellement proliféré avant ou après une dispersion. La réalisation d'expériences de Southern Blot permettra de confirmer l'intégration du transgène et de démontrer le maintien ou la disparition de la portion EGFP. Un nombre limité de bandes pourrait être observé et pourrait indiquer la présence préférentielle d'un petit nombre de clones. Il pourrait également être question d'une intégration du vecteur dans un nombre fini de sites, possiblement des points chauds de recombinaison ou *hot spots*³⁴⁴, ce qui concourrait à expliquer une perte éventuelle de la partie EGFP du transgène. Il faut également garder présent à l'esprit que la présence de séquences extra-chromosomiques de vecteurs pourrait favoriser les réarrangements impromptus, d'une manière qui reste encore à déterminer. Mais des expériences de FISH pourront définitivement confirmer l'intégration du vecteur dans les chromatides sœurs des CSH et exclure toute participation d'une construction épisomale.

La technique et les résultats obtenus sont novateurs et prometteurs, dans le contexte Fanconi, mais avant d'envisager de passer à l'étape des essais cliniques, plusieurs interrogations doivent être résolues. Au premier chef desquelles figure l'utilisation de vecteurs lentiviraux. S'ils permettent d'induire une correction génique efficace sans altérer la pluripotentialité, les capacités d'auto-renouvellement et de lignage spécifique des CSH, ils ne sont actuellement pas admis dans les protocoles cliniques, notamment en raison des risques oncogéniques^{252,345}.

L'innocuité de telles constructions reste donc à confirmer, avant qu'ils ne puissent faire l'objet d'une utilisation clinique. Pourrait-on reproduire ces résultats avec des vecteurs plus propices à l'usage clinique³⁴⁶ ? Certains suggèrent le recours à un nouvel outil viral, le EIAV ou *equine infectious anemia virus*^{272,347}, qui conjugue l'efficacité des vecteurs dérivés de VIH-1, sans les risques, la forme sauvage du EIAV étant inoffensive et ne déclenchant aucune pathologie³⁴⁸.

Un autre obstacle expliquant les difficultés des tentatives de correction génique repose sur les variations liées au modèle. L'efficacité de transduction lentivirale est sévèrement limitée en raison de l'extrême inefficacité à transduire les CSH humaines. Cependant, compte tenu des différences qui peuvent exister entre la forme murine et humaine de l'AF, il paraît important de s'interroger sur la capacité à corriger les CSH humaines par IIF. La transduction de CSH murines *in vivo* reste plus aisée que la transduction des CSH humaines *in vitro*. Cette dernière étant elle-même plus facile que la transduction de CSH humaines *in vivo*.

Bien que plusieurs études aient déjà fait mention de résultats prometteurs chez la souris^{335,336}, passés à l'homme, les résultats ont rarement été à la hauteur¹⁹⁶. Par ailleurs, en clinique, des expériences de thérapie génique rétrovirale n'ont pas permis véritablement attribuer un avantage aux cellules corrigées, en absence d'une pression de sélection¹⁹⁹.

La prochaine étape clé, pourrait utiliser les cellules de patients Fanconi xenotransplantées, dans un organisme murin, pour que soit évaluée la capacité de l'IIF à cibler les CSH humaines.

Dans le processus d'évaluation pré-clinique de la thérapie génique, plusieurs autres questions essentielles doivent être posées, en particulier de savoir si seul le tissu ciblé, en l'occurrence la moelle osseuse, sera affecté. Une expression éparses du transgène représenterait un atout thérapeutique pour certaines pathologies, notamment celles dues à un défaut d'expression protéique (dystrophie musculaire), enzymatique (maladie de Gaucher, méthémoglobinémie) ou hormonale (Shwachman-Diamond syndrome).

Par ailleurs, une telle stratégie pourrait se prévaloir de la plasticité dont disposent les CSH leur permettant de se différencier en non-hématopoïétiques du foie³⁴⁹, du cœur³⁵⁰, des poumons, de l'intestin ou même de la peau³⁵¹. En effet, si la majorité des CSH sont résidentes de la moelle, plusieurs migrent vers d'autres niches de manière tissu-spécifique où elles peuvent se maintenir dans un état indifférencié et quiescent³⁵². Ces niches sont d'une importance cruciale dans la régulation de l'auto-renouvellement et dans le devenir cellulaire, tout autant qu'elles fournissent une source de cellules nécessaire à la vascularisation et à l'organogénèse^{351,353}. Les CSH sont ainsi incorporées dans d'autres organes ou expédiées dans des sites extra-médullaires, avant leur remise en circulation et un éventuel retour à la niche médullaire où elles contribueront à renouveler le stock de CSH³⁵⁰.

Les études de biodistribution du matériel injecté doivent rechercher la présence du transgène dans plusieurs tissus et principalement dans les gamètes³⁵⁴, afin que soit testée la transmission à la descendance et définis les lieux d'expression de la protéine. Cette probabilité paraît néanmoins peut vraisemblable, les lentivirus étant exclusivement reliés à un transfert horizontal et aucunement verticale, vers la lignée germinale.

L'analyse des excréta doit être poursuivie durant une période suffisante pour évaluer le risque de dissémination dans l'environnement. Le gène transféré va-t-il persister dans les cellules avec les avantages et les inconvénients potentiels que cela implique ?

Le programme génétique qui contrôle l'auto-renouvellement des CSH est encore faiblement documenté. Un processus incontrôlé de prolifération des CSH constitue une des bases du développement de cancers et l'identification des gènes spécifiques, spécialement ceux impliqués dans l'auto-renouvellement, est également une étape cruciale. L'implication conjointe de plusieurs familles de gènes et de facteurs a été brièvement abordée dans le contrôle de la croissance, la différenciation, la sénescence et l'apoptose, par des effets sur la transcription d'autres gènes.

Ces mécanismes étant tous affectés à des degrés divers dans la pathologie Fanconi, leur compréhension est un préalable à leur utilisation et pourrait expliquer les différences intergroupes de complémentation.

Il serait pertinent d'étudier le tableau de résistance aux autres drogues et aux cytokines pro-inflammatoires^{264,289}, ainsi que le profil génétique des animaux corrigés, les gènes qui étaient sous ou surexprimés retrouvent-ils un profil normal après la correction génique¹¹⁷ ? Recouvre-t-on la mono-ubiquitination de la protéine FANC-D2 ? Bien que fort probable compte tenu de la résistance aux lésions induites par la MMC, la démonstration n'en serait que plus élégante. Le retour de FANC-D2-L, soit FANC-D2 monoubiquitinée, pourrait se faire par immunobuvardage ou par immuno-fluorescence sur les cellules complémentées.

Ces voies sont d'autant plus importantes que les patients Fanconi peuvent présenter une réduction de la population CD34⁺ jusqu'à un facteur six comparativement aux adultes non malades. Dans ce contexte, il pourrait s'avérer particulièrement utile et pertinent de favoriser leur prolifération par le biais de voies cellulaires connexes telles HoxB4³⁵⁵, celles des polycombs³⁵⁶ ou de Wnt³⁵⁷.

De plus, il est connu que les cellules somatiques de mammifères ont une capacité d'expansion limitée à un certain nombre de divisions cellulaires au-delà desquelles elles ne peuvent lutter contre la sénescence³⁴¹. Les effets de l'âge sur les fonctions des CSH ont diversement été étudiés dans les modèles humains³⁵⁸ et murins³⁴⁷, cette composante semble particulièrement importante, dans les populations de CSH les plus primitives. Le vieillissement est responsable d'altérations dans la fonction des CSH chez la souris, observables lors des transplantations³⁵⁹.

BIBLIOGRAPHIE

1. Cheng NC, van de Vrugt HJ, van der Valk MA, et al. Mice with a targeted disruption of the Fanconi anemia homolog *Fanca*. *Hum Mol Genet*. 2000;9:1805-1811.
2. Ichihashi T, Naoe T, Ohno R. Atlas of blood disease on the internet. *Blood*. 1996;87:417-418.
3. Bagby GC, Lipton JM, Sloand EM, Schiffer CA. Marrow failure. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004:318-336.
4. Fanconi G. Familial constitutional panmyelocytopenia, Fanconi's anemia (F.A.). I. Clinical aspects. *Semin Hematol*. 1967;4:233-240.
5. Fanconi G, Bickel H. Not Available. *Helv Paediatr Acta*. 1949;4:359-396.
6. Kutler DI, Auerbach AD. Fanconi anemia in Ashkenazi Jews. *Fam Cancer*. 2004;3:241-248.
7. Tipping AJ, Pearson T, Morgan NV, et al. Molecular and genealogical evidence for a founder effect in Fanconi anemia families of the Afrikaner population of South Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:5734-5739.
8. Callen E, Casado JA, Tischkowitz MD, et al. A common founder mutation in *FANCA* underlies the world's highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain. *Blood*. 2005;105:1946-1949.
9. Butturini A, Gale RP, Verlander PC, Adler-Brecher B, Gillio AP, Auerbach AD. Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study. *Blood*. 1994;84:1650-1655.
10. Schroeder TM, Tilgen D, Kruger J, Vogel F. Formal genetics of Fanconi's anemia. *Hum Genet*. 1976;32:257-288.
11. Kutler DI, Singh B, Satagopan J, et al. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood*. 2003;101:1249-1256.
12. Seal S, Barfoot R, Jayatilake H, et al. Evaluation of Fanconi Anemia genes in familial breast cancer predisposition. *Cancer Res*. 2003;63:8596-8599.
13. Bakhshi S, Joenje H, Schindler D, et al. A case report of a patient with microcephaly, facial dysmorphism, mitomycin-c-sensitive lymphocytes, and susceptibility to lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006;164:168-171.
14. Wreesmann VB, Estilo C, Eisele DW, Singh B, Wang SJ. Downregulation of Fanconi anemia genes in sporadic head and neck squamous cell carcinoma. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2007;69:218-225.
15. Tremblay S, Pintor Dos Reis P, Bradley G, et al. Young patients with oral squamous cell carcinoma: study of the involvement of *GSTP1* and deregulation of the Fanconi anemia genes. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006;132:958-966.

16. Carvalho JP, Dias ML, Carvalho FM, Del Pilar Estevez Diz M, Petito JW. Squamous cell vulvar carcinoma associated with Fanconi's anemia: a case report. *Int J Gynecol Cancer*. 2002;12:220-222.
17. Rosenberg PS, Socie G, Alter BP, Gluckman E. Risk of head and neck squamous cell cancer and death in patients with Fanconi anemia who did and did not receive transplants. *Blood*. 2005;105:67-73.
18. Chernausek SD. Mendelian genetic causes of the short child born small for gestational age. *J Endocrinol Invest*. 2006;29:16-20.
19. De Kerviler E, Guermazi A, Zagdanski AM, Gluckman E, Frija J. The clinical and radiological features of Fanconi's anaemia. *Clin Radiol*. 2000;55:340-345.
20. Unal S, Gumruk F. Fanconi anemia patient with bilaterally hypoplastic scapula and unilateral winging associated with scoliosis and rib abnormality. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2006;28:616-617.
21. Taylor HC, Elbadawy EH. Renal tubular acidosis type 2 with Fanconi's syndrome, osteomalacia, osteoporosis, and secondary hyperaldosteronism in an adult consequent to vitamin D and calcium deficiency: effect of vitamin D and calcium citrate therapy. *Endocr Pract*. 2006;12:559-567.
22. Ruud E, Wesenberg F. Microcephalus, medulloblastoma and excessive toxicity from chemotherapy: an unusual presentation of Fanconi anaemia. *Acta Paediatr*. 2001;90:580-583.
23. de Araujo MR, de Oliveira Ribas M, Koubik AC, Mattioli T, de Lima AA, Franca BH. Fanconi's anemia: clinical and radiographic oral manifestations. *Oral Dis*. 2007;13:291-295.
24. Glanz A, Fraser FC. Spectrum of anomalies in Fanconi anaemia. *J Med Genet*. 1982;19:412-416.
25. Benninga MA, Lilien M, de Koning TJ, et al. Renal Fanconi syndrome with ultrastructural defects in lysinuric protein intolerance. *J Inherit Metab Dis*. 2007;30:402-403.
26. Evans DG, Rees HC, Spreadborough A, et al. Radial ray defects, renal ectopia, duodenal atresia and hydrocephalus: the extended spectrum for Fanconi anaemia. *Clin Dysmorphol*. 1994;3:200-206.
27. Norden AG, Lapsley M, Igarashi T, et al. Urinary megalin deficiency implicates abnormal tubular endocytic function in Fanconi syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:125-133.
28. Massa GG, Heinrichs C, Vamos E, Van Vliet G. Hypergonadotropic hypogonadism in a boy with Fanconi anemia with growth hormone deficiency and pituitary stalk interruption. *J Pediatr*. 2002;140:277.
29. Giri N, Batista DL, Alter BP, Stratakis CA. Endocrine Abnormalities in Patients with Fanconi Anemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007.
30. Pontoglio M, Barra J, Hadchouel M, et al. Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. *Cell*. 1996;84:575-585.
31. Wajnrajch MP, Gertner JM, Huma Z, et al. Evaluation of growth and hormonal status in patients referred to the International Fanconi Anemia Registry. *Pediatrics*. 2001;107:744-754.

32. Rolig RL, McKinnon PJ. Linking DNA damage and neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 2000;23:417-424.
33. Bagby GC, Jr. Genetic basis of Fanconi anemia. *Curr Opin Hematol.* 2003;10:68-76.
34. Lo Ten Foe JR, Rooimans MA, Bosnoyan-Collins L, et al. Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anaemia gene, FAA. *Nat Genet.* 1996;14:320-323.
35. Meetei AR, Levitus M, Xue Y, et al. X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nat Genet.* 2004;36:1219-1224.
36. Wevrick R, Clarke CA, Buchwald M. Cloning and analysis of the murine Fanconi anemia group C cDNA. *Hum Mol Genet.* 1993;2:655-662.
37. Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, et al. Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science.* 2002;297:606-609.
38. Timmers C, Taniguchi T, Hejna J, et al. Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. *Mol Cell.* 2001;7:241-248.
39. de Winter JP, Leveille F, van Berkel CG, et al. Isolation of a cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene. *Am J Hum Genet.* 2000;67:1306-1308.
40. de Winter JP, Rooimans MA, van Der Weel L, et al. The Fanconi anaemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. *Nat Genet.* 2000;24:15-16.
41. de Winter JP, Waisfisz Q, Rooimans MA, et al. The Fanconi anaemia group G gene FANCG is identical with XRCC9. *Nat Genet.* 1998;20:281-283.
42. Smogorzewska A, Matsuoka S, Vinciguerra P, et al. Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. *Cell.* 2007;129:289-301.
43. Levitus M, Waisfisz Q, Godthelp BC, et al. The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nat Genet.* 2005;37:934-935.
44. Meetei AR, de Winter JP, Medhurst AL, et al. A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet.* 2003;35:165-170.
45. Meetei AR, Medhurst AL, Ling C, et al. A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. *Nat Genet.* 2005;37:958-963.
46. Rahman N, Seal S, Thompson D, et al. PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nat Genet.* 2007;39:165-167.
47. Xia B, Dorsman JC, Ameziane N, et al. Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. *Nat Genet.* 2007;39:159-161.
48. Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, et al. Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell.* 2001;7:249-262.
49. Collis SJ, Barber LJ, Ward JD, Martin JS, Boulton SJ. *C. elegans* FANCD2 responds to replication stress and functions in interstrand cross-link repair. *DNA Repair (Amst).* 2006;5:1398-1406.

50. German J, Schonberg S, Caskie S, Warburton D, Falk C, Ray JH. A test for Fanconi's anemia. *Blood*. 1987;69:1637-1641.
51. Auerbach AD. A test for Fanconi's anemia. *Blood*. 1988;72:366-367.
52. Poll EH, Arwert F, Joenje H, Wanamarta AH. Differential sensitivity of Fanconi anaemia lymphocytes to the clastogenic action of cis-diamminedichloroplatinum (II) and trans-diamminedichloroplatinum (II). *Hum Genet*. 1985;71:206-210.
53. Auerbach AD, Adler B, O'Reilly RJ, Kirkpatrick D, Chaganti RS. Effect of procarbazine and cyclophosphamide on chromosome breakage in Fanconi anemia cells: relevance to bone marrow transplantation. *Cancer Genet Cytogenet*. 1983;9:25-36.
54. Frias S, Gomez L, Molina B, Rojas E, Ostrosky-Wegman P, Carnevale A. Effect of hydroxyurea and normal plasma on DNA synthesis in lymphocytes from Fanconi anemia patients. *Mutat Res*. 1996;357:115-121.
55. Zhang X, Sejas DP, Qiu Y, Williams DA, Pang Q. Inflammatory ROS promote and cooperate with the Fanconi anemia mutation for hematopoietic senescence. *J Cell Sci*. 2007;120:1572-1583.
56. Haneline LS, Broxmeyer HE, Cooper S, et al. Multiple inhibitory cytokines induce deregulated progenitor growth and apoptosis in hematopoietic cells from *Fac^{-/-}* mice. *Blood*. 1998;91:4092-4098.
57. Kook H. Fanconi anemia: current management. *Hematology*. 2005;10 Suppl 1:108-110.
58. Nuamah NM, Hamaloglu E, Ozdemir A, Ozenc A, Sozseker C, Sokmensuer C. Hepatic focal nodular hyperplasia developing in a Fanconi anemia patient: a case report and literature review. *Haematologica*. 2006;91:ECR39.
59. Aslan D. Fanconi anemia (FA) and squamous cell carcinoma in childhood. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2006;70:1995-1997; author reply 1998-1999.
60. Lambert MW, Tsongalis GJ, Lambert WC, Parrish DD. Correction of the DNA repair defect in Fanconi anemia complementation groups A and D cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;230:587-591.
61. Strathdee CA, Duncan AM, Buchwald M. Evidence for at least four Fanconi anaemia genes including FACC on chromosome 9. *Nat Genet*. 1992;1:196-198.
62. Lightfoot J, Alon N, Bosnoyan-Collins L, Buchwald M. Characterization of regions functional in the nuclear localization of the Fanconi anemia group A protein. *Hum Mol Genet*. 1999;8:1007-1015.
63. Levran O, Attwooll C, Henry RT, et al. The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet*. 2005;37:931-933.
64. Waisfisz Q, de Winter JP, Kruyt FA, et al. A physical complex of the Fanconi anemia proteins FANCG/XRCC9 and FANCA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:10320-10325.
65. Garcia-Higuera I, Kuang Y, Denham J, D'Andrea AD. The fanconi anemia proteins FANCA and FANCG stabilize each other and promote the nuclear accumulation of the Fanconi anemia complex. *Blood*. 2000;96:3224-3230.
66. Folias A, Matkovic M, Bruun D, et al. BRCA1 interacts directly with the Fanconi anemia protein FANCA. *Hum Mol Genet*. 2002;11:2591-2597.

67. Strathdee CA, Gavish H, Shannon WR, Buchwald M. Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation. *Nature*. 1992;358:434.
68. Hoatlin ME, Christianson TA, Keeble WW, et al. The Fanconi anemia group C gene product is located in both the nucleus and cytoplasm of human cells. *Blood*. 1998;91:1418-1425.
69. Freie BW, Ciccone SL, Li X, et al. A role for the Fanconi anemia C protein in maintaining the DNA damage-induced G2 checkpoint. *J Biol Chem*. 2004;279:50986-50993.
70. Pang Q, Keeble W, Christianson TA, Faulkner GR, Bagby GC. FANCC interacts with Hsp70 to protect hematopoietic cells from IFN-gamma/TNF-alpha-mediated cytotoxicity. *Embo J*. 2001;20:4478-4489.
71. Kruyt FA, Hoshino T, Liu JM, Joseph P, Jaiswal AK, Youssoufian H. Abnormal microsomal detoxification implicated in Fanconi anemia group C by interaction of the FAC protein with NADPH cytochrome P450 reductase. *Blood*. 1998;92:3050-3056.
72. Kruyt FA, Youssoufian H. Do Fanconi anemia genes control cell response to cross-linking agents by modulating cytochrome P-450 reductase activity? *Drug Resist Updat*. 2000;3:211-215.
73. Lackinger D, Ruppitsch W, Ramirez MH, Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M. Involvement of the Fanconi anemia protein FA-C in repair processes of oxidative DNA damages. *FEBS Lett*. 1998;440:103-106.
74. Fagerlie SR, Bagby GC. Immune defects in Fanconi anemia. *Crit Rev Immunol*. 2006;26:81-96.
75. Sejas DP, Rani R, Qiu Y, et al. Inflammatory reactive oxygen species-mediated hemopoietic suppression in FancC-deficient mice. *J Immunol*. 2007;178:5277-5287.
76. Couch FJ, Johnson MR, Rabe K, et al. Germ line Fanconi anemia complementation group C mutations and pancreatic cancer. *Cancer Res*. 2005;65:383-386.
77. Nakanishi A, Han X, Saito H, et al. Interference with BRCA2, which localizes to the centrosome during S and early M phase, leads to abnormal nuclear division. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;355:34-40.
78. Wagner JE, Tolar J, Levrn O, et al. Germline mutations in BRCA2: shared genetic susceptibility to breast cancer, early onset leukemia, and Fanconi anemia. *Blood*. 2004;103:3226-3229.
79. Godthelp BC, Wiegant WW, Waisfisz Q, et al. Inducibility of nuclear Rad51 foci after DNA damage distinguishes all Fanconi anemia complementation groups from D1/BRCA2. *Mutat Res*. 2006;594:39-48.
80. Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Xu B, et al. Convergence of the fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways. *Cell*. 2002;109:459-472.
81. Wang X, Andreassen PR, D'Andrea AD. Functional interaction of monoubiquitinated FANCD2 and BRCA2/FANCD1 in chromatin. *Mol Cell Biol*. 2004;24:5850-5862.

82. Chen J, Silver DP, Walpita D, et al. Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Mol Cell*. 1998;2:317-328.
83. D'Andrea AD, Grompe M. The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:23-34.
84. Nijman SM, Huang TT, Dirac AM, et al. The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. *Mol Cell*. 2005;17:331-339.
85. Borriello A, Locasciulli A, Bianco AM, et al. A novel Leu153Ser mutation of the Fanconi anemia FANCD2 gene is associated with severe chemotherapy toxicity in a pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2007;21:72-78.
86. de Winter JP, van der Weel L, de Groot J, et al. The Fanconi anemia protein FANCF forms a nuclear complex with FANCA, FANCC and FANCG. *Hum Mol Genet*. 2000;9:2665-2674.
87. Leveille F, Ferrer M, Medhurst AL, et al. The nuclear accumulation of the Fanconi anemia protein FANCE depends on FANCC. *DNA Repair (Amst)*. 2006;5:556-565.
88. Kowal P, Gurtan AM, Stuckert P, D'Andrea AD, Ellenberger T. Structural determinants of human FANCF protein that function in the assembly of a DNA damage signaling complex. *J Biol Chem*. 2007;282:2047-2055.
89. Wang Z, Li M, Lu S, Zhang Y, Wang H. Promoter hypermethylation of FANCF plays an important role in the occurrence of ovarian cancer through disrupting Fanconi anemia-BRCA pathway. *Cancer Biol Ther*. 2006;5:256-260.
90. Tischkowitz MD, Morgan NV, Grimwade D, et al. Deletion and reduced expression of the Fanconi anemia FANCA gene in sporadic acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2004;18:420-425.
91. Meyer S, Barber LM, White DJ, et al. Spectrum and significance of variants and mutations in the Fanconi anaemia group G gene in children with sporadic acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2006;133:284-292.
92. Faivre L, Guardiola P, Lewis C, et al. Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in fanconi anemia. *European Fanconi Anemia Research Group. Blood*. 2000;96:4064-4070.
93. Levitus M, Rooimans MA, Steltenpool J, et al. Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes. *Blood*. 2004;103:2498-2503.
94. Sims AE, Spiteri E, Sims RJ, 3rd, et al. FANCI is a second monoubiquitinated member of the Fanconi anemia pathway. *Nat Struct Mol Biol*. 2007;14:564-567.
95. Dorsman JC, Levitus M, Rockx D, et al. Identification of the Fanconi anemia complementation group I gene, FANCI. *Cell Oncol*. 2007;29:211-218.
96. Levran O, Diotti R, Pujara K, Batish SD, Hanenberg H, Auerbach AD. Spectrum of sequence variations in the FANCA gene: an International Fanconi Anemia Registry (IFAR) study. *Hum Mutat*. 2005;25:142-149.

97. Cantor S, Drapkin R, Zhang F, et al. The BRCA1-associated protein BACH1 is a DNA helicase targeted by clinically relevant inactivating mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:2357-2362.
98. Lewis AG, Flanagan J, Marsh A, et al. Mutation analysis of FANCD2, BRIP1/BACH1, LMO4 and SFN in familial breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2005;7:R1005-1016.
99. Gupta R, Sharma S, Sommers JA, Kenny MK, Cantor SB, Brosh RM, Jr. FANCD2 (BACH1) helicase forms DNA damage inducible foci with replication protein A and interacts physically and functionally with the single-stranded DNA binding protein. *Blood*. 2007.
100. Gurtan AM, Stuckert P, D'Andrea AD. The WD40 repeats of FANCL are required for Fanconi anemia core complex assembly. *J Biol Chem*. 2006;281:10896-10905.
101. Zhao QG, Zhou Y, Zhu HQ, Lu BS, Huang PT. Generation of mouse FANCL antibody and analysis of FANCL protein expression profile in mouse tissues. *Yi Chuan Xue Bao*. 2006;33:49-55.
102. Ciccia A, Ling C, Coulthard R, et al. Identification of FAAP24, a Fanconi anemia core complex protein that interacts with FANCD2. *Mol Cell*. 2007;25:331-343.
103. Reid S, Schindler D, Hanenberg H, et al. Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat Genet*. 2007;39:162-164.
104. Thomashevski A, High AA, Drozd M, et al. The Fanconi anemia core complex forms four complexes of different sizes in different subcellular compartments. *J Biol Chem*. 2004;279:26201-26209.
105. Niedernhofer LJ, Lalai AS, Hoeijmakers JH. Fanconi anemia (cross)linked to DNA repair. *Cell*. 2005;123:1191-1198.
106. Hussain S, Witt E, Huber PA, Medhurst AL, Ashworth A, Mathew CG. Direct interaction of the Fanconi anaemia protein FANCD2 with BRCA2/FANCD1. *Hum Mol Genet*. 2003;12:2503-2510.
107. Matsushita N, Kitao H, Ishiai M, et al. A FANCD2-monoubiquitin fusion reveals hidden functions of Fanconi anemia core complex in DNA repair. *Mol Cell*. 2005;19:841-847.
108. D'Andrea AD. Cellular function of the Fanconi anemia pathway. *Nat Med*. 2001;7:1259-1260.
109. Thompson LH, Hinz JM, Yamada NA, Jones NJ. How Fanconi anemia proteins promote the four Rs: replication, recombination, repair, and recovery. *Environ Mol Mutagen*. 2005;45:128-142.
110. Medhurst AL, Huber PA, Waisfisz Q, de Winter JP, Mathew CG. Direct interactions of the five known Fanconi anaemia proteins suggest a common functional pathway. *Hum Mol Genet*. 2001;10:423-429.
111. D'Andrea AD. The Fanconi road to cancer. *Genes Dev*. 2003;17:1933-1936.
112. Mi J, Kupfer GM. The Fanconi anemia core complex associates with chromatin during S phase. *Blood*. 2005;105:759-766.
113. Joenje H, Arwert F. Connecting Fanconi anemia to BRCA1. *Nat Med*. 2001;7:406-407.

114. Clarke AA, Philpott NJ, Gordon-Smith EC, Rutherford TR. The sensitivity of Fanconi anaemia group C cells to apoptosis induced by mitomycin C is due to oxygen radical generation, not DNA crosslinking. *Br J Haematol.* 1997;96:240-247.
115. Ruppitsch W, Meisslitzer C, Weirich-Schwaiger H, et al. The role of oxygen metabolism for the pathological phenotype of Fanconi anemia. *Hum Genet.* 1997;99:710-719.
116. Rosselli F. Fanconi anaemia syndrome and apoptosis: state of the art. *Apoptosis.* 1998;3:229-236.
117. Pagano G, Degan P, d'Ischia M, et al. Oxidative stress as a multiple effector in Fanconi anaemia clinical phenotype. *Eur J Haematol.* 2005;75:93-100.
118. Cumming RC, Liu JM, Youssoufian H, Buchwald M. Suppression of apoptosis in hematopoietic factor-dependent progenitor cell lines by expression of the FAC gene. *Blood.* 1996;88:4558-4567.
119. Ridet A, Guillouf C, Duchaud E, et al. Deregulated apoptosis is a hallmark of the Fanconi anemia syndrome. *Cancer Res.* 1997;57:1722-1730.
120. Sii-Felice K, Etienne O, Hoffschir F, et al. Fanconi DNA repair pathway is required for survival and long-term maintenance of neural progenitors. *Embo J.* 2008;27:770-781.
121. Pang Q, Christianson TA, Keeble W, et al. The Fanconi anemia complementation group C gene product: structural evidence of multifunctionality. *Blood.* 2001;98:1392-1401.
122. Ruppitsch W, Meisslitzer C, Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M. Overexpression of thioredoxin in Fanconi anemia fibroblasts prevents the cytotoxic and DNA damaging effect of mitomycin C and diepoxybutane. *FEBS Lett.* 1998;422:99-102.
123. Hoatlin ME, Zhi Y, Ball H, et al. A novel BTB/POZ transcriptional repressor protein interacts with the Fanconi anemia group C protein and PLZF. *Blood.* 1999;94:3737-3747.
124. Lomonosov M, Anand S, Sangrithi M, Davies R, Venkitaraman AR. Stabilization of stalled DNA replication forks by the BRCA2 breast cancer susceptibility protein. *Genes Dev.* 2003;17:3017-3022.
125. Gari K, Decaillet C, Stasiak AZ, Stasiak A, Constantinou A. The Fanconi anemia protein FANCM can promote branch migration of Holliday junctions and replication forks. *Mol Cell.* 2008;29:141-148.
126. De Silva IU, McHugh PJ, Clingen PH, Hartley JA. Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 2000;20:7980-7990.
127. Niedernhofer LJ, Odijk H, Budzowska M, et al. The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. *Mol Cell Biol.* 2004;24:5776-5787.
128. Sonoda E, Sasaki MS, Morrison C, Yamaguchi-Iwai Y, Takata M, Takeda S. Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells. *Mol Cell Biol.* 1999;19:5166-5169.

129. Habi O, Delisle MC, Messier N, Carreau M. Lack of self-renewal capacity in *Fancc*^{-/-} stem cells after ex vivo expansion. *Stem Cells*. 2005;23:1135-1141.
130. Haneline LS, Gobbett TA, Ramani R, et al. Loss of *FancC* function results in decreased hematopoietic stem cell repopulating ability. *Blood*. 1999;94:1-8.
131. Ernstoff MS, Trautman T, Davis CA, et al. A randomized phase I/II study of continuous versus intermittent intravenous interferon gamma in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 1987;5:1804-1810.
132. Whitney MA, Royle G, Low MJ, et al. Germ cell defects and hematopoietic hypersensitivity to gamma-interferon in mice with a targeted disruption of the *Fanconi anemia C* gene. *Blood*. 1996;88:49-58.
133. Borden EC, Lindner D, Dreicer R, Hussein M, Peereboom D. Second-generation interferons for cancer: clinical targets. *Semin Cancer Biol*. 2000;10:125-144.
134. Si Y, Ciccone S, Yang FC, et al. Continuous in vivo infusion of interferon-gamma (IFN-gamma) enhances engraftment of syngeneic wild-type cells in *Fanca*^{-/-} and *Fancg*^{-/-} mice. *Blood*. 2006;108:4283-4287.
135. Li X, Plett PA, Yang Y, et al. *Fanconi anemia type C*-deficient hematopoietic stem/progenitor cells exhibit aberrant cell cycle control. *Blood*. 2003;102:2081-2084.
136. Wang J, Campbell IL, Zhang H. Systemic interferon-alpha regulates interferon-stimulated genes in the central nervous system. *Mol Psychiatry*. 2008;13:293-301.
137. Lopez KD, Guinan EC. GM-CSF clinical trials: pediatric aplastic anemia and *Fanconi's anemia*. *Pediatr Nurs*. 1995;21:345-349.
138. Guinan EC, Lopez KD, Huhn RD, Felser JM, Nathan DG. Evaluation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of pancytopenia in children with *fanconi anemia*. *J Pediatr*. 1994;124:144-150.
139. Lotem J, Sachs L. Hematopoietic cytokines inhibit apoptosis induced by transforming growth factor beta 1 and cancer chemotherapy compounds in myeloid leukemic cells. *Blood*. 1992;80:1750-1757.
140. Sakai I, Kraft AS. The kinase domain of *Jak2* mediates induction of *bcl-2* and delays cell death in hematopoietic cells. *J Biol Chem*. 1997;272:12350-12358.
141. Rosenberg PS, Alter BP, Bolyard AA, et al. The incidence of leukemia and mortality from sepsis in patients with severe congenital neutropenia receiving long-term G-CSF therapy. *Blood*. 2006;107:4628-4635.
142. Zeidler C, Welte K. Hematopoietic growth factors for the treatment of inherited cytopenias. *Semin Hematol*. 2007;44:133-137.
143. Alter BP, Knobloch ME, He L, et al. Effect of stem cell factor on in vitro erythropoiesis in patients with bone marrow failure syndromes. *Blood*. 1992;80:3000-3008.
144. Martinez-Jaramillo G, Espinoza-Hernandez L, Benitez-Aranda H, Mayani H. Long-term proliferation in vitro of hematopoietic progenitor cells from children with congenital bone marrow failure: effect of rhGM-CSF and rhEPO. *Eur J Haematol*. 2000;64:173-181.

145. Das RE, Milne A, Rowley M, Smith EC, Cotes PM. Serum immunoreactive erythropoietin in patients with idiopathic aplastic and Fanconi's anaemias. *Br J Haematol.* 1992;82:601-607.
146. Velazquez I, Alter BP. Androgens and liver tumors: Fanconi's anemia and non-Fanconi's conditions. *Am J Hematol.* 2004;77:257-267.
147. Kumar AR, Wagner JE, Auerbach AD, et al. Fatal hemorrhage from androgen-related hepatic adenoma after hematopoietic cell transplantation. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2004;26:16-18.
148. Broxmeyer HE. Suppressor cytokines and regulation of myelopoiesis. Biology and possible clinical uses. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1992;14:22-30.
149. Mathe G, Bernard J. [Trial therapy, by x-irradiation followed by the administration of homologous bone marrow cells, of highly-advanced spontaneous leukemia in AK mice.]. *Bull Assoc Fr Etud Cancer.* 1958;45:289-300.
150. Dausset J, Rapaport FT, Machado-Caetano JA. [Relationships between grafts and leucocytics or thrombocytic antigens in man]. *Bibl Haematol.* 1965;23:104-114.
151. Sharp JG, Thomas DB, Briscoe CV. Proliferation and differentiation of transplanted bone marrow from mice treated with nitrogen mustard. *Exp Hematol.* 1974;2:1-8.
152. Gluckman E, Auerbach AD, Horowitz MM, et al. Bone marrow transplantation for Fanconi anemia. *Blood.* 1995;86:2856-2862.
153. Guardiola P, Socie G, Pasquini R, et al. Allogeneic stem cell transplantation for Fanconi Anaemia. Severe Aplastic Anaemia Working Party of the EBMT and EUFAR. European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1998;21 Suppl 2:S24-27.
154. Rosenberg PS, Alter BP, Socie G, Gluckman E. Secular trends in outcomes for Fanconi anemia patients who receive transplants: implications for future studies. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005;11:672-679.
155. Gale RP, Butturini A. Transplants of blood-derived hematopoietic cells. *Bone Marrow Transplant.* 1990;5 Suppl 1:2-4.
156. Rubinstein P. Why cord blood? *Hum Immunol.* 2006;67:398-404.
157. Kohli-Kumar M, Morris C, DeLaat C, et al. Bone marrow transplantation in Fanconi anemia using matched sibling donors. *Blood.* 1994;84:2050-2054.
158. Reiter E, Keil F, Brugger S, et al. Excellent long-term survival after allogeneic marrow transplantation in patients with severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant.* 1997;19:1191-1196.
159. Aker M, Varadi G, Slavin S, Nagler A. Fludarabine-based protocol for human umbilical cord blood transplantation in children with Fanconi anemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 1999;21:237-239.
160. Styczynski J, Cheung YK, Garvin J, et al. Outcomes of unrelated cord blood transplantation in pediatric recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2004;34:129-136.
161. George B, Mathews V, Shaji RV, Srivastava V, Srivastava A, Chandy M. Fludarabine-based conditioning for allogeneic stem cell transplantation for

- multiply transfused patients with Fanconi's anemia. *Bone Marrow Transplant.* 2005;35:341-343.
162. Saunders EF, Olivieri N, Freedman MH. Unexpected complications after bone marrow transplantation in transfusion-dependent children. *Bone Marrow Transplant.* 1993;12 Suppl 1:88-90.
 163. Davies SM, Khan S, Wagner JE, et al. Unrelated donor bone marrow transplantation for Fanconi anemia. *Bone Marrow Transplant.* 1996;17:43-47.
 164. Maschan AA, Trakhtman PE, Balashov DN, et al. Fludarabine, low-dose busulfan and antithymocyte globulin as conditioning for Fanconi anemia patients receiving bone marrow transplantation from HLA-compatible related donors. *Bone Marrow Transplant.* 2004;34:305-307.
 165. Ortin M, Raj R, Kinning E, Williams M, Darbyshire PJ. Partially matched related donor peripheral blood progenitor cell transplantation in paediatric patients adding fludarabine and anti-lymphocyte gamma-globulin. *Bone Marrow Transplant.* 2002;30:359-366.
 166. Yabe H, Inoue H, Matsumoto M, et al. Allogeneic haematopoietic cell transplantation from alternative donors with a conditioning regimen of low-dose irradiation, fludarabine and cyclophosphamide in Fanconi anaemia. *Br J Haematol.* 2006;134:208-212.
 167. Ayas M, Solh H, Mustafa MM, et al. Bone marrow transplantation from matched siblings in patients with fanconi anemia utilizing low-dose cyclophosphamide, thoracoabdominal radiation and antithymocyte globulin. *Bone Marrow Transplant.* 2001;27:139-143.
 168. Ayas M, Al-Jefri A, Al-Mahr M, et al. Stem cell transplantation for patients with Fanconi anemia with low-dose cyclophosphamide and antithymocyte globulins without the use of radiation therapy. *Bone Marrow Transplant.* 2005;35:463-466.
 169. MacMillan ML, Auerbach AD, Davies SM, et al. Haematopoietic cell transplantation in patients with Fanconi anaemia using alternate donors: results of a total body irradiation dose escalation trial. *Br J Haematol.* 2000;109:121-129.
 170. Kapelushnik J, Or R, Slavin S, Nagler A. A fludarabine-based protocol for bone marrow transplantation in Fanconi's anemia. *Bone Marrow Transplant.* 1997;20:1109-1110.
 171. Boulad F, Gillio A, Small TN, et al. Stem cell transplantation for the treatment of Fanconi anaemia using a fludarabine-based cytoreductive regimen and T-cell-depleted related HLA-mismatched peripheral blood stem cell grafts. *Br J Haematol.* 2000;111:1153-1157.
 172. Bitan M, Or R, Shapira MY, et al. Fludarabine-based reduced intensity conditioning for stem cell transplantation of Fanconi anemia patients from fully matched related and unrelated donors. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006;12:712-718.
 173. Wagner JE, Eapen M, MacMillan ML, et al. Unrelated donor bone marrow transplantation for the treatment of Fanconi anemia. *Blood.* 2007;109:2256-2262.

174. Maury S, Mary JY, Rabian C, et al. Prolonged immune deficiency following allogeneic stem cell transplantation: risk factors and complications in adult patients. *Br J Haematol.* 2001;115:630-641.
175. Almousa H, Ouachee-Chardin M, Picard C, et al. Transient familial haemophagocytic lymphohistiocytosis reactivation post-CD34 haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2005;130:404-408.
176. Socie G, Scieux C, Gluckman E, et al. Squamous cell carcinomas after allogeneic bone marrow transplantation for aplastic anemia: further evidence of a multistep process. *Transplantation.* 1998;66:667-670.
177. Alter BP, Joenje H, Oostra AB, Pals G. Fanconi anemia: adult head and neck cancer and hematopoietic mosaicism. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005;131:635-639.
178. Alter BP. Fanconi's anemia, transplantation, and cancer. *Pediatr Transplant.* 2005;9 Suppl 7:81-86.
179. Gluckman E, Rocha V. History of the clinical use of umbilical cord blood hematopoietic cells. *Cytotherapy.* 2005;7:219-227.
180. Lu L, Xiao M, Shen RN, Grigsby S, Broxmeyer HE. Enrichment, characterization, and responsiveness of single primitive CD34 human umbilical cord blood hematopoietic progenitors with high proliferative and replating potential. *Blood.* 1993;81:41-48.
181. Broxmeyer HE, Hango G, Cooper S. Clinical and biological aspects of human umbilical cord blood as a source of transplantable hematopoietic stem and progenitor cells. *Bone Marrow Transplant.* 1992;9 Suppl 1:7-10.
182. Gluckman E, Devergie A, Bourdeau-Esperou H, et al. Transplantation of umbilical cord blood in Fanconi's anemia. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1990;32:423-425.
183. Broxmeyer HE, Gluckman E, Auerbach A, et al. Human umbilical cord blood: a clinically useful source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Int J Cell Cloning.* 1990;8 Suppl 1:76-89; discussion 89-91.
184. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med.* 1989;321:1174-1178.
185. Bielorai B, Hughes MR, Auerbach AD, et al. Successful umbilical cord blood transplantation for Fanconi anemia using preimplantation genetic diagnosis for HLA-matched donor. *Am J Hematol.* 2004;77:397-399.
186. Steffann J, Frydman N, Burlet P, et al. [Extending preimplantation genetic diagnosis to HLA typing: the Paris experience]. *Gynecol Obstet Fertil.* 2005;33:824-827.
187. Gilmore GL, DePasquale DK, Lister J, Shaddock RK. Ex vivo expansion of human umbilical cord blood and peripheral blood CD34(+) hematopoietic stem cells. *Exp Hematol.* 2000;28:1297-1305.
188. Hutton JF, D'Andrea RJ, Lewis ID. Potential for clinical ex vivo expansion of cord blood haemopoietic stem cells using non-haemopoietic factor supplements. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2007;2:229-237.

189. Piacibello W, Sanavio F, Severino A, et al. Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34(+) cord blood cells after ex vivo expansion: evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells. *Blood*. 1999;93:3736-3749.
190. Moore MA. Umbilical cord blood: an expandable resource. *J Clin Invest*. 2000;105:855-856.
191. Hallek M, Wendtner CM. Recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors for somatic gene therapy: recent advances and potential clinical applications. *Cytokines Mol Ther*. 1996;2:69-79.
192. Medeiros C, Zanis-Neto J, Pasquini R. Bone marrow transplantation for patients with Fanconi anemia: reduced doses of cyclophosphamide without irradiation as conditioning. *Bone Marrow Transplant*. 1999;24:849-852.
193. Gross M, Hanenberg H, Lobitz S, et al. Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. *Cytogenet Genome Res*. 2002;98:126-135.
194. Hamanoue S, Yagasaki H, Tsuruta T, et al. Myeloid lineage-selective growth of revertant cells in Fanconi anaemia. *Br J Haematol*. 2006;132:630-635.
195. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey-Abina S. Correction of genetic blood defects by gene transfer. *Curr Opin Hematol*. 2001;8:360-367.
196. Liu JM, Kim S, Read EJ, et al. Engraftment of hematopoietic progenitor cells transduced with the Fanconi anemia group C gene (FANCC). *Hum Gene Ther*. 1999;10:2337-2346.
197. Li X, Le Beau MM, Ciccone S, et al. Ex vivo culture of Fancc-/-stem/progenitor cells predisposes cells to undergo apoptosis, and surviving stem/progenitor cells display cytogenetic abnormalities and an increased risk of malignancy. *Blood*. 2005;105:3465-3471.
198. Joyner A, Keller G, Phillips RA, Bernstein A. Retrovirus transfer of a bacterial gene into mouse haematopoietic progenitor cells. *Nature*. 1983;305:556-558.
199. Liu JM, Young NS, Walsh CE, et al. Retroviral mediated gene transfer of the Fanconi anemia complementation group C gene to hematopoietic progenitors of group C patients. *Hum Gene Ther*. 1997;8:1715-1730.
200. Orschell-Traycoff CM, Hiatt K, Dagher RN, Rice S, Yoder MC, Srour EF. Homing and engraftment potential of Sca-1(+)lin(-) cells fractionated on the basis of adhesion molecule expression and position in cell cycle. *Blood*. 2000;96:1380-1387.
201. Bagnara GP, Strippoli P, Bonsi L, et al. Effect of stem cell factor on colony growth from acquired and constitutional (Fanconi) aplastic anemia. *Blood*. 1992;80:382-387.
202. Butturini A, Gale RP. Long-term bone marrow culture in persons with Fanconi anemia and bone marrow failure. *Blood*. 1994;83:336-339.
203. Platzbecker U, Kurre P, Guardiola P, et al. Fanconi anemia type C-deficient hematopoietic cells are resistant to TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)-induced cleavage of pro-caspase-8. *Exp Hematol*. 2004;32:815-821.
204. Dieterlen-Lievre F. Emergence of haematopoietic stem cells during development. *C R Biol*. Vol. 330; 2007:504-509.

205. Smith LG, Weissman IL, Heimfeld S. Clonal analysis of hematopoietic stem-cell differentiation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:2788-2792.
206. Osawa M, Nakamura K, Nishi N, et al. In vivo self-renewal of c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin(low/-) hemopoietic stem cells. *J Immunol*. 1996;156:3207-3214.
207. Faubert A, Lessard J, Sauvageau G. Are genetic determinants of asymmetric stem cell division active in hematopoietic stem cells? *Oncogene*. 2004;23:7247-7255.
208. Bullock TE, Wen B, Marley SB, Gordon MY. Potential of CD34 in the regulation of symmetrical and asymmetrical divisions by hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells*. 2007;25:844-851.
209. Kelly PF, Radtke S, Kalle C, et al. Stem cell collection and gene transfer in fanconi anemia. *Mol Ther*. 2007;15:211-219.
210. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 1988;241:58-62.
211. Jones RJ, Wagner JE, Celano P, Zicha MS, Sharkis SJ. Separation of pluripotent haematopoietic stem cells from spleen colony-forming cells. *Nature*. 1990;347:188-189.
212. Berardi AC, Wang A, Levine JD, Lopez P, Scadden DT. Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells. *Science*. 1995;267:104-108.
213. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*. 1996;183:1797-1806.
214. Spangrude GJ, Muller-Sieburg CE, Heimfeld S, Weissman IL. Two rare populations of mouse Thy-1^{lo} bone marrow cells repopulate the thymus. *J Exp Med*. 1988;167:1671-1683.
215. Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, et al. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *Embo J*. 1987;6:3341-3351.
216. van de Rijn M, Heimfeld S, Spangrude GJ, Weissman IL. Mouse hematopoietic stem-cell antigen Sca-1 is a member of the Ly-6 antigen family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:4634-4638.
217. Hoang T, Gilmore D, Metcalf D, et al. Separation of hemopoietic cells from adult mouse marrow by use of monoclonal antibodies. *Blood*. 1983;61:580-588.
218. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol*. 1984;133:157-165.
219. Morel F, Szilvassy SJ, Travis M, Chen B, Galy A. Primitive hematopoietic cells in murine bone marrow express the CD34 antigen. *Blood*. 1996;88:3774-3784.
220. Brown J, Greaves MF, Molgaard HV. The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic

- progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts. *Int Immunol.* 1991;3:175-184.
221. Healy L, May G, Gale K, Grosveld F, Greaves M, Enver T. The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:12240-12244.
222. Donnelly DS, Zeltermann D, Sharkis S, Krause DS. Functional activity of murine CD34⁺ and CD34⁻ hematopoietic stem cell populations. *Exp Hematol.* 1999;27:788-796.
223. Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Flake AW, Ogawa M. Human bone marrow CD34⁻ cells engraft *in vivo* and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34⁺ cells. *Exp Hematol.* 1998;26:353-360.
224. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34⁻low/negative hematopoietic stem cell. *Science.* 1996;273:242-245.
225. Byk T, Kahn J, Kollet O, et al. Cycling G1 CD34⁺/CD38⁺ cells potentiate the motility and engraftment of quiescent G0 CD34⁺/CD38⁻/low severe combined immunodeficiency repopulating cells. *Stem Cells.* 2005;23:561-574.
226. Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med.* 1998;4:1038-1045.
227. Fujisaki T, Berger MG, Rose-John S, Eaves CJ. Rapid differentiation of a rare subset of adult human lin⁻CD34⁻CD38⁻ cells stimulated by multiple growth factors *in vitro*. *Blood.* 1999;94:1926-1932.
228. Harrison DE, Lerner CP. Most primitive hematopoietic stem cells are stimulated to cycle rapidly after treatment with 5-fluorouracil. *Blood.* 1991;78:1237-1240.
229. Smeland EB, Funderud S, Kvalheim G, et al. Isolation and characterization of human hematopoietic progenitor cells: an effective method for positive selection of CD34⁺ cells. *Leukemia.* 1992;6:845-852.
230. Wang N, Morra M, Wu C, et al. CD150 is a member of a family of genes that encode glycoproteins on the surface of hematopoietic cells. *Immunogenetics.* 2001;53:382-394.
231. Henniker AJ, Bradstock KF, Grimsley P, Atkinson MK. A novel non-lineage antigen on human leucocytes: characterization with two CD-48 monoclonal antibodies. *Dis Markers.* 1990;8:179-190.
232. Noda S, Horiguchi K, Ichikawa H, Miyoshi H. Repopulating activity of *ex vivo*-expanded murine hematopoietic stem cells resides in the CD48-c-Kit⁺Sca-1⁺lineage marker⁻ cell population. *Stem Cells.* 2008;26:646-655.
233. Simmons D, Seed B. Isolation of a cDNA encoding CD33, a differentiation antigen of myeloid progenitor cells. *J Immunol.* 1988;141:2797-2800.
234. Neben S, Redfearn WJ, Parra M, Brecher G, Pallavicini MG. Short- and long-term repopulation of lethally irradiated mice by bone marrow stem cells enriched on the basis of light scatter and Hoechst 33342 fluorescence. *Exp Hematol.* 1991;19:958-967.

235. Mulder AH, Visser JW. Separation and functional analysis of bone marrow cells separated by rhodamine-123 fluorescence. *Exp Hematol.* 1987;15:99-104.
236. Camargo FD, Chambers SM, Drew E, McNagny KM, Goodell MA. Hematopoietic stem cells do not engraft with absolute efficiencies. *Blood.* 2006;107:501-507.
237. Vigna E, Naldini L. Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *J Gene Med.* 2000;2:308-316.
238. Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:11382-11388.
239. Naldini L, Blomer U, Gallay P, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science.* 1996;272:263-267.
240. Kafri T, Blomer U, Peterson DA, Gage FH, Verma IM. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet.* 1997;17:314-317.
241. Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol.* 1997;15:871-875.
242. Miller RH, Sarver N. HIV accessory proteins as therapeutic targets. *Nat Med.* 1997;3:389-394.
243. Akkina RK, Walton RM, Chen ML, Li QX, Planelles V, Chen IS. High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J Virol.* 1996;70:2581-2585.
244. Salmon P, Kindler V, Ducrey O, Chapuis B, Zubler RH, Trono D. High-level transgene expression in human hematopoietic progenitors and differentiated blood lineages after transduction with improved lentiviral vectors. *Blood.* 2000;96:3392-3398.
245. Roe T, Reynolds TC, Yu G, Brown PO. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *Embo J.* 1993;12:2099-2108.
246. Lewis PF, Emerman M. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J Virol.* 1994;68:510-516.
247. Sutton RE, Wu HT, Rigg R, Bohnlein E, Brown PO. Human immunodeficiency virus type 1 vectors efficiently transduce human hematopoietic stem cells. *J Virol.* 1998;72:5781-5788.
248. Mastromarino P, Conti C, Goldoni P, Hauttecoeur B, Orsi N. Characterization of membrane components of the erythrocyte involved in vesicular stomatitis virus attachment and fusion at acidic pH. *J Gen Virol.* 1987;68 (Pt 9):2359-2369.
249. Movassagh M, Desmyter C, Baillou C, et al. High-level gene transfer to cord blood progenitors using gibbon ape leukemia virus pseudotype retroviral

- vectors and an improved clinically applicable protocol. *Hum Gene Ther.* 1998;9:225-234.
250. Dull T, Zufferey R, Kelly M, et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol.* 1998;72:8463-8471.
 251. Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, et al. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol.* 1998;72:9873-9880.
 252. Baum C, Kustikova O, Modlich U, Li Z, Fehse B. Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors. *Hum Gene Ther.* 2006;17:253-263.
 253. Dequen F, Gagnon SN, Desnoyers S. Ionizing radiations in *Caenorhabditis elegans* induce poly(ADP-ribosyl)ation, a conserved DNA-damage response essential for survival. *DNA Repair (Amst).* 2005;4:814-825.
 254. Leonhardt EA, Henderson DS, Rinehart JE, Boyd JB. Characterization of the *mus308* gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 1993;133:87-96.
 255. Stone S, Sobeck A, van Kogelenberg M, et al. Identification, developmental expression and regulation of the *Xenopus* ortholog of human *FANCG/XRCC9*. *Genes Cells.* 2007;12:841-851.
 256. Sakaguchi K, Zdzienicka MZ, Harris PV, Boyd JB. Nuclease modification in Chinese hamster cells hypersensitive to DNA cross-linking agents--a model for Fanconi anemia. *Mutat Res.* 1992;274:11-18.
 257. Wevrick R, Barker JE, Nadeau JH, Szpirer C, Buchwald M. Mapping of the murine and rat *Facc* genes and assessment of flexed-tail as a candidate mouse homolog of Fanconi anemia group C. *Mamm Genome.* 1993;4:440-444.
 258. Chen M, Tomkins DJ, Auerbach W, et al. Inactivation of *Fac* in mice produces inducible chromosomal instability and reduced fertility reminiscent of Fanconi anaemia. *Nat Genet.* 1996;12:448-451.
 259. Houghtaling S, Timmers C, Noll M, et al. Epithelial cancer in Fanconi anemia complementation group D2 (*Fancd2*) knockout mice. *Genes Dev.* 2003;17:2021-2035.
 260. Yang Y, Kuang Y, Montes De Oca R, et al. Targeted disruption of the murine Fanconi anemia gene, *Fancg/Xrcc9*. *Blood.* 2001;98:3435-3440.
 261. Carreau M. Not-so-novel phenotypes in the Fanconi anemia group D2 mouse model. *Blood.* 2004;103:2430.
 262. Rathbun RK, Faulkner GR, Ostroski MH, et al. Inactivation of the Fanconi anemia group C gene augments interferon-gamma-induced apoptotic responses in hematopoietic cells. *Blood.* 1997;90:974-985.
 263. Rathbun RK, Christianson TA, Faulkner GR, et al. Interferon-gamma-induced apoptotic responses of Fanconi anemia group C hematopoietic progenitor cells involve caspase 8-dependent activation of caspase 3 family members. *Blood.* 2000;96:4204-4211.
 264. Otsuki T, Nagakura S, Wang J, Bloom M, Grompe M, Liu JM. Tumor necrosis factor-alpha and CD95 ligation suppress erythropoiesis in Fanconi anemia C gene knockout mice. *J Cell Physiol.* 1999;179:79-86.
 265. Wong JC, Alon N, McKerlie C, Huang JR, Meyn MS, Buchwald M. Targeted disruption of exons 1 to 6 of the Fanconi Anemia group A gene

- leads to growth retardation, strain-specific microphthalmia, meiotic defects and primordial germ cell hypoplasia. *Hum Mol Genet.* 2003;12:2063-2076.
266. Koomen M, Cheng NC, van de Vrugt HJ, et al. Reduced fertility and hypersensitivity to mitomycin C characterize *Fancc/Xrcc9* null mice. *Hum Mol Genet.* 2002;11:273-281.
267. Wynshaw-Boris A. Model mice and human disease. *Nat Genet.* 1996;13:259-260.
268. Phelps RA, Gingras H, Hockenbery DM. Loss of FANCC function is associated with failure to inhibit late firing replication origins after DNA cross-linking. *Exp Cell Res.* 2007;313:2283-2292.
269. Wong JC, Buchwald M. Disease model: Fanconi anemia. *Trends Mol Med.* 2002;8:139-142.
270. Carreau M, Gan OI, Liu L, Doedens M, Dick JE, Buchwald M. Hematopoietic compartment of Fanconi anemia group C null mice contains fewer lineage-negative CD34⁺ primitive hematopoietic cells and shows reduced reconstruction ability. *Exp Hematol.* 1999;27:1667-1674.
271. Carreau M, Gan OI, Liu L, et al. Bone marrow failure in the Fanconi anemia group C mouse model after DNA damage. *Blood.* 1998;91:2737-2744.
272. Yamada K, Olsen JC, Patel M, Rao KW, Walsh CE. Functional correction of fanconi anemia group C hematopoietic cells by the use of a novel lentiviral vector. *Mol Ther.* 2001;3:485-490.
273. Galimi F, Noll M, Kanazawa Y, et al. Gene therapy of Fanconi anemia: preclinical efficacy using lentiviral vectors. *Blood.* 2002;100:2732-2736.
274. Liu JM, Kim S, Walsh CE. Retroviral-mediated transduction of the fanconi anemia C complementing (FACC) gene in two murine transplantation models. *Blood Cells Mol Dis.* 1995;21:56-63.
275. Rio P, Segovia JC, Hanenberg H, et al. In vitro phenotypic correction of hematopoietic progenitors from Fanconi anemia group A knockout mice. *Blood.* 2002;100:2032-2039.
276. Haneline LS, Li X, Ciccone SL, et al. Retroviral-mediated expression of recombinant *Fancc* enhances the repopulating ability of *Fancc*^{-/-} hematopoietic stem cells and decreases the risk of clonal evolution. *Blood.* 2003;101:1299-1307.
277. Yamada K, Ramezani A, Hawley RG, et al. Phenotype correction of Fanconi anemia group A hematopoietic stem cells using lentiviral vector. *Mol Ther.* 2003;8:600-610.
278. Walsh CE, Grompe M, Vanin E, et al. A functionally active retrovirus vector for gene therapy in Fanconi anemia group C. *Blood.* 1994;84:453-459.
279. Follenzi A, Ailles LE, Bakovic S, Geuna M, Naldini L. Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat Genet.* 2000;25:217-222.
280. Cheshier SH, Prohaska SS, Weissman IL. The effect of bleeding on hematopoietic stem cell cycling and self-renewal. *Stem Cells Dev.* 2007;16:707-717.

281. Mazurier F, Doedens M, Gan OI, Dick JE. Rapid myeloerythroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD-SCID mice reveals a new class of human stem cells. *Nat Med.* 2003;9:959-963.
282. Wright DE, Wagers AJ, Gulati AP, Johnson FL, Weissman IL. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science.* 2001;294:1933-1936.
283. Buchwald M, Ng J, Clarke C, Duckworth-Rysiecki G. Studies of gene transfer and reversion to mitomycin C resistance in Fanconi anemia cells. *Mutat Res.* 1987;184:153-159.
284. Dufour C, Corcione A, Svahn J, et al. TNF-alpha and IFN-gamma are overexpressed in the bone marrow of Fanconi anemia patients and TNF-alpha suppresses erythropoiesis in vitro. *Blood.* 2003;102:2053-2059.
285. Duckworth-Rysiecki G, Taylor AM. Effects of ionizing radiation on cells from Fanconi's anemia patients. *Cancer Res.* 1985;45:416-420.
286. Wolber FM, Leonard E, Michael S, Orschell-Traycoff CM, Yoder MC, Srour EF. Roles of spleen and liver in development of the murine hematopoietic system. *Exp Hematol.* 2002;30:1010-1019.
287. Wang J, Otsuki T, Youssoufian H, et al. Overexpression of the fanconi anemia group C gene (FAC) protects hematopoietic progenitors from death induced by Fas-mediated apoptosis. *Cancer Res.* 1998;58:3538-3541.
288. Case SS, Price MA, Jordan CT, et al. Stable transduction of quiescent CD34(+)CD38(-) human hematopoietic cells by HIV-1-based lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:2988-2993.
289. Fagerlie SR, Diaz J, Christianson TA, et al. Functional correction of FA-C cells with FANCC suppresses the expression of interferon gamma-inducible genes. *Blood.* 2001;97:3017-3024.
290. Koh PS, Hughes GC, Faulkner GR, Keeble WW, Bagby GC. The Fanconi anemia group C gene product modulates apoptotic responses to tumor necrosis factor-alpha and Fas ligand but does not suppress expression of receptors of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Exp Hematol.* 1999;27:1-8.
291. Gush KA, Fu KL, Grompe M, Walsh CE. Phenotypic correction of Fanconi anemia group C knockout mice. *Blood.* 2000;95:700-704.
292. Guillouf C, Wang TS, Liu J, et al. Fanconi anemia C protein acts at a switch between apoptosis and necrosis in mitomycin C-induced cell death. *Exp Cell Res.* 1999;246:384-394.
293. Freie BW, Dutt P, Clapp DW. Correction of Fanconi anemia type C phenotypic abnormalities using a clinically suitable retroviral vector infection protocol. *Cell Transplant.* 1996;5:385-393.
294. Worsham DN, Schuesler T, von Kalle C, Pan D. In vivo gene transfer into adult stem cells in unconditioned mice by in situ delivery of a lentiviral vector. *Mol Ther.* 2006;14:514-524.
295. Gao Z, Golob J, Tanavde VM, Civin CI, Hawley RG, Cheng L. High levels of transgene expression following transduction of long-term NOD/SCID-repopulating human cells with a modified lentiviral vector. *Stem Cells.* 2001;19:247-259.

296. Battaile KP, Bateman RL, Mortimer D, et al. In vivo selection of wild-type hematopoietic stem cells in a murine model of Fanconi anemia. *Blood*. 1999;94:2151-2158.
297. Kennedy RD, D'Andrea AD. The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd. *Genes Dev*. 2005;19:2925-2940.
298. Klug CA, Cheshier S, Weissman IL. Inactivation of a GFP retrovirus occurs at multiple levels in long-term repopulating stem cells and their differentiated progeny. *Blood*. 2000;96:894-901.
299. Philippe S, Sarkis C, Barkats M, et al. Lentiviral vectors with a defective integrase allow efficient and sustained transgene expression in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:17684-17689.
300. Brown PO, Bowerman B, Varmus HE, Bishop JM. Retroviral integration: structure of the initial covalent product and its precursor, and a role for the viral IN protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:2525-2529.
301. Terskikh AV, Ershler MA, Drize NJ, Nifontova IN, Chertkov JL. Long-term persistence of a nonintegrated lentiviral vector in mouse hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*. 2005;33:873-882.
302. Martin DI, Whitelaw E. The vagaries of variegating transgenes. *Bioessays*. 1996;18:919-923.
303. Henikoff S. Position effect and related phenomena. *Curr Opin Genet Dev*. 1992;2:907-912.
304. Siemering KR, Golbik R, Sever R, Haseloff J. Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Curr Biol*. 1996;6:1653-1663.
305. Reid BG, Flynn GC. Chromophore formation in green fluorescent protein. *Biochemistry*. 1997;36:6786-6791.
306. Waldo GS, Standish BM, Berendzen J, Terwilliger TC. Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*. 1999;17:691-695.
307. Cramer A, Whitehorn EA, Tate E, Stemmer WP. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat Biotechnol*. 1996;14:315-319.
308. Doerfler W, Remus R, Muller K, Heller H, Hohlweg U, Schubert R. The fate of foreign DNA in mammalian cells and organisms. *Dev Biol (Basel)*. 2001;106:89-97; discussion 143-160.
309. Svoboda J, Hejnar J, Geryk J, Elleder D, Vernerova Z. Retroviruses in foreign species and the problem of provirus silencing. *Gene*. 2000;261:181-188.
310. Flanagan JR, Becker KG, Ennist DL, et al. Cloning of a negative transcription factor that binds to the upstream conserved region of Moloney murine leukemia virus. *Mol Cell Biol*. 1992;12:38-44.
311. Chen WY, Bailey EC, McCune SL, Dong JY, Townes TM. Reactivation of silenced, virally transduced genes by inhibitors of histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:5798-5803.
312. Chen WY, Townes TM. Molecular mechanism for silencing virally transduced genes involves histone deacetylation and chromatin condensation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:377-382.

313. Karpen GH. Position-effect variegation and the new biology of heterochromatin. *Curr Opin Genet Dev.* 1994;4:281-291.
314. Muller K, Heller H, Doerfler W. Foreign DNA integration. Genome-wide perturbations of methylation and transcription in the recipient genomes. *J Biol Chem.* 2001;276:14271-14278.
315. Yu X, Zhan X, D'Costa J, et al. Lentiviral vectors with two independent internal promoters transfer high-level expression of multiple transgenes to human hematopoietic stem-progenitor cells. *Mol Ther.* 2003;7:827-838.
316. Tahara-Hanaoka S, Sudo K, Ema H, Miyoshi H, Nakauchi H. Lentiviral vector-mediated transduction of murine CD34(-) hematopoietic stem cells. *Exp Hematol.* 2002;30:11-17.
317. McCauslin CS, Wine J, Cheng L, et al. In vivo retroviral gene transfer by direct intrafemoral injection results in correction of the SCID phenotype in Jak3 knock-out animals. *Blood.* 2003;102:843-848.
318. Peters SO, Kittler EL, Ramshaw HS, Quesenberry PJ. Murine marrow cells expanded in culture with IL-3, IL-6, IL-11, and SCF acquire an engraftment defect in normal hosts. *Exp Hematol.* 1995;23:461-469.
319. Szilvassy SJ, Bass MJ, Van Zant G, Grimes B. Organ-selective homing defines engraftment kinetics of murine hematopoietic stem cells and is compromised by Ex vivo expansion. *Blood.* 1999;93:1557-1566.
320. Varnum-Finney B, Xu L, Brashem-Stein C, et al. Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat Med.* 2000;6:1278-1281.
321. Chuck AS, Clarke MF, Palsson BO. Retroviral infection is limited by Brownian motion. *Hum Gene Ther.* 1996;7:1527-1534.
322. Haas DL, Case SS, Crooks GM, Kohn DB. Critical factors influencing stable transduction of human CD34(+) cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Mol Ther.* 2000;2:71-80.
323. Bouchlaka C, Abdelhak S, Amouri A, et al. Fanconi anemia in Tunisia: high prevalence of group A and identification of new FANCA mutations. *J Hum Genet.* 2003;48:352-361.
324. Meyer S, Fergusson WD, Whetton AD, et al. Amplification and translocation of 3q26 with overexpression of EVI1 in Fanconi anemia-derived childhood acute myeloid leukemia with biallelic FANCD1/BRCA2 disruption. *Genes Chromosomes Cancer.* 2007;46:359-372.
325. Li Z, Dullmann J, Schiedlmeier B, et al. Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science.* 2002;296:497.
326. Schroder AR, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell.* 2002;110:521-529.
327. Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science.* 2002;295:868-872.
328. Woods NB, Fahlman C, Mikkola H, et al. Lentiviral gene transfer into primary and secondary NOD/SCID repopulating cells. *Blood.* 2000;96:3725-3733.

329. Gregory JJ, Jr., Wagner JE, Verlander PC, et al. Somatic mosaicism in Fanconi anemia: evidence of genotypic reversion in lymphohematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:2532-2537.
330. Fischer A, Hacein-Bey S, Le Deist F, de Saint Basile G, de Villartay JP, Cavazzana-Calvo M. [Gene therapy for immune deficiencies]. *Bull Acad Natl Med*. 2000;184:1417-1428; discussion 1428-1430.
331. Fischer A, Hacein-Bey-Abina S, Cavazzana-Calvo M. Gene therapy for immunodeficiency diseases. *Semin Hematol*. 2004;41:272-278.
332. Kohn DB. Gene therapy for haematopoietic and lymphoid disorders. *Clin Exp Immunol*. 1997;107 Suppl 1:54-57.
333. Fischer A, Hacein-Bey-Abina S, Lagresle C, Garrigue A, Cavazana-Calvo M. [Gene therapy of severe combined immunodeficiency disease: proof of principle of efficiency and safety issues. Gene therapy, primary immunodeficiencies, retrovirus, lentivirus, genome]. *Bull Acad Natl Med*. 2005;189:779-785; discussion 786-778.
334. Lo Ten Foe JR, Kwee ML, Roomans MA, et al. Somatic mosaicism in Fanconi anemia: molecular basis and clinical significance. *Eur J Hum Genet*. 1997;5:137-148.
335. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint-Basile G, Le Deist F, Fischer A. [Gene therapy of severe combined immunodeficiencies]. *Transfus Clin Biol*. 2000;7:259-260.
336. Aiuti A, Vai S, Mortellaro A, et al. Immune reconstitution in ADA-SCID after PBL gene therapy and discontinuation of enzyme replacement. *Nat Med*. 2002;8:423-425.
337. Ishida R, Buchwald M. Susceptibility of Fanconi's anemia lymphoblasts to DNA-cross-linking and alkylating agents. *Cancer Res*. 1982;42:4000-4006.
338. Grompe M. The role of bone marrow stem cells in liver regeneration. *Semin Liver Dis*. 2003;23:363-372.
339. Kallis YN, Alison MR, Forbes SJ. Bone marrow stem cells and liver disease. *Gut*. 2007;56:716-724.
340. Howell JC, Yoder MC, Srouf EF. Hematopoietic potential of murine skeletal muscle-derived CD45(-)Sca-1(+)c-kit(-) cells. *Exp Hematol*. 2002;30:915-924.
341. Hayflick L. The cell biology of human aging. *N Engl J Med*. 1976;295:1302-1308.
342. Fischer A, Hacein-Bey-Abina S, Cavazzana-Calvo M. Gene therapy of metabolic diseases. *J Inherit Metab Dis*. 2006;29:409-412.
343. Kohn DB. Gene therapy for genetic haematological disorders and immunodeficiencies. *J Intern Med*. 2001;249:379-390.
344. Cattoglio C, Facchini G, Sartori D, et al. Hot spots of retroviral integration in human CD34+ hematopoietic cells. *Blood*. 2007;110:1770-1778.
345. Baum C, von Kalle C, Staal FJ, et al. Chance or necessity? Insertional mutagenesis in gene therapy and its consequences. *Mol Ther*. 2004;9:5-13.
346. Feng M, Jackson WH, Jr., Goldman CK, et al. Stable in vivo gene transduction via a novel adenoviral/retroviral chimeric vector. *Nat Biotechnol*. 1997;15:866-870.

347. Leroux C, Cadore JL, Montelaro RC. Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? *Vet Res.* 2004;35:485-512.
348. Siapati EK, Bigger BW, Miskin J, et al. Comparison of HIV- and EIAV-based vectors on their efficiency in transducing murine and human hematopoietic repopulating cells. *Mol Ther.* 2005;12:537-546.
349. Popp FC, Piso P, Schlitt HJ, Dahlke MH. Therapeutic potential of bone marrow stem cells for liver diseases. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2006;1:411-418.
350. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Pediatr Transplant.* 2003;7 Suppl 3:86-88.
351. Krause DS, Theise ND, Collector MI, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell.* 2001;105:369-377.
352. Cheng T, Rodrigues N, Shen H, et al. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science.* 2000;287:1804-1808.
353. Phillips RL, Ernst RE, Brunk B, et al. The genetic program of hematopoietic stem cells. *Science.* 2000;288:1635-1640.
354. High KA. The risks of germline gene transfer. *Hastings Cent Rep.* 2003;33:3.
355. Beslu N, Kros J, Laurin M, Mayotte N, Humphries KR, Sauvageau G. Molecular interactions involved in HOXB4-induced activation of HSC self-renewal. *Blood.* 2004;104:2307-2314.
356. Kajiume T, Ninomiya Y, Ishihara H, Kanno R, Kanno M. Polycomb group gene mel-18 modulates the self-renewal activity and cell cycle status of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol.* 2004;32:571-578.
357. Duncan AW, Rattis FM, DiMascio LN, et al. Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol.* 2005;6:314-322.
358. Thrasher AJ, Gaspar HB. Gene therapy for lympho-hematopoietic disorders. *Curr Hematol Rep.* 2005;4:305-309.
359. Liang Y, Van Zant G, Szilvassy SJ. Effects of aging on the homing and engraftment of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 2005;106:1479-1487.

CHAPITRE VI-ANNEXE 1

CULTURE *IN VITRO* & CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES

1- Introduction

Nous nous sommes interrogés sur les raisons qui font que les CSH Fanconi ont des difficultés à résister au stress induit par la culture *in vitro*.

Cette caractéristique constitue une réelle entrave à l'émergence d'une véritable thérapie génique *ex vivo*. Plusieurs groupes rapportent la perte des propriétés des CSH Fanconi, notamment leur capacité de prolifération et d'auto-renouvellement, après un court séjour *ex vivo*. Bien que ces difficultés soient connues de toute la communauté Fanconi, aucun groupe ne s'est jamais penché sur la question pour tenter de retracer l'origine des ces défaillances. Ces difficultés sont-elles le fait d'un défaut concentré sur une voie cellulaire unique? Ou sont-elles associées à l'altération de plusieurs processus biologiques?

Afin d'amorcer un début de compréhension de cette hypersensibilité, un examen des voies impliquées, dans la progression du cycle cellulaire (cyclines D1 et D2), la réparation de l'ADN (FANCA, FANCF), la prolifération (c-myc, Hoxb4 et p21), l'auto-renouvellement (Notch1, Hes1) et la différenciation (CtBP1) est réalisé, avant et après différentes périodes de culture *in vitro*, sur des CSH Fanconi et sauvages. Cette étape devait également permettre d'estimer l'ajustement de l'expression génique, dont sont capables les CSH Fanconi, après une courte période de culture *in vitro*, comparativement à leurs homologues sauvages. Une compréhension, même partielle, de ces altérations serait d'un grand bénéfice et permettrait entre autre, d'expliquer l'accumulation des défauts, après un séjour *in vitro*.

2- Matériels et méthodes

2-1- Techniques de biologie cellulaire

2-1-1 Prélèvement des cellules de la moelle osseuse

Ces informations ont déjà fait l'objet d'une description à la section 1-3-6-a

2-1-2 Purification des CSH

2-2-1-a Séparation par colonne négative

La purification des cellules Lin⁻ Thy1.2⁺ (LT) est dite négative, car les cellules indésirables sont marquées par des anticorps biotinylés et reconnus par un anticorps tétramérique biospécifique. Les diamètres des colonnes varient suivant la quantité totale de cellules à charger, aussi une estimation du nombre de cellules est effectuée, avant que la procédure de sélection ne soit initiée, selon le protocole recommandé par le fabricant.

Après le blocage des sites aspécifiques par le sérum de rat (5 %), un cocktail d'anticorps (CD5, CD45R, CD11b, Gr-1 et TER 119) est ajouté aux cellules (35 µL/mL StemCell Technologies). Les cellules Thy1.2⁻ de l'échantillon sont également marquées par l'ajout d'un anticorps α-Thy1.2⁻ (2 µL/mL, StemCell Technologies). Les cellules sont ensuite incubées 15 min, à 4°C, resuspendues dans 3 mL de PBS-2% FBS et centrifugées (8 min, 1400 rpm, 4°C). Le culot est resuspendu dans un volume variable de PBS-2% FBS ($\leq 10 \times 10^7$ cellules/mL) et complété d'un anticorps tétramérique dirigé contre la biotine (100 µL/mL StemCell Technologies). Cet anticorps est capable de reconnaître à la fois le dextran couplé aux particules de fer et la biotine (complexe tétramérique). Les cellules sont alors retenues dans la colonne magnétique, grâce aux particules de fer (StemStep, StemCell Technologies). Le complexe tétramérique abolit l'association de l'excès d'anticorps aux particules magnétiques. La suspension cellulaire est mélangée et placée 15 min à 4 °C. La solution est ensuite complétée par un volume de colloïde (60 µL/mL, StemCell Technologies), incubée 15 min à 4°C, avant d'être chargée sur la colonne.

La colonne, dont la tubulure est fixée sur une pompe péristaltique, aura préalablement été équilibrée, par l'ajout de PBS du tube vers la colonne à vitesse constante jusqu'à humidification complète de la matrice. Cette équilibration élimine les bulles d'air présentes dans la tubulure et est suivie d'un lavage, par ajout de 10 mL de PBS-2 % FBS, dans la colonne qui devront être pompés sans assécher la matrice. Seules les cellules non marquées, n'exprimant pas de marqueurs de lignée à leur surface (lignage négatif ou Lin-) sont collectées par filtration et récupérées, dans un Falcon 15 mL, la colonne lors du lavage de la colonne, au PBS-2% FSB (qsp 15mL). L'éluat récupéré (environ 15 mL) est centrifugé (1 400 rpm, 8 min, 4 °C), le culot resuspendu dans 200 µL de PBS-2% FBS et les cellules comptées à l'hémacytomètre. À cette étape, les cellules peuvent être directement utilisées dans le cadre de procédures d'extraction ARN ou de transplantation ou de culture. Les Lin-Thy1.2⁺ peuvent également faire l'objet d'une étape de séparation supplémentaire, après un marquage par les anticorps CD34-PE et Sca-1+-FITC, une fraction des cellules est utilisée pour la constitution de tubes de compensation et d'isotypes correspondants. Les cellules sont alors incubées à 15 min, à 4 °C dans le noir, lavées avec 3 mL de PBS-2% FBS, centrifugées (1 400 rpm, 8 min., 4 °C) et resuspendues dans 400 µL de PBS-2% FBS, avant d'être envoyé au service de cytométrie (Monsieur Maurice Dufour, CHUL). Une procédure de sélection positive, réalisée au laboratoire permet de purifier les cellules LTS-CD34⁺, LTS-CD34⁻, LT-Sca-1⁺ (LTS) ou LT-Sca-1⁻, en recourant à une séparation positive, au moyen du kit Easy Sep (StemCell Technologies).

2-2-1-b Séparation par colonne positive

Les cellules sont resuspendues à raison de 10⁸ cellules/mL et complétées d'un agent bloquant les récepteurs FcR (10 µL/mL, StemCell Technologies), présents sur certaines cellules (dont monocytes, macrophages).

Les cellules sont mélangées à la main. **(1)** Les cellules cibles sont dans un premier temps, marquées spécifiquement avec un anticorps biotinylé (Sca-1⁺-biotine ou CD34-biotine; 3 µg/mL, StemCell Technologies), elles sont mélangées à la main et incubées à TP, 15 min. **(2)** On procède ensuite à un lavage au PBS-2% FBS, à raison de 10 fois le volume initial (≤ 2,5 mL), avant de transférer les cellules dans un tube de polystyrène (Falcon 5 mL Polystyrene Round-Bottom Tubes, Becton Dickinson) s'adaptant à la partie aimantée du séparateur Easy Sep. **(3)** Après un mélange à la main, le cocktail de sélection contre la biotine (100 µL/mL, StemCell Technologies), est ajouté. L'ensemble est incubé, 15 min. à TP. **(4)** Avant son utilisation, le tube de nanoparticules magnétiques est mélangé par pipetage (5 fois) et 50 µL/mL de nanoparticules en suspension sont ajoutés aux cellules médullaires. Le tout est mélangé et incubé, 10 min. à TP. Elles sont marquées avec des nanoparticules magnétiques recouvertes de dextran (complexes d'anticorps tétramérique). Ces complexes reconnaissent à la fois le dextran et la molécule de biotine de l'anticorps biotinylé. **(5)** Le volume de la suspension cellulaire est ensuite complété de PBS-2% FBS (qsp 2,5 mL). Après trois mélanges par pipetage, les cellules marquées magnétiquement sont séparées des cellules non marquées par le complexe aimanté EasySep (StemCell Technologies). **(6)** À cet effet, le tube est placé dans le segment aimanté EasySep, pendant 5 min. Le tube est ensuite vidé de son contenu, tout en maintenant le bloc tube/aimant à l'envers pendant 3 sec. Cette étape permet de se libérer des cellules indésirables non marquées, alors que les cellules marquées restent dans le tube, grâce à l'aimant. **(7)** Le tube est retiré du segment aimanté et 2,5 mL de PBS-2% FBS sont ajoutés. Les étapes **(5)**, **(6)** et **(7)** sont répétées quatre fois. Lors du dernier renversement, le tube est retiré du segment aimanté et les cellules resuspendues dans 100 µL de milieu SFEM (*serum free essential media*, StemCell Technologies), supplémenté de 1 % antibiotiques (50 U/mL pénicilline, 50 µg/mL streptomycine, Life Technologies).

2-1-3 Transduction et culture in vitro des CSH

Les cellules LT ou LT CD34⁻ de souris FancC^{-/-} et sauvages de type CD45.2 sont comptées à l'hémacytomètre. Elles sont ensuite placées en culture, à raison de 20 000 cellules/puit, dans un milieu SFEM (*serum free essential media*, StemCell Technologies), 1% antibiotiques (50 U/mL pénicilline, 50 µg/mL streptomycine, Life Technologies), supplémentés avec rmSCF (*recombinant murine stem cell factor*, 100 ng/mL, StemCell), rmTPO (*recombinant murine thrombopoietin*, 10 ng/mL, StemCell), rmFlt3 (*recombinant murine* 100 ng/mL, R&D systems), rmIL-6 (10 ng, R&D systems). Lors de la transduction, le milieu est complété par l'ajout du surnageant viral (v/v). Les cellules sont cultivées 12 h, à 37°C, dans 5 % CO₂, avant d'être transplantées ou analysées en Q-PCR.

2-1-4 Transplantation de moelle osseuse

Dans le cadre d'une transplantation des CSH après culture *in vitro*, les souris receveuses CD45.1 sont placées sous tétracycline (0,4 mg/mL dans eau de boisson, 7 jours avant la transplantation). Le jour de la greffe, elles sont létalement irradiées (950 cG, GammaCell-40, MDS Nordion). Immobilisées dans un tube à contention (Falcon 50 mL immobilisé sur plaque de plexiglas) chaque souris est transplantée par une injection dans la veine de la queue, à raison de 100 µL de suspension cellulaire, soit 2 x 10⁴ cellules/souris, à l'aide d'une seringue 1cc et d'une aiguille 27G^{1/2} (Terumo). Si la veine n'est pas apparente, l'application d'une compresse chaude facilite sa visualisation. Les cellules transplantées sont constituées d'un mélange de cellules LTS CD34⁻ CD45.2 cultivées (2 500 cellules/souris) et de cellules de moelle totale CD45.1 fraîchement isolées le jour de la transplantation (2 x 10⁴ cellules/souris), à des fins de radioprotection. La capacité de reconstitution de ces cellules est déterminée par la survie des souris et l'analyse du pourcentage de cellules de la donneuse CD45.2.

2-1-5 Suivi de la modulation de l'expression génique

Pour évaluer la modulation de l'expression génique avant et après l'étape de culture *in vitro* et afin d'amorcer une explication sur l'origine de la mortalité des cellules, des CSH ont été maintenues en culture. Après l'étape de sélection les cellules Lin-Thy1.2-, CD34+ et CD34- ont été placées en culture, à raison de 25 000 cellules/puit, pendant des périodes de 0, 2, 5, 12 ou 16 h. *in vitro*. Une fraction de ces cellules recevait une stimulation par le facteur soluble Wnt3a (100 ng/mL). Après la culture, l'ARN a été extrait des cellules et a fait l'objet d'une analyse en Q-PCR.

2-2- Techniques de biologie moléculaire

2-2-1 PCR en temps réel - Principe

La réaction en chaîne par polymérase en temps réel (Q-PCR) est une technologie basée sur une réaction enzymologique (PCR) et sur la mesure en continu de son produit. L'analyse de la cinétique de la réaction de polymérisation permet d'obtenir une quantification absolue de la quantité initiale d'ADN cible, ce qui était très difficile à obtenir sans biais en PCR. En effet, à chaque cycle d'amplification, la quantité d'amplicon est mesurée grâce à un agent intercalant fluorescent qui ne se lie qu'à l'ADN double brin (SYBER Green®), provoquant une augmentation de sa fluorescence (excitation 494 nm, émission 521 nm). Grâce à sa très grande stabilité, il permet d'effectuer un grand nombre de cycles sans dégradation de la fluorescence émise. De plus, puisque plusieurs molécules de SYBER Green peuvent se lier à l'ADN, l'émission de fluorescence sera proportionnelle à la taille de l'amplicon. Cette caractéristique de liaison à l'ADN double brin possède un inconvénient majeur puisque cette liaison n'est pas spécifique du produit à amplifier. La spécificité de l'amplicon découle uniquement des amorces utilisées. Les séquences des amorces utilisées au cours de ce travail (**cf. tableau 1**) ont toutes été dessinées en combinant l'utilisation du logiciel Primer Premier, <https://www.rocke-applied-science.com> et <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Il existe différents appareils de Q-PCR, l'Unité de Pédiatrie du CHUL dispose d'un appareil Prism 7000 Detection System Applied Biosystem (ABI) doté du logiciel d'application SDS. Les expériences de Q-PCR ont pour la grande majorité étaient réalisées sur les CSH des souris, les cellules d'organes lymphoïdes (rate, thymus), quelques fois, sur des cellules humaines HEK 293T ou HeLa. Dans tous les cas, la procédure reste la même.

Tableau 1: Séquences des oligonucléotides utilisés pour la Q-PCR.

Genes	Brin	Séquence des amorces	position	longueur(pb)	T°C
<i>hGAPDH</i>	S-	ATGGGGAAGGTGAAGGTCG	103	122	60
	A-	TTGAGGTCAATGAAGGGGTCA			
<i>hHPRT</i>	S-	TGCAGACTTTGCTTTCCTTGG	513	89	60
	A-	AACACTTCGTGGGGTCCTTTT			
<i>mCyclineD1</i>	S-	GCGCCCTCCGTATCTTACTTC	252	109	60
	A-	CTTCGCACTTCTGCTCCTCAC			
<i>mCyclineD2</i>	S-	AAGTGCGTGCAGAAGGACATC	384	145	60
	A-	TCGGGACTCCAGCCAAGA			
<i>EGFP-N1</i>	S-	CTGACCTTGCTGTTACAAACCCTA	678	115	60
	A-	GCTCCCTGTGATTAGCTCCTG			

S : séquence sens A : séquence anti-sens

<i>Genes</i>	<i>Brin</i>	<i>Séquence des amorces</i>	<i>position</i>	<i>longueur(pb)</i>	<i>T°C</i>
<i>mCtBP1</i>	S-	CTCTTAGAATCATCGTCCGAATTG	423	127	60
	A-	AGGGTGGAGTCTGCCGTTT			
<i>mFancA</i>	S-	CCGCACAGGAAACAAGGATAT	3037	139	60
	A-	CAGCCGTCTTCTGAACACCC			
<i>mp21</i>	S-	TGAATATGAACCTGATCGCAAAA	253	118	60
	A-	AAAGAGGACCAGCACGGAGA			
<i>mc-myc</i>	S-	GCTGGACACGCTGACGAAA	130	72	60
	A-	AAATCCAGAGCACTGGTGGG			
<i>mHoxb4</i>	S-	ATTCACAGAGCGATTACCTACCC	130	115	60
	A-	AAATTTATTCCGACCCCTGACTTCCCGTT			
<i>mCDK2</i>	S-	TTCTGCCATTCTCACCGTGTC	534	104	60
	A-	GCTCTTGCTAGTCCAAAGTCTGC			
<i>mHes1</i>	S-	GAAGGCGGACATTCTGGAAA	464	143	60
	A-	AGCGGGTCACCTCGTTCAT			
<i>mNotch-1</i>	S-	TGGAGCCAAGCATGTCATCA	722	136	60
	A-	AGTGTCTTCTGTGAATGGGGTGT			
<i>mFancL</i>	S-	ATAGGAGCCATTGGTTGGGATA	483	118	60
	A-	TTGCCTTCAACTTGACAGTGATTAG			
<i>mFancG</i>	S-	CTGACCTTGCTGTTACAAACCCTA	503	198	60
	A-	GCTCCCTGTGATTAGCTCCTG			

2-2-2 PCR en temps réel - Procédure

2-2-2-a *Extraction de l'ARN total*

Après estimation du nombre total de cellules ($\leq 10^7$ cellules), les CSH (Lin-Thy1.2-, CD34-, CD34+) en suspension sont centrifugées (1 400 rpm, 5 min, 4 °C). Les cellules adhérentes cultivées sur pétris, sont au préalable trypsinisées (0,05 % Trypsine-EDTA 1X, Gibco), le lysat est centrifugé (1 400 rpm, 5 min, 4°C) et le surnageant délicatement aspiré. Cette étape ôte du culot toute trace de surnageant, dont la présence dilue le lysat et affecte la liaison de l'ARN à la membrane de la colonne. Le culot est resuspendu dans un tampon de lyse RLT (RNeasy mini Kit, Qiagen) supplémenté de 1 % β -mercaptoéthanol (RLT- β ME). Un volume de 350 μ L RLT- β ME (cellules $< 5 \times 10^6$) ou 600 μ L ($5 \times 10^6 \leq$ cellules $\geq 10^7$) est ajouté au lysat et vortexé 1 min, homogénéisé à la seringue (aiguille 20G, diamètre 0,9 mm), avant l'ajout de 700 μ L d'éthanol 70 % (EtOH 70 %). Après un mélange par pipetage, 700 μ L de la suspension sont déposés dans la colonne RNeasy (RNeasy mini Kit, Qiagen) et centrifugés ($\geq 10\ 000$ rpm, 15 sec). L'éluat est jeté et l'opération est répétée de façon à passer sur la colonne toute la suspension cellulaire. Après un rinçage avec 700 μ L de tampon RW1 (RNeasy mini Kit, Qiagen) et une centrifugation ($\geq 10\ 000$ rpm, 15 sec), 500 μ L de tampon de concentration RPE (RNeasy mini Kit, Qiagen) supplémenté en EtOH 100 % (1v. RPE pour 4v. EtOH) sont ajoutés. Après centrifugation ($\geq 10\ 000$ rpm, 2 min), la colonne est placée dans un nouveau tube eppendorf Rnase free. L'ARN est élué par ajout de 30 à 50 μ L d'eau Rnase-free, directement sur la membrane de la colonne et une centrifugation ($\geq 10\ 000$ rpm, 1 min). La concentration de l'ARN est estimée par mesure l'absorbance à 260 nm (A_{260}), dans un spectromètre de masse ne nécessitant pas de dilution et utilisant 1 μ L d'ARN (Nanodrop NP-1000, NanoDrop Technologies). La concentration est calculée automatiquement suivant la règle voulant qu'une unité A_{260} équivaille à une concentration d'ARN de 44 μ g/mL. Le ratio A_{260}/A_{280} estime la pureté de l'échantillon. Après le dosage, l'ARN est stocké à -80 °C ou utilisé, dans le cadre d'une réaction de RT-PCR.

2-2-2-b Reverse transcription-PCR (RT-PCR)

Le protocole couramment appliqué utilise 1 μ L d'ARN, 1 μ L de décamères (Ambion), et d'H₂O (qsp 12,5), avant que ne soit amorcé le lancement du programme de dénaturation (10 min. à 65°C). Les tubes sont ensuite placés sur glace, pendant 2 min, avant l'ajout de Dnase pour éliminer toute contamination à l'ADN génomique. La solution est complétée du mélange constitué de 4 μ L de tampon 5X (Invitrogen), 2 μ L DTT (0,1 M, Invitrogen), 1 μ L dNTP (10 μ M, Roche), 1 μ L SuperScript (200 u, Invitrogen) et de 1 μ L de Rnase Out (40 u./ μ L, Invitrogen), avant le lancement de la transcription inverse (60 min à 42 °C). Une étape d'inactivation de l'enzyme peut être réalisée (5 min, à 95°C).

2-2-2-c Lancement du Q-PCR

Le mélange est réalisé entre les oligonucléotides et la solution commerciale de Q-PCR Platinum SYBER Green (*qPCR Supermix-UDG with ROX*, Invitrogen) qui contient le SYBR Green I, l'enzyme Taq (*HotStar Platinum Taq DNA Polymerase*, Invitrogen), les nucléotides (400 μ M dATP, 400 μ M dCTP, 400 μ M dGTP, 800 μ M dUTP), le tampon (Tris-HCl, KCl, 6 mM MgCl₂), ainsi que de la fluorescéine nécessaire à la calibration de l'appareil (1 μ M ROX). Chaque réaction représentée par un puits, est un mélange de *Platinum SYBER Green qPCR Supermix-UDG with ROX* (Invitrogen); H₂O DEPC (qsp 23 μ L); oligonucléotides sens et antisens (10 μ M) et d'ADNc à quantifier (100 pg à 1 μ g). Le mélange de réaction est déposé en duplicata, dans une plaque 96 puits, qui est ensuite recouverte d'un film plastique autocollant et placée dans son support de réaction, dans l'appareil ABI Prism 7000. Le programme SDS permet de créer une représentation nominative de la plaque, avec la position de chaque échantillon et de chaque standard. Le programme de PCR entré manuellement, doit être constitué de deux étapes, la phase initiale d'activation de la réaction de PCR (2 min, à 95 °C) active l'ADN polymérase HotStar Platinum Taq.

La seconde étape répétée sur 35 à 40 cycles est constituée de trois niveaux: la dénaturation (15 sec. à 95°C), l'appariement (30 sec. à 50°C à 60°C, i.e 5°C à 8°C sous la T_m des amorces) et l'extension (30 sec. à 72°C) qui permet l'intégration de la fluorescence. Le programme de gestion de l'appareil permet également de visualiser les courbes de fusion (dérivée de la fluorescence par rapport à la température), de l'ensemble des puits de manière à évaluer la spécificité des réactions d'amplification. Pour un même couple d'amorces, tous les produits PCR doivent avoir une unique et même température de fusion. Si cette condition n'est pas remplie, il faut suspecter une contamination des échantillons ou un artefact du au mauvais appariement des amorces sur l'ADNc à quantifier (cf. Melt Curve). La température d'hybridation du programme peut être relevée de façon à limiter l'hybridation aspécifique des amorces et l'amplification aspécifique subséquente.

3- Résultats

J'ai obtenu l'ensemble des résultats présentés dans cette section, j'ai été assistée dans le sacrifice des souris successivement par Mesdames Nancy Messier, Marie-Chantal Delisle et Valérie Bourdages. Les procédures de culture des CSH et de transplantation avaient déjà été initiées dans le laboratoire, avant mon arrivée. J'ai procédé aux mises au point des procédures de transduction lentivirale des CSH *in vitro*, ainsi qu'à la préparation des surnageants. Toutes les expériences de préparation du matériel génique, de quantification des transcrits ainsi que la standardisation des études en Q-PCR, la séparation des cellules LT, dans certains cas des LT CD34⁺, ont été réalisées par mes soins.

La première partie de ce travail, expose les résultats obtenus, lors du recours à la thérapie génique par correction *in vitro*, au moyen de transductions lentivirales. Les expériences de transplantations, permettent d'estimer la capacité des CSH Fanconi et sauvages transduites à reconstituer un processus hématopoïétique complet, dans des souris receveuses. Le second volet relatif à la correction *in vitro*, aborde les altérations de voies cellulaires majeures qui peuvent être affectées, lors d'un séjour *ex vivo*, plus ou moins long des CSH.

3-1 Survie cellulaire après la culture *in vitro*

Plusieurs groupes dont le nôtre ont contribué à démontrer l'hypersensibilité des CSH Fanconi, à la culture *in vitro*¹. Laquelle sensibilité se traduit par une augmentation du processus apoptotique, une altération des capacités de reconstitution et de prolifération des CSH Fanconi. Dans un organisme receveur, ces cellules sont responsables de l'émergence de plusieurs anomalies hématopoïétiques, comme la pancytopenie et l'hyperplasie². En dépit de leur susceptibilité à la manipulation *in vitro*, des expériences de complémentation ont été toutes de même tentées sur les cellules LT, au moyen de transfusions lentivirales. Nous nous interrogeons sur la possibilité de contrecarrer les effets de la culture en réduisant le temps de culture dans un contexte de correction génique.

3-2- Modulation de l'expression génique, après culture *in vitro*

La difficulté des CSH Fanconi à résister au stress induit par la culture *in vitro*, constitue une réelle entrave à l'émergence d'une thérapie génique *ex vivo*. Nous nous sommes interrogés sur l'origine de ces défauts, sont-ils le fait d'une altération concentrée sur une voie cellulaire unique ou sur plusieurs? Il existe dans le contexte Fanconi différents protocoles de correction génique *ex vivo*, dans lesquels les équipes placent les cellules de 12 à 72h *in vitro*. Comme l'ont montré Hanneline et al et comme notre équipe l'a approuvé, il apparaît évident que le temps de culture affecte grandement les capacités des CSH Fanconi.

Afin d'amorcer une piste dans la compréhension de cette hypersensibilité, un examen des voies impliquées, dans la progression du cycle cellulaire (cyclines D1 et D2), la réparation de l'ADN (FancA, FancF), la prolifération (c-myc, Hoxb4 et p21), l'autorenouveaulement (Notch-1, Hes1) et la différenciation (CtBP1) a été réalisé des CSH Fanconi et sauvages, avant et après différentes périodes de culture *in vitro*. Ces études devaient également permettre d'estimer l'ajustement de l'expression génique, dont sont capables les CSH Fanconi, après une courte période de culture *in vitro*, comparativement à leurs homologues sauvages. Une compréhension, même partielle, de ces altérations permettrait entre autres, d'expliquer les défauts accumulés dans les cellules Fanconi, après un séjour *in vitro*. Dans un premier temps, l'examen de la capacité de différenciation a été évalué, en observant les modulations de l'expression du transcrit *CtBP1*.

3-2-1 Expression du transcrit CtBP1, dans les CSH après culture in vitro

Identifiée dans le cadre d'un autre projet recherche au laboratoire, la protéine CtBP1 agit comme corégulateur transcriptionnel³ lors de la différenciation des CSH, notamment dans les contextes de transformations néoplasiques⁴. L'histogramme présenté à la **figure 1**, montre qu'à l'état basal, les cellules Lin- Thy1.2- (LT) sauvages expriment un niveau moyen de 0,3 unité arbitraire (u.a.) de transcrit CtBP1, alors que la proportion est réduite de moitié dans les cellules LT FancC^{-/-}. Une culture *in vitro* de 2 h, hors de toute stimulation par un facteur chimique, réduit d'un facteur 4 le niveau du transcrit, dans les cellules LT sauvages, alors qu'il n'est que légèrement réduit, les 2 premières heures, dans les cellules LT FancC^{-/-}. Après 5h de culture, *in vitro*, alors que les LT sauvages maintiennent à un niveau constant le niveau du transcrit, les LT FancC^{-/-} présentent une surexpression d'un facteur 6,5 son expression. La culture *in vitro* contribue à moduler à la hausse l'expression de *CtBP1*, après 5h, dans les cellules Fanconi.

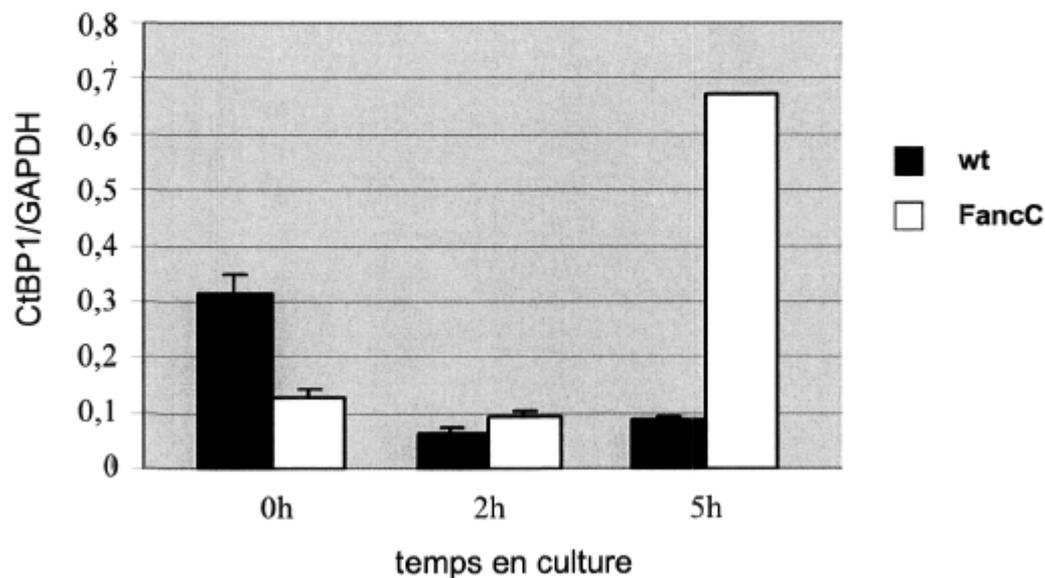
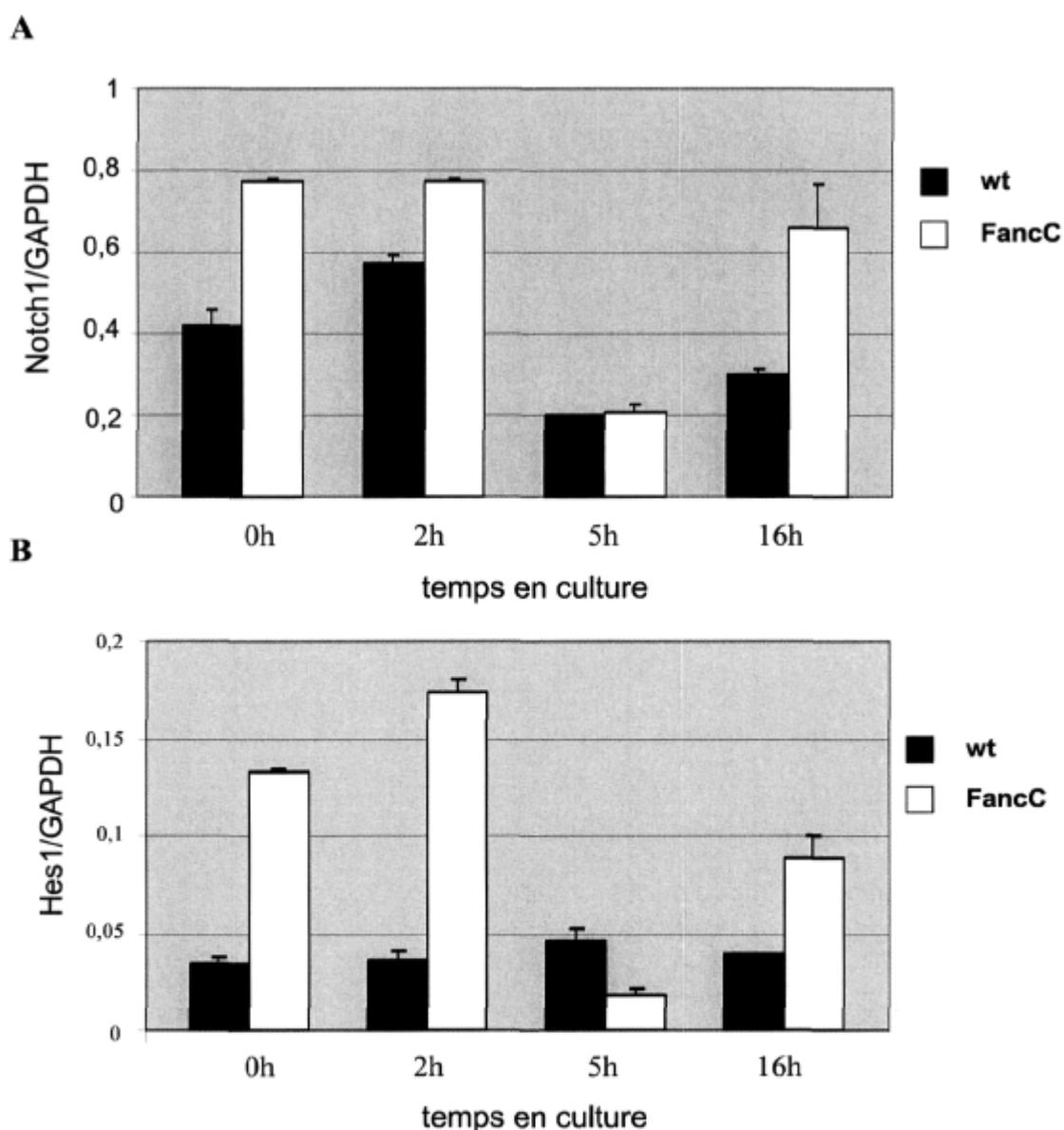


Figure 1 : Expression du transcrit *CtBP1* après culture *in vitro*

Analyse en Q-PCR de l'expression du transcrit *CtBP1*, dans les cellules Lin-Thy1.2- sauvages et *FancC*^{-/-}, à l'état basal et après 2 h et 5 h de culture *in vitro*. Les données représentent l'expression relative du gène. Deux expériences indépendantes, sur des animaux différents sont réalisées en duplicata, +/- écart-type.

3-2-2 Expression des transcrits *Notch-1* et *Hes1*, dans les CSH après culture *in vitro*

La voie de signalisation Notch-1 détermine le devenir de nombreux types cellulaires et se retrouve impliquée, au cours des étapes d'autorenouveau et de différenciation des CSH. Dans les cellules LT *FancC*^{-/-} non cultivées, le niveau du transcrit *Notch-1* est environ deux fois plus élevé, que le niveau basal, dans les cellules sauvages (**figure 2A**). Après 2 h de culture *in vitro*, les LT sauvages majorent de 50 % l'expression du transcrit (0,57 u.a.), alors que les cellules *FancC*^{-/-} qui semblent avoir atteint un plafond, sont incapables de moduler à la hausse l'expression de *Notch-1*, dont le niveau est constant avec celui du temps zéro (0,78 u.a.).



Figures 2 : Expression des transcrits *Notch-1* et *Hes1* après culture *in vitro*

(A) Analyse en Q-PCR de l'expression du transcrit *Notch-1* et (B) du transcrit *Hes1* dans les Lin- Thy1.2- sauvages et *FancC*^{-/-} à l'état basal et après 2, 5 et 16 h de culture *in vitro*. Les données représentent l'expression relative du gène. Cinq expériences indépendantes en duplicata, +/- écart-type.

À 5 h, les niveaux du transcrit sont respectivement réduits de 75 % et 60 %, dans les LT FancC^{-/-} et les sauvages, par rapport à l'expression à la 2^{ème} heure de culture. Après 5h de culture *in vitro*, les niveaux de *Notch-1* s'égalisent entre les deux génotypes. Donc, la boucle de rétro-régulation négative de la voie Notch est efficace et effective. Cette modulation se poursuit avec la majoration de 50 % l'expression du transcrit à 16h, dans les LT sauvages, alors qu'elle est de plus de 200 % dans les LT FancC^{-/-}. En culture, l'expression de *Notch-1* obéit à un phénomène oscillatoire. Alors qu'à l'état basal, ces expériences démontrent que le transcrit *Notch-1* est surexprimé à l'état basal, dans les cellules LT FancC^{-/-}, la culture contribue à rétro-réguler positivement d'abord (de 0 à 2h) et négativement ensuite (de 2 à 5h) son expression dans les LT quel que soit le groupe génotypique. Donc au cours d'un séjour *ex vivo*, ce transcrit fait l'objet d'une importante modulation d'expression dans les CSH.

Le principal effecteur de la voie de signalisation Notch-1 est le facteur Hes1. afin d'évaluer l'activité de la voie Notch-1, l'expression des Hes-1 a fait l'objet d'un suivi, lors de la culture *in vitro* (**figure 2B**). Comme pour *Notch-1*, on note dans les cellules FancC^{-/-} le même phénomène oscillatoire pour *Hes1*. Par ailleurs, comme pour *Notch-1*, du fait d'une surexpression à l'état basal, les effets de la culture *in vitro* sur l'expression de Hes1 ne sont pas visibles, les deux premières heures. Ces données montrent qu'à l'état basal, le transcrit *Hes1* est trois fois plus exprimé dans les LT FancC^{-/-} que dans les sauvages. Ce phénomène est majoré, après 2 h de culture *in vitro*, puisque les LT FancC^{-/-} augmentent d'un facteur 1,4 son expression, quand les sauvages la maintiennent au niveau basal. À la 5^{ème} heure de culture, il se produit une rétro-régulation négative l'expression de Hes1, dans les LT FancC^{-/-} réduisant près de 7 fois le taux de transcrit, soit un niveau moitié moindre que celui des sauvages. Dans le même temps, les cellules LT sauvages l'ajustent à la hausse. Contrairement à ce qui est observé chez les sauvages, chez les FancC^{-/-} cette rétro-régulation négative ne se maintient pas, puisque le niveau du transcrit à 16 h y est augmenté d'un facteur cinq, comparativement au niveau de 5 h.

Donc la régulation tant *in vitro*, qu'*in vivo* semble perturbée chez les $FancC^{-/-}$, puisque comparativement aux sauvages, elles sont incapables de maintenir une expression stable du transcrit, après 16 h. de culture *in vitro*. Si cette observation doit être complétée par l'étude d'autres gènes, elle suggère néanmoins que les méfaits sur les CSH Fanconi pourraient être amoindris, en limitant la culture *in vitro* (≤ 2 h).

3-2-3 Expression du transcrit *HoxB4*, dans les CSH après culture *in vitro*

À l'état natif, les cellules LT sauvages expriment un taux moyen de 1 u.a. de transcrit *HoxB4*, alors que dans les mêmes conditions, les cellules LT issues de souris $FancC^{-/-}$ expriment un taux 4 fois plus élevé (figure 3).

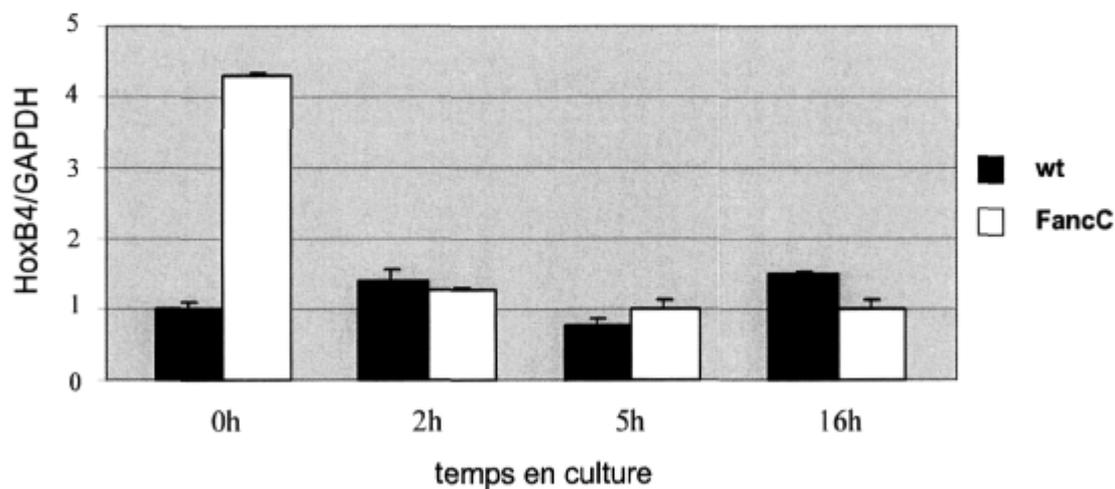


Figure 3 : Expression du transcrit *HoxB4* après culture *in vitro*

Analyse en Q-PCR de l'expression du transcrit *HoxB4*, dans les Lin- Thy1.2-sauvages et $FancC^{-/-}$, à l'état basal et après 2, 5 et 16h de culture *in vitro*. Les données représentent l'expression relative du gène. Deux expériences indépendantes en duplicata, +/- écart-type.

Après 2 h *in vitro*, dans les cellules LT FancC^{-/-}, le taux du transcrit *HoxB4* est réduit d'un facteur 4 et devient comparable à celui des sauvages, soit à 1 u.a. Les taux sont à nouveau soumis à une faible baisse après 5h de culture, se traduisant par une réduction plus franche chez les sauvages (facteur 2). Alors que chez les FancC^{-/-}, la réduction est moins marquée (facteur 1,25). Au delà de la 5^{ème} heure et jusqu'à la 16^{ème}, l'expression du transcrit est majorée de deux fois chez les sauvages, quand le niveau d'expression général du transcrit reste stable, dans les cellules FancC^{-/-}. La culture *in vitro* semble affecter l'autorenouvellement des cellules avec des conséquences plus marquées pour les cellules Fanconi. Les modulations observées jusqu'alors semblaient indiquer une altération dans les processus reliés à la différenciation et à la maturation des cellules LT. L'effet de la culture *in vitro*, sur le cycle cellulaire est tout aussi important. À fin d'en évaluer les conséquences, le profil d'expression des *cyclines D1* et *D2* a été examiné, dans les LT CD34⁺ et CD34⁻. Ces deux sous-populations sont diversement utilisées dans les procédures de correction génique de l'AF.

3-2-4 Expression du transcrit *cycline D1*, dans les CSH après culture *in vitro*

3-2-4-a Expression du transcrit *cycline D1*, dans les cellules CD34⁻ après culture

La culture *in vitro* agit également sur le cycle cellulaire des cellules CD34⁻, dont le taux de transcrit de *cycline D1* augmenté après 16h de culture (**figure 4**). À l'état basal, dans les CD34⁻ FancC^{-/-}, la *cycline D1* est majorée à l'état basal de 50 % comparativement à son niveau dans les cellules sauvages. Après 16h de culture *in vitro*, l'expression de la *cycline D1* est doublée dans les FancC^{-/-}, comparativement au temps zéro.

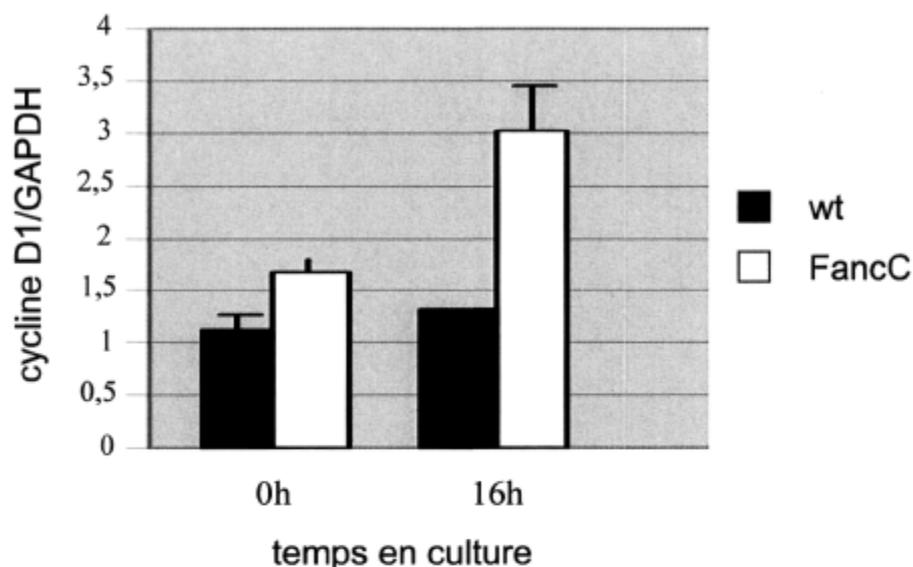


Figure 4 : Expression du transcrit *cycline D1* après culture *in vitro* des CD34-

Analyse en Q-PCR de l'expression du transcrit *cycline D1*, dans les cellules CD34- sauvages et FancC^{-/-}, à l'état basal et après 16h. de culture *in vitro*. Les données représentent l'expression relative du gène. Deux expériences indépendantes en duplicata, sur deux animaux différents, +/- écart-type.

Alors que l'effet n'est pas retrouvé dans les cellules CD34⁻ sauvages, puisqu'une culture *in vitro* de 16h ne module que très modestement l'expression de la *cycline D1*, dont le niveau passe de 1,1 à 1,25 u.a.

3-2-4-b Expression du transcrit *cycline D1*, dans les cellules CD34⁺ après culture

Le profil d'expression de la *cycline D1* a également été analysé dans les cellules CD34⁺ qui correspondent à un état plus avancé dans la différenciation comparativement aux CD34⁻ (**figure 5**).

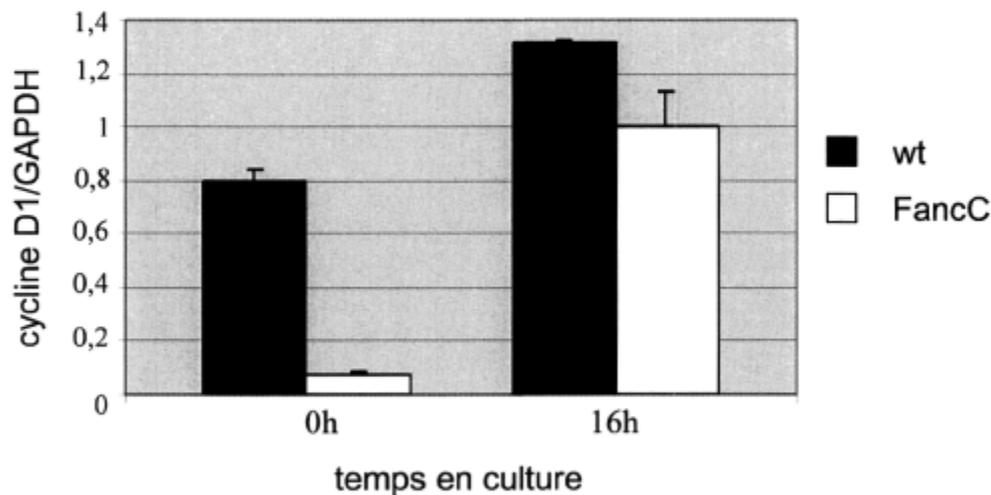


Figure 5 : Expression du transcrit *cycline D1* après culture *in vitro* des CD34+

Analyse en Q-PCR de l'expression du transcrit *cycline D1*, dans les cellules CD34⁺ sauvages et FancC^{-/-}, à l'état basal et après 16h. de culture *in vitro*. Les données représentent l'expression relative du gène. Deux expériences indépendantes en duplicata, sur deux animaux différents, +/- écart-type.

La culture *in vitro* semble également agir sur la modulation du cycle cellulaire des cellules CD34⁺ du moins celles issues de FancC^{-/-}, via une augmentation de l'expression de la *cycline D1*. Déjà à l'état basal, la *cycline D1* est en moyenne 8 fois moins exprimée dans les CD34⁺ FancC^{-/-} que dans les sauvages. Après 16h de culture *in vitro*, la présence du transcrit est augmentée d'un facteur 10 chez les FancC^{-/-} et d'un facteur 1,6 dans les sauvages. En dépit de l'augmentation spectaculaire du transcrit dans les CD34⁺ FancC^{-/-}, le niveau de D1 reste en moyen 1,3 fois plus bas dans les sauvages. Les cellules CD34⁺ FancC^{-/-} semblent éprouver des difficultés dans la progression du cycle cellulaire, difficultés déjà présentes *in vivo*. Ces problèmes sont donc inhérents la nature même des cellules Fanconi.

3-2-5 Expression du transcrit *FancA*, dans les CSH après culture *in vitro*

3-2-5-a Expression du transcrit *FancA* dans les cellules CD34⁺ après culture

Comme évoqué précédemment, l'expression de nombreux gènes clés est largement affectée par la culture *in vitro*, mais qu'en est-il des gènes Fanconi ?

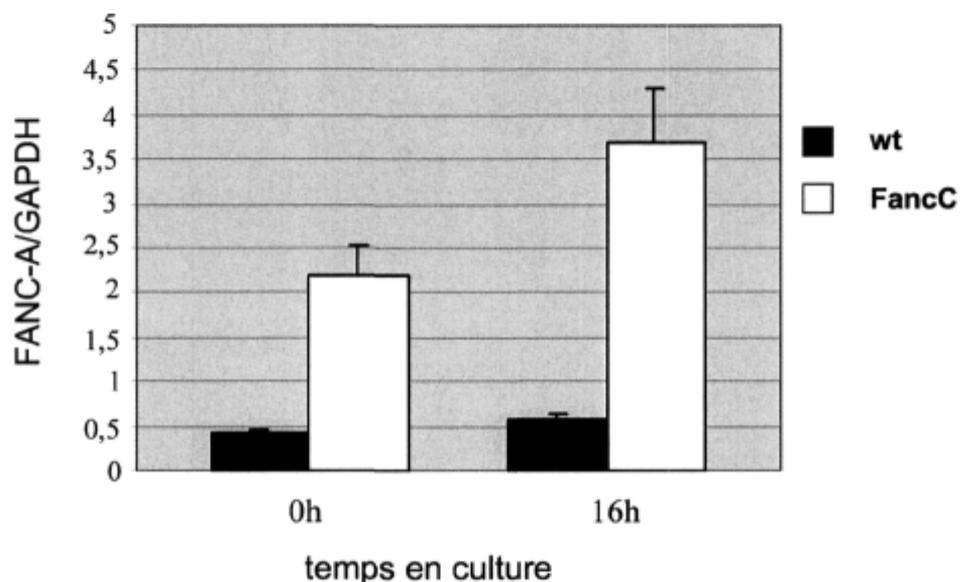


Figure 6 : Expression du transcrit *FancA* après culture *in vitro* des CD34-

Analyse en Q-PCR de l'expression du transcrit *FancA*, dans les CD34⁺ sauvages et FancC^{-/-}, à l'état basal et après 16h de culture *in vitro*. Les données représentent l'expression relative du gène. Deux expériences indépendantes en duplicata, sur deux animaux différents +/- écart-type.

Afin de déterminer si cette modulation génique induite par la culture *in vitro*, se répercute sur cette famille de gènes, les cellules CD34⁻ et CD34⁺ ont été placées en culture pendant 16h et l'expression du transcrit *FancA* comparée, entre l'état basal et l'état post-culture (figure 6).

Les résultats permettent de constater une différence significative de l'expression de *FancA* selon l'appartenance génotypique. À l'état basal, dans les sauvages, le niveau de *FancA* se maintient même après 16h de culture *in vitro*. Alors qu'à l'état basal, dans les cellules CD34⁻ Fanconi, l'expression du transcrit *FancA* est surexprimée de 4 fois comparativement aux sauvages. Après 16h de culture, les CD34⁻ sauvages ne majorent que très faiblement l'expression de *FancA*, quand les CD34⁻ FancC^{-/-} présentent un taux de *FancA* presque doublé (facteur 1,6), comparativement à leur niveau basal. L'expression de *FancA* dans les CD34⁻ FancC^{-/-} est après 16h, 7 fois plus importante que dans les sauvages. La culture *in vitro* majore l'expression du transcrit, cette surexpression constitue une manière pour les Fanconi de résister aux dommages induits par la culture.

3-2-5-b Expression du transcrit *FancA* dans les cellules CD34⁺ après culture

Contrairement à ce qui a été observé dans les cellules CD34⁻, le transcrit *FancA* dans les CD34⁺ est modulé d'une toute autre manière. Les cellules CD34⁺ FancC^{-/-} majorent d'un facteur 3 son niveau, comparativement aux sauvages (**figure 7**).

Après 16h de culture *in vitro*, dans les CD34⁺ FancC^{-/-}, le taux de *FancA* est réduit d'un facteur 1,2, quand les CD34⁺ sauvages l'augmentent de 3,4 fois par rapport à leur niveau de base. La modulation de *FancA* dans les cellules CD34⁺ est également très différente de ce qu'elle est dans les CD34⁻.

La culture a donc également un effet, en modulant l'expression du transcrit *FancA*, dans les cellules FancC^{-/-}, les CD34⁺ autant que les CD34⁻. Cependant, chez les sauvages, cette modulation d'expression n'est observable que pour les cellules CD34⁺. Cette différence de modulation témoigne certainement d'une différence dans la fonctionnalité des deux types cellulaires.

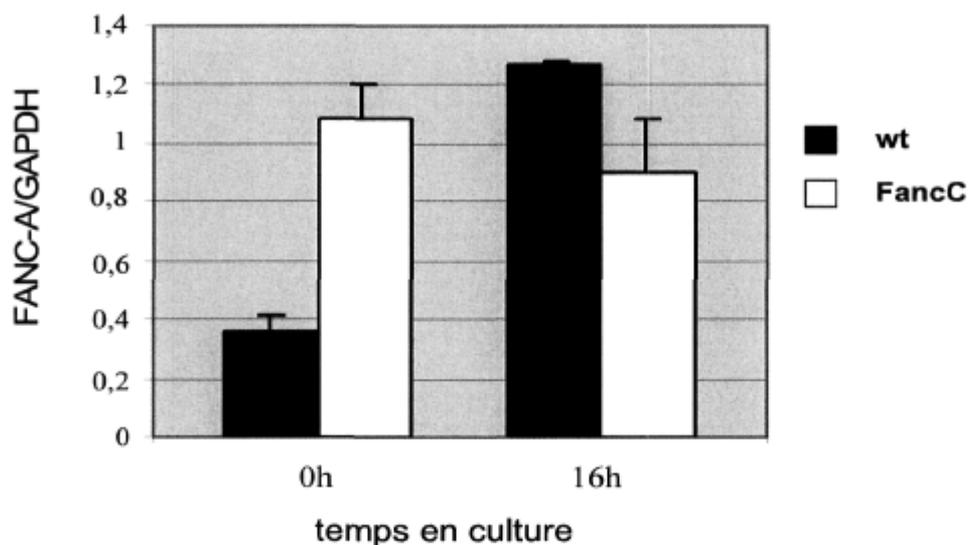


Figure 7 : Expression du transcrit *FancA* après culture *in vitro* des CD34+

Analyse en Q-PCR de l'expression du transcrit *FancA*, dans les CD34+ sauvages et *FancC*^{-/-}, à l'état basal et après 16h de culture *in vitro*. Les données représentent l'expression relative du gène. Deux expériences indépendantes en duplicata, sur deux animaux différents, +/- écart-type.

L'étude de la protéine FancA est d'autant plus intéressante que cette dernière agit comme un élément clé de la stabilisation et de la génération du complexe Fanconi.

3-2-6 Expression du transcrit *FancF*, dans les CSH après culture *in vitro*

3-2-6-a Expression du transcrit *FancF* dans les cellules CD34- après culture

L'examen du gène *FancF* démontre que son expression n'est aucunement altérée à l'état basal, dans les cellules CD34⁻ *FancC*^{-/-}, dans lesquelles le niveau est comparable à celui des sauvages (**figure 8**).

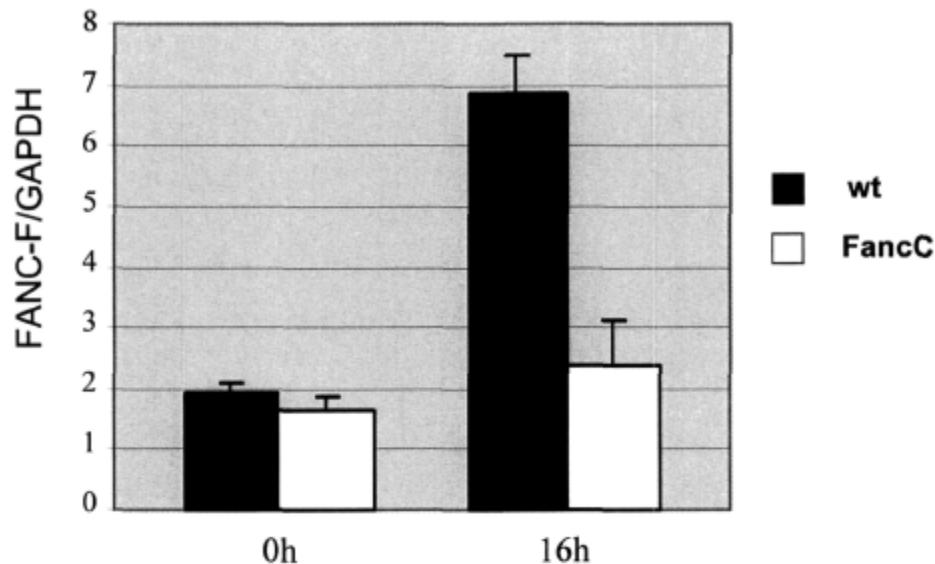


Figure 8 : Expression du transcrit *FancF* après culture *in vitro* des CD34-

Analyse en Q-PCR de l'expression du transcrit *FancF*, dans les CD34- sauvages et FancC^{-/-}, à l'état basal et après 16h de culture *in vitro*. Les données représentent l'expression relative du gène. Deux expériences indépendantes en duplicata, sur deux animaux différents +/- écart-type.

Cependant, après 16h de culture, alors que les CD34⁺ sauvages augmentent d'un facteur 3,5 l'expression du transcrit *FancF*, chez les FancC^{-/-} l'augmentation est à peine perceptible (facteur 1,3). Cette modulation se traduit par une expression du transcrit *FancF*, de près de 3 fois supérieure dans les sauvages après 16h de culture comparativement aux FancC^{-/-}. La culture *in vitro* induit l'expression majorée de *FancF* dans les sauvages, mais pas dans les FancC^{-/-}. Compte tenu du fait que le transcrit *FancF* est modulé de façon différentielle selon le génotype des cellules (sauvage ou FancC^{-/-}) et également par rapport à *FancA*, on peut penser que cette différence de profil suggérer une fonction différente des deux protéines, et ce, hors du complexe Fanconi.

3-2-6-b Expression du transcrit *FancF* dans les cellules CD34⁺ après culture

Lorsqu'on s'intéresse à la modulation par la culture *in vitro* du transcrit *FancF*, dans les cellules CD34⁺, les constatations sont quelque peu différentes (**figure 9**).

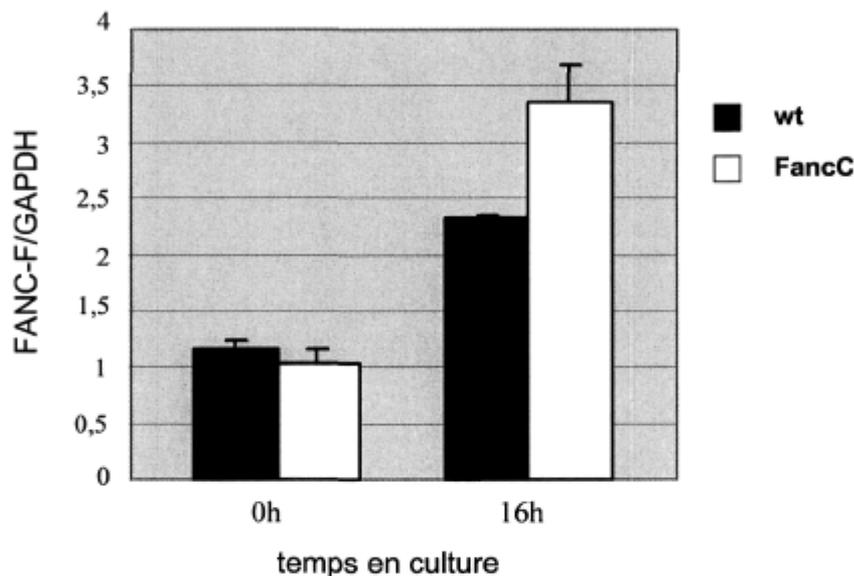


Figure 9 : Expression du transcrit *FancF* après culture *in vitro* des CD34⁺

Analyse en Q-PCR de l'expression du transcrit *FancF*, dans les CD34⁺ sauvages et *FancC*^{-/-}, à l'état basal et après 16h de culture *in vitro*. Les données représentent l'expression relative du gène. Deux expériences indépendantes en duplicata, sur deux animaux différents +/- écart-type.

Comme pour les CD34⁺, il apparaît qu'à l'état natif, dans les cellules CD34⁺, les niveaux du transcrit *FancF* sont comparables entre les sauvages et les *FancC*^{-/-}. La culture *in vitro* augmente l'expression de *FancF*, quel que soit le génotype des cellules CD34⁺. Alors que l'expression est augmentée d'un facteur 2, dans les sauvages après 16h de culture, dans les cellules *FancC*^{-/-}, l'augmentation est beaucoup plus importante, soit d'un facteur 3,4.

Après 16h, FancF est en moyenne 1,5 fois plus exprimé dans les CD34⁺ FancC^{-/-} que dans les sauvages. Cette observation contraste avec la modulation de l'expression du même transcrite dans les cellules CD34⁻. Chez les FancC^{-/-}, le gène *FancA* semble important pour l'activité des CD34⁺. Par ailleurs, il est envisageable que les défauts se concentrent au niveau des cellules souches primitives, les CD34⁻.

La culture a clairement démontré avoir des effets tant sur les sauvages que sur les FancC^{-/-}, en majorant dans les deux cas, l'expression des gènes *CtBP1*, *Notch-1*, *FancA* et *FancF*. Alors que seules les cellules FancC^{-/-} font face à une modulation différentielle de l'expression des gènes *cycline D1* et *Hes1*.

Les observations faites jusqu'à présent confirment la difficulté des CSH Fanconi à résister à la culture *in vitro*, difficultés qui semblent majorées par la durée de la culture *in vitro* et qui sont plus préjudiciables aux cellules les plus primitives, les CD34⁻. Les données démontrent que cette étape induit véritablement un stress cellulaire oxydatif qui se traduit par une profonde altération de plusieurs voies cellulaires majeures.

3-3 Capacité des CSH à répondre au stimulus, lors de la culture *in vitro*

Parallèlement à l'étude de la modulation génétique induite par la culture *in vitro* et ci-dessus présentée, la capacité des CSH FancC^{-/-} et sauvages à répondre à des stimuli de prolifération ou de différenciation a également été testée. Cette étape était nécessaire pour évaluer l'ampleur de l'atteinte et les conséquences de la culture sur la fonctionnalité des certaines voies dans les CSH. Cette étude comparative a été opérée au moyen d'analyses en Q-PCR, du matériel génétique des cellules, après l'étape de culture *in vitro*.

Dans ce contexte, les cellules Lin⁻Thy1.2⁻ et CD34, de souris sauvages ou FancC^{-/-} ont fait l'objet d'une culture *in vitro*, durant laquelle les cellules ont été mises en présence du facteur soluble Wnt3a.

3-3-1 Expression du transcrit *Notch-1* dans les CSH stimulées lors de culture *in vitro*

3-3-1-a Expression du transcrit *Notch-1* dans les cellules *Lin-Thy1.2-*

Les réponses aux signaux extracellulaires tels que Wnt et Notch-1, sont étroitement reliées aux capacités d'autorenouvellement et de maintenance des CSH et des progéniteurs. Lors de précédentes analyses, il est apparu que le transcrit *Notch-1* faisait l'objet d'une forte modulation, lors de la culture *in vitro*, dans toutes les cellules LT, quelles soient sauvages ou *FancC*^{-/-}. La principale interrogation était de déterminer si un séjour *in vitro*, pouvait se traduire par l'atteinte fonctionnelle de cette voie. Pour répondre à cette question, les cellules LT ainsi que les cellules CD34⁺ ont été stimulées, sur une période de 12h, avec le facteur Wnt3a. Des analyses au moyen de Q-PCR devaient permettre d'estimer l'activité de la voie Notch-1 pré et post-stimulation (**figure 10**).

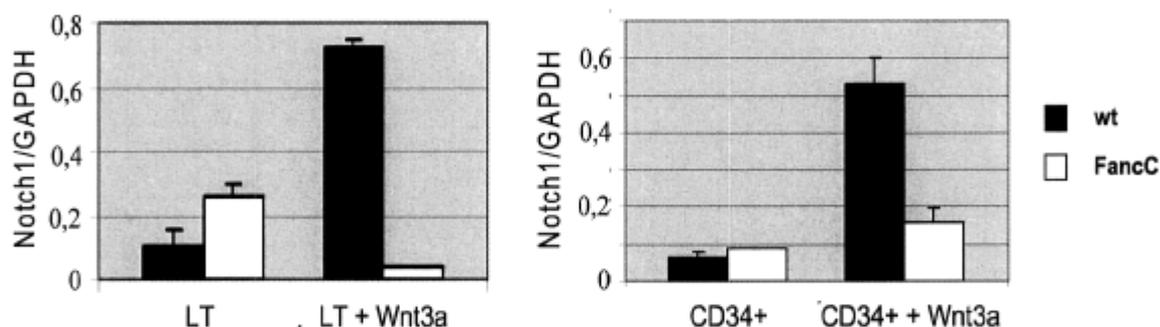


Figure 10 : Expression du transcrit *Notch-1* après stimulation par Wnt3A

Analyses en Q-PCR de l'expression du transcrit *Notch-1*, dans les cellules *Lin-Thy1.2-* (LT) CD34⁺ de souris sauvages et *FancC*^{-/-}. Les analyses ont été réalisées après 12 h de culture, avec ou sans ajout du facteur Wnt3a. Les données représentent l'expression relative du gène. Quatre expériences indépendantes en duplicata, sur quatre animaux différents +/- écart-type.

L'examen de l'activité de cette voie après une étape *in vitro* démontre que les cellules LT sauvages conservent leur habileté à répondre à une stimulation par le facteur Wnt3a. Cette réponse qui se traduit par un accroissement du transcrit *Notch-1* (facteur 8). Les cellules LT FancC^{-/-}, en revanche, apparaissent non seulement incapables d'une telle réponse, mais surtout le niveau du transcrit est réduit de 5,4 fois atteignant, un niveau inférieur à celui de précédant la stimulation. Ces données sont d'autant plus importantes, que *Notch-1* est impliqué dans les processus d'autorenouvellement et le maintien du caractère indifférencié des CSH, ce qui expliquerait les difficultés des cellules Fanconi à reconstituer une hématopoïèse complète et durable.

3-3-1-b Expression du transcrit *Notch-1* dans les cellules CD34⁺

Dans les cellules CD34⁺ non stimulées, l'expression de *Notch-1* est équivalente chez les sauvages et chez les FancC^{-/-}. Mais la réponse au stimulus Wnt3a est différente, puisque l'induction de la voie par ce facteur augmente d'environ un facteur 7 l'expression du transcrit chez les CD34⁺ sauvages et seulement d'un facteur 1,5 pour les FancC^{-/-}. Ces dernières semblent présenter un défaut dans la capacité de réponse au facteur Wnt3a. Pourtant comme vu précédemment, l'activité de la voie Notch-1 à l'état basal, dans les LT FancC^{-/-} semble effective, puisque l'expression du transcrit était 2 fois supérieure à celle des sauvages. Il semble que, la voie Notch-1 ne soit pas ou plus normalement activable dans les CD34⁺ et les LT FancC^{-/-}, après culture *in vitro*.

3-3-2 Expression du transcrit *Hes1* dans les CSH stimulées lors d'une culture *in vitro*

3-3-2-a Expression du transcrit *Hes1* dans les cellules Lin-Thy1.2-

Afin d'estimer plus avant l'efficacité de cette voie et tenter d'en évaluer les conséquences chez les FancC^{-/-}, les mêmes expériences ont été reproduites, avec le gène *Hes1*, principal effecteur de la voie Notch-1. Comme pour *Notch-1*, le niveau du transcrit *Hes1* est comparable entre les sauvages et les FancC^{-/-}, dans les LT non stimulées (**figure 11**).

Le facteur Wnt3a contribue à augmenter d'un facteur 10 l'expression du transcrit chez les sauvages et seulement de deux fois chez les *FancC*^{-/-}.

Ces résultats confirment que l'induction de la voie *Notch-1*, dans les LT sauvages, active l'expression de *Hes1* qui voit alors son expression augmentée de 10 fois. Cette majoration de *Hes1* dans les LT sauvages, coïncide avec l'augmentation d'un facteur 7 de *Notch-1* dans les mêmes cellules après stimulation par Wnt3a. Cette augmentation est cependant 5 fois moins importante, dans les *FancC*^{-/-} qui malgré une diminution du transcrit *Notch-1*, majorent celle du transcrit *Hes1*. Alors que la voie *Notch-1* n'est pas activable par Wnt3a, le transcrit *Hes1*, principal effecteur de cette voie est tout de même induit dans ces cellules. L'activité de *Hes1* est donc fortement inductible dans les LT sauvages, mais dans une moindre proportion dans les *FancC*^{-/-}.

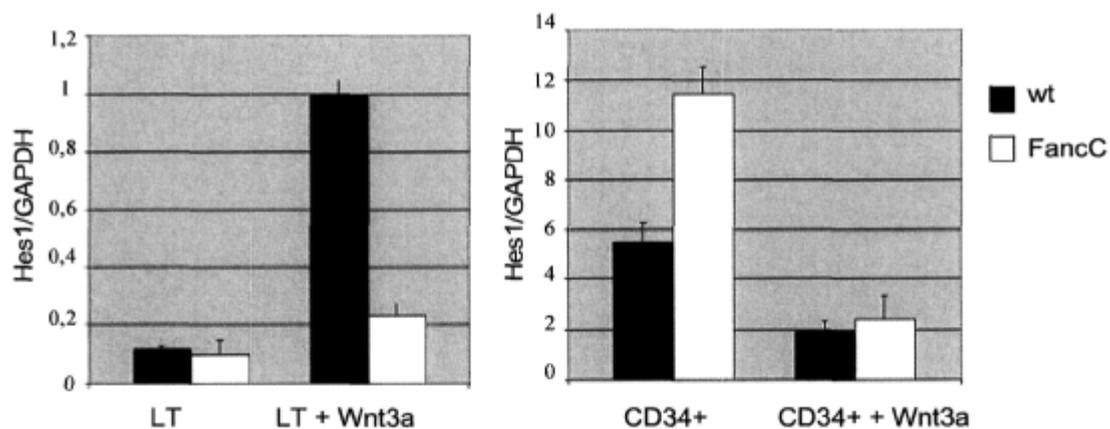


Figure 11 : Expression du transcrit *Hes1* après stimulation par Wnt3a

Analyses en Q-PCR de l'expression du transcrit *Hes1*, dans les cellules Lin-Thy1.2- et CD34⁺ de souris sauvages et *FancC*^{-/-}. Les analyses ont été réalisées après 12 h de culture, avec ou sans ajout du facteur Wnt3a. Les données représentent l'expression relative du gène. Quatre expériences indépendantes en duplicata, sur quatre animaux différents +/- écart-type.

3-3-2-b Expression du transcrit *Hes1* dans les cellules $CD34^+$

Lorsque les mêmes analyses sont reproduites avec les cellules $CD34^+$, il apparaît que les $CD34^+$ $FancC^{-/-}$ non stimulées expriment le transcrit *Hes1*, deux fois plus que la normale. Après une stimulation par Wnt3a, la population $CD34^+$ sauvages réduit du tiers l'expression de *Hes1*, alors que les $FancC^{-/-}$ la réduisent de 6 fois.

In fine le niveau du transcrit *Hes1* dans les $CD34^+$ égale à celui des sauvages, après stimulation par le facteur Wnt3a. Les résultats montrent ici qu'en dépit de la surexpression du transcrit dans les $CD34^+$ $FancC^{-/-}$, sa modulation il n'en reste pas moins conservée.

Les cellules $CD34^+$ sont capables de répondre au signal Wnt3a, suivant un profil coïncide avec celui des $CD34^+$ sauvages et qui se traduit par une réduction de *Hes1*.

Par ailleurs, dans les LT sauvages, après une stimulation Wnt3a, *Hes1* est majoré alors que dans les $CD34^+$ sauvages il est réduit. Cette expression différentielle est tributaire de la nature des cellules et signe la fonction différentielle de ces deux populations cellulaires.

3-3-3 Expression du transcrit *p21* dans les CSH stimulées lors d'une culture *in vitro*

3-3-3-a Expression du transcrit *p21* dans les cellules *Lin-Thy1.2-*

Dans les cellules LT $FancC^{-/-}$ non stimulées, le transcrit *p21* est en moyenne réduit de 50 % comparativement aux sauvages (**figure 12**).

La stimulation des cellules LT sauvages par le facteur Wnt3a, réduit de 50 % son expression alors que les LT $FancC^{-/-}$ la même stimulation induit l'effet inverse, en augmentant d'un facteur 1,6, l'expression de *p21*. Les LT $FancC^{-/-}$, le transcrit *p21* ne répond pas de la façon attendue au stimulus Wnt3a.

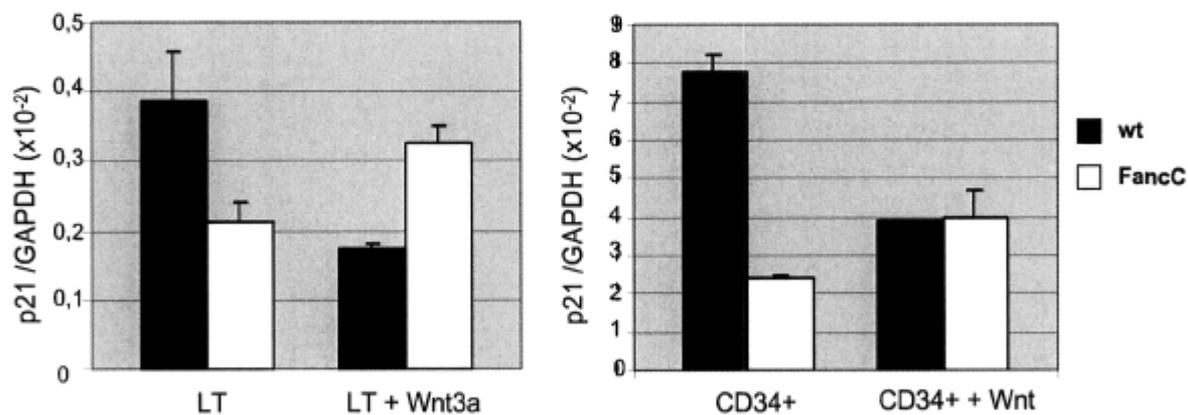


Figure 12 : Expression du transcrit *p21* après stimulation par Wnt3a

Analyses en Q-PCR de l'expression du transcrit *p21*, dans les cellules Lin-Thy1.2- et CD34⁺ de souris sauvages et FancC^{-/-}. Les analyses ont été réalisées après 12 h de culture, avec ou sans facteur Wnt3a. Les données représentent l'expression relative du gène. Deux expériences indépendantes en duplicata, sur deux animaux différents +/- écart-type.

3-3-3-b Expression du transcrit *p21* dans les cellules CD34⁺

L'écart entre les sauvages et les FancC^{-/-} observé dans les LT est majoré, dans les CD34⁺, les CD34⁺ sauvages expriment 4 fois plus de transcrit *p21* que les CD34⁺ FancC^{-/-}. Une stimulation par Wnt3a réduit son expression de moitié dans les CD34⁺ sauvages et l'augmente de 2 fois dans les CD34⁺ FancC^{-/-}. Donc comme pour les LT FancC^{-/-}, l'expression du transcrit est inversée dans les cellules CD34⁺ FancC^{-/-}, comparativement à ce qu'elle devait être. Cette modification est probablement le signe d'une altération de la capacité de prolifération des cellules Fanconi.

3-3-4 Expression du transcrit cycline D1 dans les CSH stimulées lors de culture in vitro

3-3-4-a Expression du transcrit cycline D1 dans les cellules Lin-Thy1.2-

Au nombre des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire figurent ceux codant les cyclines D1 et D2. Ces gènes ont fait l'objet d'une étude en réponse au signal inducteur Wnt3a. Dans un premier temps, la modulation de l'expression du transcrit D1 a été estimée dans les cellules LT (**figure 13**).

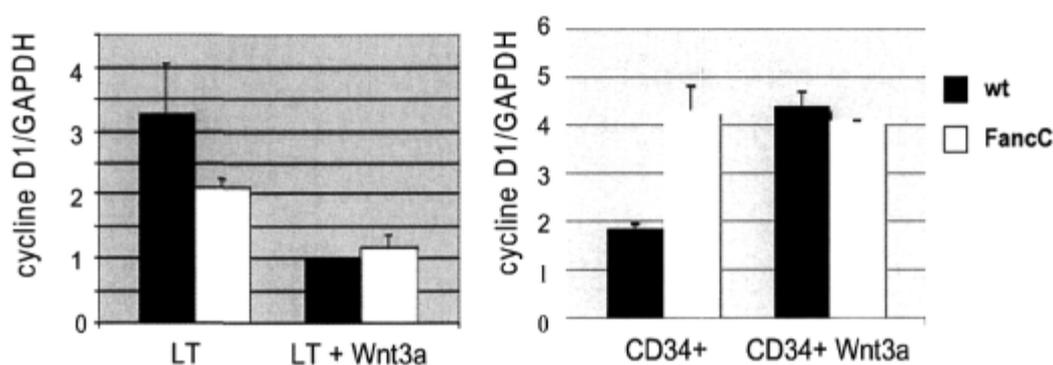


Figure 13 : Expression du transcrit cycline D1 après stimulation par Wnt3A

Analyses en Q-PCR de l'expression du transcrit *cycline D1*, dans les cellules Lin-Thy1.2- et CD34⁺ de souris sauvages et FancC^{-/-}. Les analyses ont été réalisées après 12 h de culture, avec ou sans ajout du facteur Wnt3a. Les données représentent l'expression relative du gène. Duplicata de deux expériences indépendantes, +/- écart-type.

Dans un contexte non stimulé, l'expression de la cycline D1 est 1,7 fois plus importante dans les cellules LT sauvages qu'elle ne l'est dans les FancC^{-/-}. Cependant, la stimulation par le facteur Wnt3a contribue à réduire cet écart, puisque le transcrit *cycline D1* est réduit d'un facteur 3, dans les cellules LT sauvages et d'un facteur 2 dans les LT FancC^{-/-}.

De sorte qu'après une stimulation de 12h, par le facteur Wnt3a, les taux du transcrit s'égalisent. Dans les cellules LT quel que soit leur appartenance génotypique, l'expression du transcrit *cycline D1* obéit au schéma de régulation classique, après une stimulation par Wnt3a.

3-3-4-b Expression du transcrit cycline D1 dans les cellules CD34⁺

Hors de toute stimulation par Wnt3a, les cellules CD34⁺ FancC^{-/-} expriment déjà un niveau maximum de transcrit *D1*, de plus de deux fois supérieur à ce qu'il est dans les cellules CD34⁺ sauvages. Dans le contexte FancC^{-/-}, l'ajout de facteur Wnt3a n'agit pas directement sur l'expression de cette cycline,. En revanche, Wnt3a est inducteur dans les cellules CD34⁺ sauvages et permet de doubler le niveau du transcrit, comparativement à l'état basal. Cette majoration post-stimulation permet aux CD34⁺ sauvages d'exprimer un niveau comparable à celui des FancC^{-/-} non stimulées. Dans les cellules CD34⁺ FancC^{-/-}, l'expression de la *cycline D1* n'obéit pas au schéma de régulation habituel, après stimulation par Wnt3a.

3-3-5 Expression du transcrit cycline D2 dans les CSH stimulées lors de culture in vitro

3-3-5-a Expression du transcrit cycline D2 dans les cellules Lin-Thy1.2-

La progression dans le cycle cellulaire est évaluée par l'expression de l'analyse du transcrit *cycline D2*, dans les mêmes cellules, soumises au même stimulus Wnt3a (**figure 14**).

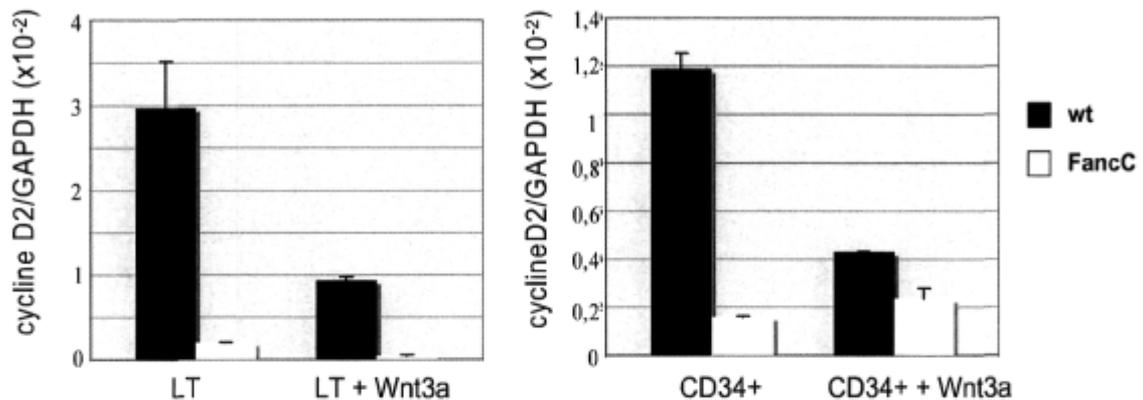


Figure 14 : Expression du transcrit *cycline D2* après stimulation par Wnt3A

Analyses en Q-PCR de l'expression du transcrit *cycline D2*, dans les cellules Lin-Thy1.2- et CD34⁺ de souris sauvages et FancC^{-/-}. Les analyses ont été réalisées après 12 h de culture, avec ou sans ajout du facteur Wnt3a. Les données représentent l'expression relative du gène. Duplicata de deux expériences indépendantes, +/- écart-type.

Le transcrit *cycline D2* est 12 fois plus présent dans les cellules LT sauvages non stimulées que dans les cellules LT FancC^{-/-}. Le facteur de Wnt3a réduit de 3 fois l'expression de *cycline D2*, dans les LT sauvages et de 2 fois dans les FancC^{-/-}. Bien que toutes les cellules FancC^{-/-} (LT et CD34⁺) aient un défaut d'expression de *cycline D2*, sa régulation positive obéit à un schéma classique.

3-3-5-b Expression du transcrit *cycline D2* dans les cellules CD34⁺

Dans les CD34⁺, l'expression de la *cycline D2* obéit au même schéma, à la différence que les CD34⁺ FancC^{-/-} expriment 6 fois moins de transcrit que les sauvages. De façon comparable, à ce qui a été décrit dans les LT sauvages, l'ajout de facteur Wnt3a contribue à diminuer d'un facteur 3 l'expression du transcrit *cycline D2*, dans les CD34⁺ sauvages.

Alors que dans les CD34⁺ FancC^{-/-}, il le majore très légèrement. Comme les cellules LT, les cellules CD34⁺ FancC^{-/-} présentent un défaut d'expression du transcrit *cycline D2* et l'ajout du facteur Wn.3a n'a aucun effet sur l'expression de ce gène, quelque soit la nature des CSH examinées.

3-3-6 Expression du transcrit *c-myc* dans les CSH stimulées lors d'une culture in vitro

3-3-6-a Expression du transcrit *c-myc* dans les cellules Lin-Thy1.2-

En raison de son rôle dans l'initiation et la progression du cycle cellulaire, l'examen de l'expression de *c-myc* a été réalisé, dans les cellules FancC^{-/-} avant et après une stimulation par le facteur Wnt3a (**figure 15**).

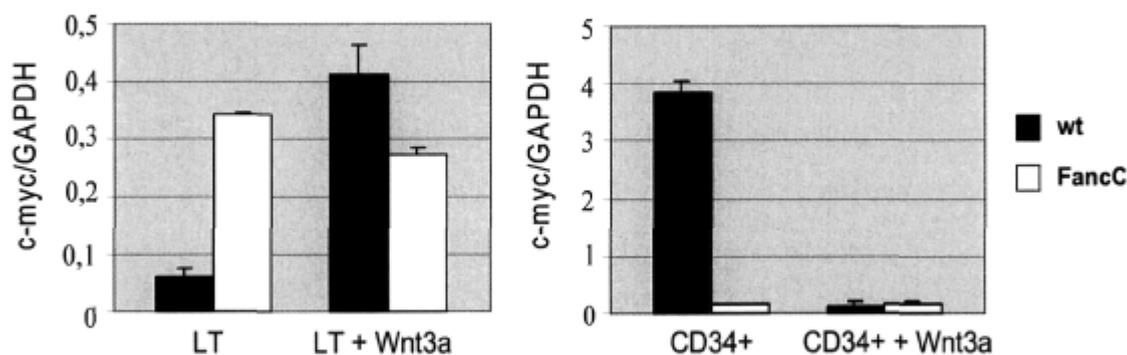


Figure 15 : Expression du transcrit *c-myc* après stimulation par Wnt3A

Analyses en Q-PCR de l'expression du transcrit *c-myc*, dans les cellules Lin-Thy1.2- et CD34⁺ de souris sauvages et FancC^{-/-}. Les analyses sont réalisées après 12 h de culture, avec ou sans ajout du facteur Wnt3a. Les données représentent l'expression relative du gène. Duplicata de deux expériences indépendantes, +/- écart-type.

Les cellules FancC^{-/-} non stimulées ont un niveau 7 fois plus élevé de *c-myc* que les sauvages. Le facteur Wnt3a augmente de 14 fois l'expression du transcrit *c-myc*, dans les LT sauvages, alors qu'il le réduit d'un facteur 1,3, dans les LT FancC^{-/-}.

Les cellules LT FancC^{-/-} ont une expression de *c-myc* majorée et ne semblent pas en mesure de dépasser un seuil (0,33 u.a), même en présence d'un facteur inducteur. Le transcrit dans ces cellules expose un profil d'expression différent de celui des sauvages, à l'état non stimulé comme à l'état stimulé.

3-3-6-b Expression du transcrit *c-myc* dans les cellules CD34⁺

Dans les cellules CD34⁺, hors de toute stimulation, l'expression de *c-myc* est 15 fois plus élevée, dans les sauvages que dans les FancC^{-/-}. Ainsi, les cellules CD34⁺ sauvages expriment un niveau moyen de 3,7 u.a. de *c-myc*, alors que les mêmes cellules issues de souris FancC^{-/-}, expriment un taux de 0,25 u.a. Lorsque Wnt3a est ajouté au milieu de culture, l'expression de *c-myc*, dans les cellules CD34⁺ sauvages est réduite d'un facteur 15 (3,7 u.a. à 0,25 u.a). Ce niveau chez les sauvages égale alors celui des FancC^{-/-}, ces dernières même stimulées par Wnt3a ne répondent pas au signal et conservent un taux, équivalent à celui sans stimulation.

Bien que ce premier travail ne se veut aucunement exhaustif, il permet de constater quelques-uns des effets induits par la culture *in vitro*, tant sur les CSH (Lin⁻ Thy1.2⁻, CD34⁻ et CD34⁺) sauvages autant que FancC^{-/-}. De profondes modulations géniques sont induites par le séjour *ex vivo* des cellules, même lorsqu'il est de courte durée (2 heures).

De plus, alors que les cellules sauvages semblent capables de maintenir une réponse efficace au signal inducteur Wnt3a, même lors de culture *in vitro*, les cellules FancC^{-/-} en sont incapables.

4-DISCUSSION

4-1 La culture *in vitro* fragilise les CSH Fanconi

Si la culture *ex vivo* est génératrice de stress pour toutes les cellules, les dommages et les réponses des CSH Fanconi sont exacerbés. On sait les CSH Fanconi fragiles aux cytokines inhibitrices et aux dommages à l'ADN⁵⁻⁷, lors de cultures cellulaires. *In vitro*, la réponse des cellules Fanconi est anormale et se manifeste notamment par une accumulation et une majoration des dommages cellulaires contribuant à l'augmentation du processus apoptotique. *In vivo*, elle se traduit par une profonde altération des capacités de prolifération et de reconstitution, observables lors d'expériences de transplantation⁸. Dans un premier temps, une estimation des bienfaits de l'action combinée d'une réduction du temps de séjour *ex vivo* et d'une correction génique, a été réalisée. Ces améliorations devaient permettre aux CSH Fanconi d'acquiescer un avantage, en favorisant le maintien préférentiel des cellules corrigées. Pourtant, les résultats démontrent que les CSH Fanconi ne sont aucunement favorisées par ce traitement. La transplantation des cellules non seulement ne permet pas de parvenir à une reconstitution hématopoïétique, mais surtout, elle expose l'organisme receveur à de dangereuses complications à court terme (choc septique, mort). Bien que les méfaits de la culture *in vitro*⁹ sur les cellules Fanconi sont connus, aucune étude n'a jusqu'alors permis de comprendre l'origine de ces défauts. Les expériences ici présentées tentent de préciser la nature des altérations affectant les CSH Fanconi, lors d'un séjour *in vitro*, sur une échelle de temps variable.

4-2 La culture *in vitro* module l'expression génique

Les CSH et leurs descendants régulent le cycle cellulaire de façon très stricte, par des facteurs externes, tels que les cytokines, les interactions avec les cellules stromales et la matrice extracellulaire de l'environnement médullaire.

Cette régulation se produit également par le biais de facteurs intrinsèques, au nombre desquels figurent *c-myc*⁵⁻⁷, *p21*, *HoxB4*¹⁰, *Notch-1*¹¹ et *Hes1*^{10,11}, tous ont un rôle crucial, dans la survie et le maintien du caractère indifférencié des cellules souches hématopoïétiques. Ils sont en charge du maintien de l'équilibre entre un état de quiescence, de prolifération et de différenciation. La modulation voir la perturbation de cet équilibre dynamique, lors d'une culture *in vitro*, pourrait contribuer au développement d'une grande variété de pathologies, au premier chef desquelles se retrouvent les cancers¹². L'atteinte de quelques-unes des voies cellulaires majeures impliquées, dans les mécanismes de prolifération, de différenciation et de réparation des dommages est évoquée, lors d'une étape *in vitro*. Ces modulations sont observables dès la 2^{ème} heure de culture *in vitro*, chez les sauvages autant que chez les *FancC*^{-/-}. Cependant, les conséquences sont autrement plus dramatiques pour les Fanconi qu'elles ne le sont pour les sauvages, qui sont en mesure de procéder aux ajustements nécessaires.

Le signal *Notch-1* favorise l'autorenouvellement et fait obstacle à la différenciation¹³, il figure au nombre de ces voies clés. Située en amont de *p21*, *c-myc*, *cycline D1* et *Hes1*, il en régule l'expression. Les données ici présentées, montrent qu'*in vivo*, les CSH *FancC*^{-/-} majorent l'expression du transcrit *Notch-1* probablement pour favoriser l'autorenouvellement des CSH, en réponse à une déplétion cellulaire. L'augmentation pourrait également être le signe précurseur d'une transformation néoplasique, puisque l'expression constitutive de *Notch-1* est connue comme un facteur de prédisposition au développement de leucémie T¹⁴ et à l'expansion de CSH mutantes¹⁵. *In vitro*, après la hausse du transcrit les deux premières heures, le signal *Notch-1* est rétro-régulé négativement, pour permettre le développement des cellules T¹³. La majoration du transcrit, après la 5^{ème} heure de culture, est certainement le signe pour les CSH sauvages, d'une progression dans la phase G0/G1 du cycle cellulaire ou vers une maturation¹¹. Pour les CSH *FancC*^{-/-}, à la maturation s'ajoutent la perte cellulaire générée par la culture et le syndrome d'instabilité génique, l'ensemble pourrait expliquer que l'augmentation d'un facteur deux de *Notch-1*, dans ces cellules comparativement aux sauvages.

Cette modulation aberrante du transcrit *Notch-1*, chez les *FancC^{-/-}* se répercute sur son principal effecteur, *Hes1* dont l'expression est également majorée *in vivo* et les deux premières heures *in vitro*, préservant ainsi la capacité de reconstitution de long terme¹⁶. Une surexpression de *Hes1* inhibe le cycle cellulaire *in vitro*¹⁶, en procédant à la rétro-régulation positive de p21¹¹. Après la 2^{ème} heure de culture, les niveaux sont réduits de façon drastique, dans les CSH *FancC^{-/-}*, alors qu'ils se maintiennent à un niveau constant chez les sauvages. Compte tenu du fait qu'une réduction de *Hes1* est associée à une préservation des capacités de reconstitution à court terme des CSH et que les *FancC^{-/-}* majorent ce transcrit, tout porte à croire que dans ces cellules, il y a une atteinte de la capacité de reconstitution à court terme. Cette conclusion pourrait expliquer qu'une fois transplantées, les CSH *FancC^{-/-}* ne sont plus en mesure de reconstituer un processus hématopoïétique, à court terme chez les receveuses. Ce qui paraît d'autant plus vrai, que les effets sur les cellules en charge de la reconstitution rapide, soit les CD34⁺ CD38⁻, ne sont généralement pas visibles chez la donneuse, mais plutôt dans la receveuse.

Lorsque la modulation du transcrit *Hes1* est confrontée à celle de la *cycline D1*, on constate que des niveaux augmentés de *Hes1* coïncident avec des niveaux réduits de *cycline D1*, signe d'un cycle cellulaire réprimé¹⁶. Au cours des 16 h que dure la culture *in vitro*, l'expression de ces deux transcrits fait l'objet d'une oscillation, indiquant pour les cellules *FancC^{-/-}*, un cycle cellulaire tantôt favorisé, tantôt réprimé. Alors que chez les sauvages, ces deux mêmes taux restent à un niveau stable.

Aucune analyse précise du cycle cellulaire n'a été menée, il est cependant possible d'envisager que les cellules *FancC^{-/-}* qui d'après les niveaux de *cycline D1* semblent avoir une activité cellulaire majorée à l'état basal soient encore plus sollicitées lors de la culture, en tentant de parer au processus apoptotique¹⁷. Cette mort cellulaire massive pourrait forcer l'entrée en cycle des cellules primitives habituellement quiescentes, comme les CD34⁺. Cette hypothèse contribuerait à expliquer la réduction du nombre et de la qualité de ces cellules participant à la reconstitution, lors d'une transplantation.

Les données présentées témoignent d'une modulation inhabituelle tant *in vitro*, qu'*in vivo*, dans les CSH *FancC*^{-/-}.

Bien que les détails de fonctionnement des protéines Fanconi dans la stabilité du génome et dans la prévention de transformations néoplasiques restent inexpliqués, leurs interactions physiques et fonctionnelles avec les protéines de réparation de l'ADN, de contrôle du cycle cellulaire et d'apoptose, témoignent d'un rôle majeur.

4-3 Capacité des CSH à répondre au stimulus, lors de la culture *in vitro*

Compte tenu des modulations importantes des voies cellulaires majeures, il apparaissait important de déterminer l'étendue des défauts subcellulaires des CSH Fanconi après une culture *in vitro*. À cet effet, les cellules ont fait l'objet d'une évaluation de leur capacité à répondre au stimulus inducteur (Wnt3a) comparativement aux sauvages.

Le facteur Wnt3a utilisé lors de ces stimulations, appartient à une large famille de molécules de signalisation sécrétées. Ce sont des glycoprotéines wnt/wingless influant sur plusieurs processus développementaux, dont ceux ayant trait au devenir des cellules souches¹⁸, comme la différenciation et la prolifération et ce grâce à une modulation de l'expression de signaux intracellulaires. En réponse à un stimulus Wnt, la glycogène synthase kinase-3 β (GSK-3 β) est inactivée et permet l'accumulation cytoplasmique de la β -caténine qui transloque au noyau, où elle régule la transcription génique de gènes cibles de la voie Wnt, au nombre desquels figurent *Notch-1*^{19,20}, la *cycline D1*²¹ et *c-myc*. Le fait que les cellules Lin⁻Thy1.2⁻ (LT) *FancC*^{-/-} surexpriment le transcrit *Notch-1* témoigne certainement de leur nécessité de lutter contre le processus de différenciation majeur. La voie de signalisation Notch-1 est particulièrement active dans les CSH, en revanche son activité est amoindrie, dans les cellules différenciées¹³.

En réponse au facteur Wnt3a, Notch-1 freine la différenciation et la prolifération cellulaire, via ses principaux effecteurs p21 et Hes1.

Après ajout du facteur Wnt3a, l'expression du transcrite *Notch-1* est effectivement majorée, dans les cellules LT sauvages (facteur 7), alors qu'elle est réduite dans les LT *FancC*^{-/-}. Cette voie n'est non seulement pas activable par le facteur Wnt, chez les *FancC*^{-/-} comme à l'état sauvage, mais surtout les réponses induites par cette stimulation sont aberrantes. Pour expliquer la différence entre l'activité *in vivo* et celle *in vitro*, l'intervention d'une voie de contournement pourrait être suggérée. Cette voie plus lente verrait ses effets se manifester après 12h.

Le transcrite *Hes1* apparaît augmenté dans les LT sauvages (facteur 5), coïncidant avec la majoration de *Notch-1*. En revanche, alors que l'expression de *Notch-1* est réduite, *Hes1* est augmenté (facteur 2), dans les LT *FancC*^{-/-}. Pour expliquer que les cellules CD34⁺ non stimulées par Wnt3a expriment de fortes proportions de transcrite *Hes1*, alors même que *Notch-1* est inactif, il faut envisager que le recours à une autre voie. L'implication d'une voie de contournement compenserait les défauts d'activation de Notch-1.

Dans les cellules CD34⁺, l'expression du transcrite *Notch-1* en réponse à une stimulation Wnt3a est 5 fois moindre dans les CD34⁺ *FancC*^{-/-}. Comparativement à l'état non stimulé, les CD34⁺ *FancC*^{-/-} ne relèvent que faiblement (facteur 2) l'expression de *Notch-1* après une stimulation, quand elle est majorée de 10 fois dans les CD34⁺ sauvages. *Hes1* n'induit pas la mort cellulaire programmée, ni n'altère la différenciation des CSH, mais préserve la capacité de reconstitution à court terme des CSH¹¹. Sa surexpression est connue pour réduire la différenciation vers la lignée lymphoïde B¹⁸ et contribue à maintenir un nombre normal de cellules CD34⁺. Ce point permettrait aux cellules *FancC*^{-/-} de maintenir un nombre minimal de CSH dans un état indifférencié. Les CD34⁺ Fanconi répondent convenablement à un signal Wnt, en réduisant l'expression de *Hes1* à un niveau comparable à celui des sauvages. Lorsque ces cellules sont maintenues en culture, les niveaux de *Hes1* restent élevés pendant les deux premières heures, mais sont réduits dès que les CD34⁺ entrent en cycle.

Contrairement aux CD34⁺ sauvages qui sous l'effet du facteur Wnt3a augmentent le niveau de cycline D2, les CD34⁺ FancC^{-/-} disposent déjà d'un niveau majoré.

Plusieurs équipes ont rapporté que la surexpression de *Hes1* dans les CD34⁺ inhibe le cycle cellulaire *in vitro* et l'expansion *in vivo*, via une rétro-régulation des inhibiteurs du cycle cellulaire, au nombre desquels figure p21.

Deux autres éléments peuvent chacun de façon indépendante contribuer à augmenter la prolifération des CSH¹⁰. D'une part, la rétro-régulation négative de *p21* et d'autre part l'expression forcée du transcrit *HoxB4*. Dans un cas, il est démontré que p21 agit spécifiquement comme régulateur négatif de la transcription et relie les voies de signalisation Notch-1 et Wnt²², sa perte est associée au développement tumoral.

La fonction surpresseur de tumeur de Notch-1 est justement liée à la rétro-régulation négative du signal Wnt²², médiée par p21. Habituellement, p21 contrôle la prolifération et l'apoptose, sa rétro-régulation négative force les cellules à proliférer²². Une augmentation de *p21* parallèlement à celle de la cycline *D1* est signe d'une croissance asynchrone et c'est exactement ce qui est observé dans les cellules CD34⁺ FancC^{-/-}. Les CSH sauvages, les niveaux élevés de *p21* sont en rapport avec des niveaux plus réduits de *Notch-1*. Lorsque la voie Wnt est activée, elle stimule *Notch-1*, réduit l'expression de *p21* ce qui lève le blocage maintenu et favorise l'entrée en cycle cellulaire.

Les cellules FancC^{-/-}, dans leur ensemble, n'obéissent plus à cette règle, les LT et les CD34⁺ sous-expriment de 2 à 4 fois *p21* à l'état basal, ce qui coïnciderait avec l'entrée en cycle. Pourtant dans les cellules LT FancC^{-/-}, en présence du signal Wnt3a le niveau de *p21* augmente, ce qui est d'autant plus surprenant que cette augmentation est associée à une réduction du signal *Notch-1*, soit l'effet inverse de ce qui se passe chez les sauvages. L'induction par le facteur Wnt3a, produit l'effet inverse de celui escompté, les cellules augmentent le niveau du transcrit *p21*.

Plusieurs données rapportent qu'une expression majorée de *p21* peut dans certaines circonstances, freiner la prolifération cellulaire, comme dans le cadre d'une leucémie myéloïde chronique, où les cellules ont une expression constitutive de la tyrosine kinase Bcr-abl. Ce qui pourrait être le cas des cellules Fanconi qui ont une forte propension au développement de ce type de pathologies.

En résumé, le défaut qui affecte la voie Notch-1 dans les CSH *FancC^{-/-}* est très certainement situé en amont de la séquence activatrice de *Hes1* et pourrait être la conséquence d'un défaut du nombre ou de la qualité des récepteurs transmembranaires Notch-1. Il pourrait également s'agir d'une atteinte de l'intégrité du récepteur, incapable de lier ses ligands (Delta et Serrate) ou de cliver et libérer le fragment NICD. Pourtant, il semble qu'en raison de son caractère essentiel, la voie de signalisation Notch-1 doive être intacte afin que soit préservée la capacité d'autorenouvellement des CSH. Aussi, il est envisageable que la cellule puisse recourir, le cas échéant, à d'autres procédés de "secours". Données qui semblent confortées par ces résultats qui convergent vers l'existence d'une ou de plusieurs voies parallèles, limitant les conséquences dues au défaut d'activation de Notch-1. Les données recueillies sur les CSH *FancC^{-/-}* en présence du facteur soluble Wnt3a, suggèrent que ce signal peut être capté et transmis sans passer par la voie Notch-1 classique, qui ne paraît pas active en réponse à un signal inducteur. Il pourrait réclamer le recours à d'autres récepteurs Notch (Notch-4)^{19,20} et/ou à ceux d'une famille, comme les LRP 5 et 6 (low-density lipoprotein receptor-related proteins)²³, qui *in fine* contribueraient à l'adaptation des cellules. Le facteur Wnt est connu pour réguler positivement la progression du cycle cellulaire, via les cyclines. Cependant, les LT *FancC^{-/-}* expriment une proportion moindre de ce transcrite, suggérant un défaut dans leur capacité d'entrer ou de progresser dans le cycle cellulaire, ce qui avait déjà été rapportée. Ce facteur réduit de plus de 50 % l'expression de D1, dans les LT sauvages et *FancC^{-/-}*, alors qu'il la majore d'autant, dans les *CD34⁺ FancC^{-/-}*, permettant de conclure à l'expansion préférentielle des cellules primitives *CD34⁺*. L'information capitale délivrée par cette expérience, réside dans la surexpression de ce transcrite dans les *CD34⁺ FancC^{-/-}*, hors de tout contexte inducteur.

Cette expression massive de la *cycline D1*, signifie une entrée en cycle importante de la population CD34⁺. Ce qui expliquerait, à terme, la perte des capacités de reconstitution de CSH Fanconi. Il est à noter également qu'une rétro-régulation positive conjointe de la *cycline D1* et de *p21* permet de différencier les CD34⁺ en « crise » de ceux qui progressent, vers des leucémies myéloïdes chroniques (LMC)²⁴.

Le profil d'expression pourrait également témoigner d'une activation constitutive de la voie Wnt, laquelle est associée à l'apparition de LAM²⁰, ce qui est en droite ligne des pathologies observées chez les Fanconi. En revanche, la surexpression de la cycline D1, à l'état non stimulé pourrait être le signe d'une nécessité pour les CD34⁺ de compenser la perte cellulaire et la mortalité précoce de leurs descendants.

Puisque preuve est faite qu'une surexpression de cycline D1 est nécessaire et suffisante à la transition G1/S et ce indépendamment de toute stimulation mitogène²⁵. Une majoration du transcrit *cycline D1* permettrait alors aux CD34⁺ d'outrepasser la nécessité du signal mitogène, en l'occurrence Wnt3a et de cycler, expliquant leur "insensibilité" à ce facteur. La *cycline D2*, cible directe de *c-myc*, voit son promoteur réprimé dans les cellules quiescentes²⁶. L'examen de ce transcrit permet d'évaluer la progression dans le cycle cellulaire des cellules FancC^{-/-}.

En réponse à Wnt3a, la prolifération et la différenciation sont freinées par Notch-1, ce qui est confirmé par la réduction de la cycline D2 dans les cellules LT et CD34⁺ sauvages. Mais dans les FancC^{-/-} quel que soit le type cellulaire, le niveau de *cycline D2* est de 10 à 6 fois plus bas que dans les sauvages, ce qui pourrait être le signe que les cellules FancC^{-/-} ne sont pas en mesure de poursuivre leur progression, dans le cycle, en raison de l'accumulation des dommages à l'ADN non restaurés. Contrairement à la phase S, le point de contrôle G2 est intact dans les Fanconi²⁷, ce qui explique qu'après l'exposition à un stress génotoxique, la majorité des cellules Fanconi se maintiennent dans une phase G2 prolongée, en raison de dommages endogènes persistants.

L'étude s'est également intéressée à l'expression du proto-oncogène *c-myc*, cet important facteur de transcription²⁸, de type hélice-boucle-hélice, a un rôle intimement lié à la prolifération, la différenciation et l'apoptose⁶ et participe à l'équilibre entre autorenouvellement et différenciation des CSH²⁹.

Indispensable à la transition G0/G1, *c-myc* est principalement concentré sur la sortie de la phase G0/G1 et soutient la croissance en tant que régulateur primaire de la transition G1/S³⁰, sans les cellules LT. Plusieurs auteurs montrent que l'expression de *p21* est directement réprimée par *c-myc* par fixation sur le promoteur de ce gène, ce qui est vérifié dans les LT. Lorsque la voie de signalisation Wnt est active, l'expression de *c-myc* est majorée et inactive l'expression de *p21* qui n'a alors aucun effet sur le cycle cellulaire des LT FancC^{-/-}. L'inactivation de *c-myc* altère la capacité de différenciation des CSH (cf. CD34⁺) et conduit à l'accumulation des LT exprimant d'importants niveaux de l'inhibiteur du cycle cellulaire *p21*²⁹, réduisant le nombre de cellules lymphoïdes et myéloïdes, à l'état basal dans les LT FancC^{-/-}. Son expression étant déjà de 7 fois, supérieure à la normale, ces cellules sont insensibles à une induction par le facteur Wnt3a. Ce qui est d'autant plus inquiétant que l'on assiste, dans les cellules FancC^{-/-}, à une réduction d'expression du transcrit *c-myc* en réponse à Wnt3a, ce qui est habituellement associé à un processus de prolifération et de maturation des cellules³³.

Alors que les cellules sauvages expriment *c-myc* après une stimulation par Wnt3a, contribuant à réduire les niveaux de *p21* et donc favorise l'entrée en cycle. L'augmentation de *Hes1* et de la *cycline D1* est d'ailleurs le signe de l'induction d'une prolifération cellulaire. Dans les CD34⁺ FancC^{-/-}, aucun transcrit *c-myc* n'est détecté et le facteur Wnt3a ne favorise pas plus cette expression, laissant ainsi libre court à une majoration de *p21*, même en présence de Wnt3a, ce qui se traduit par une réduction du cycle cellulaire.

Lorsque la voie Wnt est «OFF», la synthèse de *p21* n'est plus inhibée, ce qui permet l'arrêt du cycle cellulaire facilitant la différenciation. Dans les cancers³¹, la voie Wnt échappe au contrôle physiologique, si bien que les cellules continuent à se diviser et à se comporter comme des cellules progénitrices, ce qui semble vérifié pour les CD34⁺ FancC^{-/-}.

Si *c-myc* est important dans le renouvellement des CSH, il est depuis peu soupçonné d'être le régulateur central du cycle cellulaire, dans les cellules où les voies Notch-1 et HoxB4 sont induites.

Quelques-unes des perturbations majeures induites, dans les CSH *FancC*^{-/-}, par la culture *in vitro* ont été évoquées. Si elles ne suffisent certainement pas à tout justifier, elles contribuent grandement à la compréhension des conséquences néfastes liées à l'usage de telles cellules, dans le cadre d'une greffe de moelle osseuse. Une analyse plus approfondie de telles données permettrait d'intégrer les protéines Fanconi, dans un contexte métabolique plus large, les reliant directement aux processus d'autorenouvellement et de différenciation.

L'altération de l'expression des cyclines (D1 et D2), de CtBP1, Notch-1 et ses effecteurs (Hes1 et *c-myc*), ainsi que de p21 et HoxB4, témoignent de ces perturbations disséminées qui sont autant de contraintes à la thérapie génique *ex vivo* chez les Fanconi. Pourtant, elles permettent de relier la voie Fanconi à un réseau complexe de voies imbriquées les unes aux autres, suggérant leur participation individuelle ou commune des protéines Fanconi à un réseau métabolique majeur. Bien qu'elle n'est fait l'objet d'aucun examen, il est important de mentionner que la capacité de "homing" est une notion à garder présente à l'esprit, lorsqu'il est question de transplantation. Pour que la reconstitution ait lieu au moment de la greffe, les cellules doivent circuler dans le sang, cheminer à travers les organes où elles peuvent être séquestrées (poumons, foie) et traverser l'épithélium vasculaire, avant de migrer dans le tissu approprié, typiquement la moelle osseuse, où elles colonisent les niches stromales. Pour accomplir un tel périple, les cellules doivent disposer de molécules d'adhésion et de propriétés cellulaires spécifiques³⁰. Comme cela a déjà été décrit, il est possible que la culture *in vitro* affecte les marqueurs de surface des CSH, notamment β 1-intégrine³¹, réduisant alors l'habileté de ces cellules à retrouver rapidement le chemin de la niche médullaire³², après leur passage dans le sang.

Cette hypothèse est d'autant plus plausible, que les modulations des voies Notch-1 et c-myc observées chez les *FancC*^{-/-} ont justement été suggérées dans ce type d'altération. Seules les incidences liées à la seule culture *in vitro* ont ici été évaluées, pourtant la thérapie génique *in vitro*, ne se limite pas à l'étape de culture.

Elle implique également le recours à des vecteurs viraux afin que le gène correcteur soit intégré, utilisé et exprimé de façon stable et durable. Aussi, les capacités de reconstitution et de prolifération des CSH ont été évaluées, après une transduction lentivirale *ex vivo* de 12 h.

5-CONCLUSION

Les travaux ici présentés pour les CSH Fanconi démontrent qu'une correction génique médiée par un transfert *in vitro* est un procédé dangereux. La fragilité des cellules à l'expérimentation *ex vivo*, se traduit par une mortalité accrue et une perte des capacités d'auto-renouvellement et de prolifération. Une sensibilité à la transduction lentivirale, contribue également à réduire la fraction cellulaire transplantable. Enfin, les altérations subcellulaires induites par la culture se traduisent par d'importantes modulations de l'expression génique qui affectent le cycle cellulaire, les mécanismes de prolifération, de réparation de l'ADN. Toutes ces contingences ne font qu'augmenter les risques, à moyen et long termes, d'émergence de pathologies malignes post-transplantation².

Toutes ces contingences peuvent augmenter les risques, à court ou moyen terme, d'émergence de pathologies malignes post-transplantation. Alors qu'à court terme, ces CSH transduites *in vitro*, une fois transplantées peuvent éprouver des difficultés ou être incapables de retrouver le chemin de la niche médullaire. Ces conséquences limitent considérablement les bénéfices d'une stratégie qui reste également tributaire de la purification des CSH.

CHAPITRE VI

ANNEXE 2

CtBP-1 ET HES-1 DANS LES CELLULE SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES

Dans le cadre de mon doctorat, je me suis également impliquée, dans le projet d'une autre étudiante. L'objectif était de déterminer plus avant, l'implication de la protéine CtBP1, dans la voie cellulaire Fanconi. À cet effet, j'ai réalisé la mise au point et les observations reliées à l'usage des ARN interférents.

1- Introduction

1-1 Présentation de la protéine CtBP1

CtBP1 est une phosphoprotéine membre de la famille des *C-terminal binding proteins* qui agit en qualité de co-répresseur transcriptionnel³, régulateur du trafic intracellulaire lors de la prolifération cellulaire³⁴. Son potentiel de co-répression est médié par la formation d'un complexe capable de produire une modification coordonnée des histones. Mais également, interagit avec de nombreuses protéines, régulant de l'expression génique. Pêchée, lors d'un criblage de banque d'ADN de cerveau foetal humain, cette protéine est identifiée comme interacteur des protéines Fanconi. Des expériences de co-immuno-précipitation et en immunofluorescence, réalisées par une autre étudiante dans le laboratoire, ont confirmé l'interaction et la colocalisation de CtBP1 et certaines protéines Fanconi. Pour compléter cette étude tout en précisant le rôle de CtBP1 dans la voie cellulaire Fanconi, diverses expériences ont été réalisées. Dans un premier temps, les expériences d'ARNi, suivies d'analyses protéiques, ont permis d'estimer le rôle de CtBP1, lors de la résistance aux dommages induits par la MMC

1-2 Présentation de la protéine Hes1

Le rôle de la voie cellulaire Notch-1 est évoqué tant dans le développement et la maturation normale des thymocytes³⁵, que dans un contexte pathologique. Le facteur de transcription Hes1 de type hélice boucle hélice, est le principal effecteur de la voie Notch-1³⁶. Il joue un rôle clé dans la phase de croissance neuronale lors du développement embryonnaire. Son rôle est tout aussi crucial lors du développement périnatal³⁷ et est exprimé précocement, dans les thymocytes et dans le stroma thymique et essentiel au développement de cellules T³⁸. Cette molécule clé est aujourd'hui reconnue pour sa capacité à préserver la reconstitution à long terme des cellules Lin⁻Thy1.2⁻Sca⁺CD34⁻ (LTS CD34-) *in vitro*¹⁶. Hes1 est retro-régulé négativement dans les précurseurs hématopoïétiques après une surexpression de Notch-1³⁵ et une activation endogène de la voie Notch-1.

Des expériences préliminaires réalisées au sein de notre équipe par un autre étudiant ont permis de démontrer l'interaction directe et la co-localisation de Hes1 et de plusieurs protéines Fanconi. L'objectif était ici d'estimer la capacité de survie à la MMC, des cellules sous-exprimant ce transcrit.

2- Matériels et méthodes

2-1 Polymerase chain reaction (PCR)

La PCR a permis l'amplification, grâce à des couples d'amorces spécifiques *GAPDH* et *CtBPI*, d'une séquence d'ADN particulière située sur un ADNc d'intérêt de cellules médullaires totales fraîchement extraites. Les oligonucléotides sont synthétisés (Plateforme séquençage et génotypage des génomes, CHUL), de manière à amplifier différentes régions de l'ADN (cf. **tableau 1**).

La détermination de la séquence des amorces, a été réalisée de façon à garantir la spécificité de l'amplification, chaque amorce inclue un minimum de 18 bases complémentaires à la séquence à amplifier. La température approximative d'hybridation ($T^{\circ}H$) de chaque oligonucléotide est calculée suivant la formule : $T^{\circ}H = T^{\circ}M[(A+T) \times 2 + (G+C) \times 4] - 5^{\circ}C$ (A: nombre d'adénines; T: nombre de thymidines; G: nombre de guanines; C: nombre de cytosines de chaque amorce). La température d'hybridation retenue est généralement la $T^{\circ}H$ la plus basse des deux oligonucléotides. La $T^{\circ}H$ est de $60^{\circ}C$ pour les amorces CtBP1 et de $60^{\circ}C$ pour les amorces GAPDH. Enfin, pour éviter une amplification non spécifique, la $T^{\circ}H$ des deux oligonucléotides doit être la plus proche. Le produit de PCR a ensuite été déposé sur gel d'agarose, le poids moléculaire des produits a été comparé à celui du marqueur. Dans les cas où la taille du produit de PCR ne correspondait pas à celui attendu ou si plusieurs bandes apparaissent, la stringence des conditions de PCR a été modifiée.

2-2 L'ARN interférent

2-2-1 Principe

L'expression ARN interférent (ARNi) désigne un acide ribonucléique simple ou double brin, qui interfère avec un ARN messager (ARNm) cible en s'y liant spécifiquement, conduisant à sa dégradation et de ce fait à la diminution de sa traduction en protéine. Il apparaît aujourd'hui, que c'est la protéine éminceuse "Dicer" qui génère de petits ARN doubles brins courts (21 à 25 paires de bases) ou "*small interfering RNA*" (ARNi). L'introduction directe des ARNi dans les cellules de mammifères provoque l'interférence ARN. Le principe général est aujourd'hui élucidé, les ARN doubles brins présents dans une cellule sont tout d'abord pris en charge par une ribonucléase de type III appelée Dicer transfère alors les ARNi à un gros complexe multiprotéique, le complexe RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*). Un des brins du ARNi, dit passager, est éliminé tandis que l'autre (dit « guide ») dirige le complexe RISC vers les ARNm possédant une séquence complémentaire au brin guide.

Si la complémentarité entre le ARNi et l'ARNm cible est parfaite, le complexe RISC clive l'ARNm cible qui est dégradé et non traduit en protéine. Quelques bases non complémentaires suffisent pour empêcher le clivage. Ce mécanisme est donc très spécifique de la séquence d'ARNi et de l'ARNm. Dans le cadre de cette procédure, deux technologies d'ARN interférent (ARNi) ont été utilisées, les *shorts hairpin* (shARN) ou les Stealth. Le mécanisme d'action est commun à tous les ARNi, la différence réside dans la structure secondaire de l'ARN.

Le shRNA est un ARN simple brin qui forme une tige boucle aisément exportable du noyau, après sa reconnaissance par une exportine. Une fois dans le cytoplasme, la tige boucle est reconnue et clivée par la RNase Dicer, qui en retirant la boucle, libère un ARN double brin de séquence complémentaire à celle du gène cible. Cet ARN double brin incorporé au complexe RISC induit la dégradation de l'ARNm cible. Les shRNA permettent une expression stable sur long terme des ARNi dans les cellules. Les vecteurs shRNA, aujourd'hui fréquemment utilisés, offrent un avantage supplémentaire comparativement aux autres ARNi sous forme de duplexes, ils s'intègrent au génome et permettent une inhibition des gènes cibles, toute la vie durant. L'efficacité de cette technologie est tributaire de l'efficacité de la transfection. Les Stealth constituent une nouvelle génération d'ARNi, ce sont des structures nucléotidiques nues. Leur potentiel de knock-down est amélioré, leur conférant une plus grande reproductibilité expérimentale.

2-2-2 Préparation des structures

Dans le cadre de l'utilisation de Stealth, les constructions fournies par le fabricant sont prêtes à l'usage. Les shARN nécessitent en revanche un clonage dans un vecteur viral.

2-2-1-a Appariement des brins shARN

Dans le cadre des procédures faisant usage de shARN, des clonages ont été nécessaires. Les shRNA sont livrés sous forme de séquences simple brin (Invitrogen) et doivent dans un premier temps être appariées, afin de constituer une structure double brin.

Deux séquences de shARN différentes, ciblant chacune une partie différente du même gène ont été dessinées et commandées. Une structure contrôle (Scramble) correspondant à la séquence aléatoire de la séquence de l'ARNi est également livrée. L'appariement est réalisé en présence du brin supérieur (200 μ M), du brin inférieur (200 μ M), tampon 10X (100 mM Tris-HCl pH8, 10 mM EDTA pH8, 1 M NaCl) et d'eau Rnase-free, 10 min. à 95 °C, 1 h à TP et toute la nuit à -20 °C. Pour le gène *Hes1* (humain et murin), les deux séquences de shRNA constituent les structures (1-2) et (5-6), les duplexes contrôles négatifs correspondant sont respectivement les constructions (3-4) et (7-8).

2-2-2-b Digestion enzymatique

Dans la perspective d'un clonage directionnel des séquences shARN dans le plasmide pRNAt-U6, le vecteur viral doit préalablement ouvert. Les préparations d'ADN plasmidique du vecteur lentiviral pRNAt-U6 sont mises en présence des enzymes XhoI et du tampon B (Invitrogen), incubés 2 h à 37°C. La solution est ensuite complétée de l'enzyme BamHI et du tampon B (Invitrogen) pour terminer la digestion séquentielle. Les produits de digestion sont ensuite déposés pour migration. Après le clonage, les produits sont soumis à deux types de digestion, la première vise à vérifier la présence de l'insert en permettant sa sortie du vecteur.

2-2-2-c Électrophorèse

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet une séparation des produits de digestion, en fonction de leur taille. Le dépôt sur gel agarose 1 % permet de vérifier la constitution de structures double brin. Les gels d'agarose utilisés (1 à 2 %) sont constitués d'un mélange (m/v) d'agarose et de tampon TAE 1X (0,5% Tris-HCl; 0,1% acide acétique glacial; 1 μ M EDTA, pH 8), le mélange est chauffé au micro-onde avant l'ajout de bromure d'éthidium (BEt, 5 μ g/mL), agent intercalant facilitant la visualisation des acides nucléiques sous UV.

Une fois les gels coulés et polymérisés les produits de digestion sont mélangés à un tampon de charge 5X (12,5% Ficoll, dans TAE 5X, 50% glycérol, 0.25% bleu de bromophénol) et déposés dans les puits, un marqueur de poids moléculaire est ajouté (100 pb ou 1 kb, Invitrogen). Les gels sont immergés dans le tampon TAE 1X et la migration est lancée pour 15 à 20 min, à 150 V (Helixx). À la fin de la migration sur gel, le fragment voulu vecteur pRNAt-U6 ouvert est excisé et purifié (9 kb).

2-2-2-d Purification sur gel des produits de digestion

Pour contrôler la qualité de la réaction de digestion et poursuivre le clonage, le produit de digestion pRNAt-U6 ouvert est soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose. Après migration, le gel est placé sous la lampe ultraviolette, si la bande du produit d'intérêt apparaît au poids moléculaire attendu, elle est excisée du gel à l'aide d'un scalpel, fractionnée en petits cubes et placée dans un eppendorf, pour être pesée. L'ADN contenu dans le gel est alors extrait au moyen d'un kit (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen). La masse de gel ayant une correspondance au volume (100 mg à 100 μ L), 3 volumes (v.) de solution de solubilisation (tampon QG, Qiagen) sont ajoutés, le tube est ensuite placé 10 min à 50 °C, pour favoriser la dissolution du gel. Le tampon de solubilisation contient un indicateur de pH, la solution reste jaune si le pH est optimal pour l'absorption sur la colonne ($\text{pH} \leq 7.5$). Après l'ajout d'1 v. d'isopropanol et un rapide mélange, la solution est déposée, sur la colonne d'absorption (kit Gel extraction Kit, Qiagen) et l'ADN fixé par centrifugation (12 000 rpm, 1 min.). Le liquide résiduel est enlevé, la colonne est rincée avec 500 μ L de tampon QG, centrifugée (12 000 rpm, 1 min.), avant d'ajouter 750 μ L de tampon de lavage (PE). Après centrifugation (12 000 rpm, 1 min.), le tampon résiduel est jeté et la colonne centrifugée à nouveau (12 000 rpm, 1 min.). Pour l'élution, la colonne est placée dans un nouvel eppendorf et 30-50 μ L de tampon EB sont déposés au centre de la membrane de la colonne. Après deux centrifugations successives (12 000 rpm, 1 min.), l'éluat récupéré contient l'ADN prêt pour le clonage.

2-2-2-e Ligation

Des ratios variables de plasmide/insert sont mis en présence d'ATP (10 mM), de T4 DNA ligase (1 unité, Roche), tampon de ligation 10X (Roche), H₂O (qsp 20 µL). Le même procédé a été utilisé pour le clonage des shRNA dirigés contre la forme humaine et murine du gène *CtBP1* et leurs contrôles respectifs. La ligation se déroule dans un très petit volume et à basse température, afin de faciliter le rapprochement des extrémités cohésives de l'insert que représentées par les séquences double brin de shARN de CtBP1 et Hes1 et du vecteur pRNAt-U6 ouvert et l'action de la T4-ADN ligase. Le vecteur digéré purifié (50-400 ng) est mis en présence d'un excès d'insert digéré purifié (0.1-1 µg), de l'enzyme T4-DNA ligase (1 µL Promega), dans du tampon de ligation (Tris-HCl 300 mM pH 7.8, MgCl₂ 100 mM, DTT 100 mM, ATP 10mM), le tout complété d'eau (qsp 20 µL). La solution est incubée à 16°C, pendant une nuit entière. Dans le cas d'un clonage de petits inserts (≤ 1Kb), il peut être nécessaire d'augmenter le ratio insert/vecteur pour maximiser le succès du clonage. La température de ligation peut également être diminuée pour favoriser le rapprochement de l'insert et du vecteur. Les produits de ligation sont déposés sur gel, avant d'être transformés dans des bactéries.

2-2-2-f Transformation des bactéries compétentes

Les expériences de transformations des plasmides pRNAt-U6 ont nécessité le recours à des bactéries plus adaptées à ce type de plasmide, les Stable III (Invitrogen) et transformées par choc thermique. Elles sont dégelées 30 min. à TP, 50 µL de bactéries est ajouté au produit de ligation (ou contrôle positif Puc19), le mélange est placé 30 min. sur glace, 45 sec, à 45°C, puis 5 min. sur glace. Les bactéries sont ensuiteensemencées dans 250 µL de milieu LB et incubées 2 h. à TP, sous agitation, avant d'être étalées sur des pétris contenant l'agent de sélection ampicilline. Elles sont ensuite placées sur la table de travail, à TP, pour 2 à 4 jours. Lorsque la construction est validée par la digestion, un stock glycérol est constitué (900 µL milieu de culture et 600 µL glycérol 15 %).

2-2-3 Préparation des ADN plasmidiques

Les expériences de clonage nécessitent le recours à de l'ADN plasmidique des vecteurs pRNAt-U6, sont obtenus à partir de petites préparations d'ADN.

Une fraction de bactéries Stable III contenant l'ADN plasmidique du vecteur pRNAt-U6 est incubée, dans 2 mL de milieu Luria Bertani (LB stérile: 1% tryptone (m/v); 0,5% extrait de levures; 0,5% NaCl (m/v)). Le milieu est supplémenté d'antibiotique spécifique au plasmide choisi permettant une sélection des bactéries résistantes toute la nuit (12h, à 37°C, sous agitation continue 250 rpm).

Le lendemain, le milieu est centrifugé (10 min, 4 000 rpm, 4°C), le surnageant est aspiré et le culot dissout, dans tampon de resuspension froid (50 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA; 100 µg/mL Rnase A), incubé 10 min à température pièce (TP), avant l'ajout de 250 µL de tampon de lyse (200 mM NaOH, 1% SDS (m/v)). Après une incubation de 10 min à TP, 350 µL de tampon de neutralisation froid (3 M potassium acétate; pH 5,5) sont ajoutés au mélange qui est incubé 5 min sur glace. Après une centrifugation (10 min, 5 000 rpm, 4°C), le surnageant est récolté (environ 800 µL) et complété d'un volume de chloroforme (800 µL). Le tout est centrifugé (10 min, 5 000 rpm, 4°C), puis le surnageant est transféré dans un nouvel eppendorf, dans lequel est ajouté un volume d'isopropanol.

Après une centrifugation (10 min, 5 000 rpm, 4°C), le culot est lavé à EtOH 70 %, séché 5 min. puis resuspendu dans 50 µL de tampon TE (10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA). Les transfections utilisent des quantités plus grandes de plasmides pRNAt-U6 vide ou contenant les séquences shARN, aussi l'ADN est préparé comme indiqué au paragraphe 1-1-2, à ceci près que pRNAt-U6 est dit à faible copie, la culture est donc réalisée dans un volume de 200 mL de milieu de culture LB.

2-2-4 Transfection des ARNi

2-2-4-a Transfection des shARN

Les plasmides pRNAt-U6-CtBP1 sont transfectés dans les cellules suivant le protocole de chlorure de calcium. La transfection est réalisée sur un pétri 100 mm de cellules HEK 293T à demi confluence (2×10^6 cellules) passées la veille (Coulter Particule Counter). Le lendemain un mélange de transfection pour 1 mL est réalisé avec 5 à 10 μ g d'ADN, TE 1X pH8 (10 mM Tris-HCl pH7.6; 1 mM EDTA); CaCl₂ 0,5 M. Le mélange est ensuite déposé goutte à goutte, dans une solution de HEBS 2X pH 7,05 (140 mM NaCl; 1,5 mM Na₂HPO₄+7H₂O; 50 mM HEPES) et incubé à TP 30 min, avant d'être déposé, goutte à goutte, sur les cellules, dans le milieu de culture. La transfection des vecteurs viraux pRNAt-U6-CtBP1 et pRNAt-U6-Hes1 a également été utilisée dans le cadre d'expériences de transduction. Le protocole de transfection au chlorure de calcium ont été réalisées suivant le même procédé que celui décrit pour les lentivirus. Les constructions lentivirales pRNAt-U6-Ctbp1, pRNAt-U6-CTBP1 ou pRNAt-U6-Hes1 sont transfectées à raison de 20 μ g, complété de 15 μ g pCMV- Δ R8.91 et 5 μ g pMD.G.

2-2-4-b Transfection des Stealth

Les HeLa sont étalées sur pétris (100 mm ou plaque 6 puits) la veille, leur confluence varie suivant l'utilisation : pour les tests de survie avec la MMC, un total de $0,5 \cdot 10^5$ cellules/puits sont étalées (Coulter Particule Counter). Le lendemain, la transfection a lieu selon les recommandations du fabricant. Dans un premier eppendorf, un mélange de 250 μ L d'Opti-MEM I *Reduced Serum Medium* (Gibco) et de Stealth (50 ou 500 pmoles), dans un second tube 5 μ L de Lipofectamine 2000 et 250 μ L d'Opti-MEM, sont incubés 5 min, à TP. Un homogénat des deux solutions est placé 20 min, à TP, avant le dépôt goutte à goutte, sur les cellules incubées, à 37°C dans 5 % CO₂. Les premières expériences de transfection des Stealth ont été réalisées en présence d'un contrôle de transfection, un oligonucléotide fluorescent (Block-it Fluorescent Oligo, Invitrogen), cotransfecté avec les ARNi, à raison de 100 nM de Block-it par mélange de transfection.

2-3 Immunofluorescence

Dans le cadre d'une utilisation en immunofluorescence, les cellules HeLa sont étalées sur des lamelles (22x22, Fisher Scientific), dans des plaques six puits, à raison de $0,2 \times 10^5$ cellules/puits. Le lendemain, les cellules sont transfectées à la lipofectamine 2000, avec les séquences Stealth (cf. section 2-2-4b) et incubées à 37 °C, dans un environnement 5% CO₂, pour une période de 24-72 h. Une partie des cellules reçoit une dose de MMC (40 ng/mL du stock 1 mM). Après 1 h. de stimulation, le milieu de culture est changé et les cellules sont incubées à 37 °C, pendant 3 h. Le milieu est ensuite aspiré, après deux lavages au PBS, 1 mL de méthanol/acétone tiède est ajouté à la pipette pasteur, afin de fixer et perméabiliser les cellules. Les cellules sont alors placées 30 min à -20 °C. Pour FANC-D2, les cellules sont laissées à TP, pendant 20 min. Le milieu est ensuite retiré, après un lavage au PBS, avant de procéder à la réhydratation, durant laquelle les cellules sont recouvertes de 2 mL de PBS pendant 10 min, sous agitation, à TP. Le milieu est aspiré, on procède ensuite à l'ajout de l'anticorps primaire (α -FANC-D2 souris monoclonal; dilution 1/25, Santa Cruz) ou (α -CtBP1 lapin polyclonal, USBiological, dilution 1/100), dilué dans une solution de PBS, 0,1 % saponine, 2 % BSA (volume final 100 μ L). La solution est déposée au centre de la lamelle et la plaque incubée 1 h 30 min dans le noir à 4 C. Les cellules sont ensuite lavées deux fois avec du PBS, avant de procéder à l'ajout de l'anticorps secondaire, dilué dans une solution PBS; 0,1 % saponine (volume final 100 μ L). Pour la protéine FANC-D2, l'anticorps secondaire est un Alexa Fluor α -souris DAM 555 (dilution 1/250), pour CtBP1, l'anticorps secondaire est un chèvre- α -lapin 680 (dilution 1/400). Après une incubation de 1 h, dans le noir, les cellules sont lavées deux fois au PBS. Le marquage des noyaux est ensuite réalisé via une solution de 4',6'-Diamidino-2-phenylindole (DAPI, 100 ng/mL final). Les cellules sont incubées 15 min, à l'abri de la lumière, lavées trois fois avec du PBS et placées 10 min, dans le noir en présence de 100 μ L de *Slow Fade* (Invitrogen) (dilué v/v dans eau).

L'ajout de ce composé permet de réduire la perte de la fluorescence au cours du temps. Les lamelles sont ensuite décollées des puits et montées sur lame de microscope (25 x 75 x 1 mm, VWR Scientific) grâce à un liquide de montage Dako mounting medium (Sigma) et scellées par du vernis à ongles. L'observation des lames est réalisée via un microscope à fluorescence Nikon Eclipse E800, munie d'une lampe à mercure excitant les fluorochromes utilisés, la prise de photos avec une caméra Hamamastu ORCA-ER.

2-4 Survie cellulaire

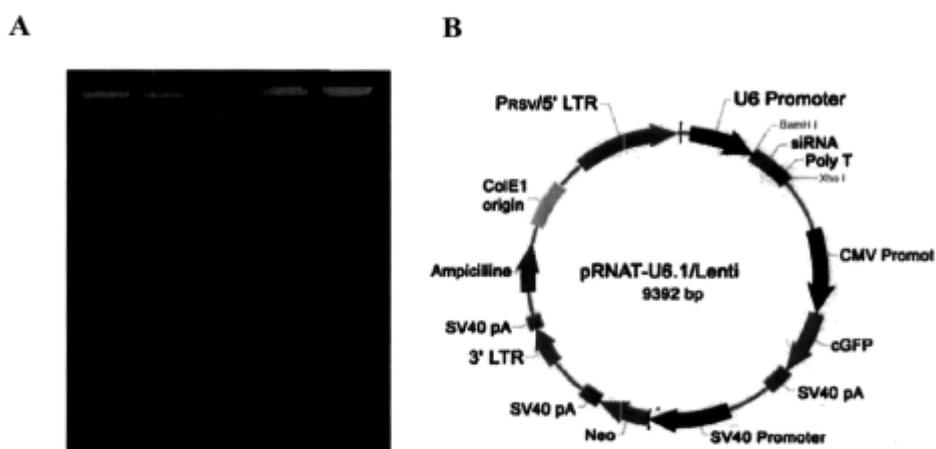
Après la transfection des cellules HeLa par les ARNi, de type shRNA ou Stealth, la capacité de survie des cellules est analysée par l'ajout de MMC, dans le milieu de culture, à raison de 30 ou 100vM par puit. Après cinq jours de culture, à 37°C, dans 5 % CO₂, les cellules sont lavées au PBS, recouvertes d'une solution de coloration au cristal violet et incubées à TP pendant 10 min. Après rinçage au PBS, la plaque est retournée pour faciliter le séchage. La survie des cellules est ensuite estimée par comparaison entre les cellules transduites avec les ARNi et les contrôles négatifs représentés par les cellules non transduites.

3- Résultats-Discussion

3-1 Résultats-Discussion relative à la protéine CtBP1

3-1-1 ARN interférent et profil d'expression de CtBP1 : validation des constructions

Les constructions de shARN dirigées contre la forme humaine du gène CtBP1 ont été clonées dans un vecteur viral (**figure 1B**).



Figures 1: Clonage des shARN dans le vecteur lentiviral pRNAt-U6

(A) Analyse de la digestion du clonage des séquences shARN dans le vecteur viral pRNAt-U6 La digestion séquentielle des clones (EcoRI et XhoI) valide la structure (insert 400pb et plasmide ouvert 9kb) (B) pRNAt-U6 dispose d'une séquence *EGFP* sous contrôle du promoteur CMV.

Lors des premières expériences, il s'est avéré qu'un processus de recombinaison empêchait l'expression adéquate des fragments d'ARN interférence. Le protocole de transformation des constructions a été modifié et emploie aujourd'hui une souche de bactéries Stable III (Invitrogen), plus adaptée aux vecteurs lentiviraux.

Les digestions ont permis de constater la stabilité nécessaire à la fonctionnalité des structures shARN (**figure 1A**). L'utilisation du vecteur pRNAt-U6 disposant d'une séquence *EGFP*, permet d'estimer l'efficacité de transfection.

3-1-2 Estimation de l'expression CtBP1, après traitement par les shARN

L'efficacité des constructions shARN dirigées contre la forme humaine de la protéine CtBP1 a été estimée, lors d'analyse protéique et en Q-PCR. Les cellules HeLa transfectées avec la construction shARN CtBP1 ont fait l'objet d'une analyse protéique de CtBP1, au moyen d'immunobuvardages (**figure 2**).

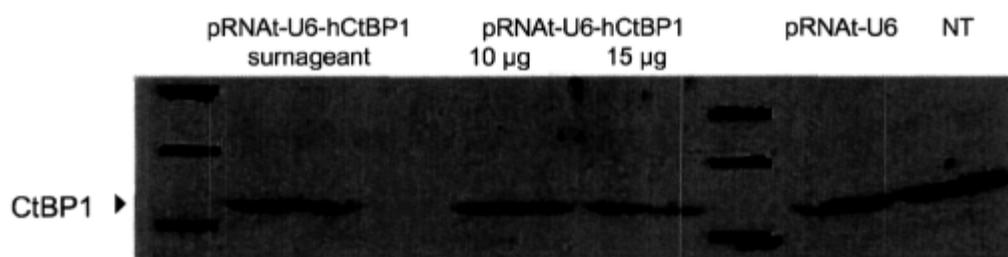


Figure 2: Réduction de l'expression protéique de CtBP1 par shARN

Analyse de l'expression protéique CtBP1, dans les cellules HeLa transfectées avec des concentrations variables de vecteur lentiviral pRNAt-U6-CtBP1, avec le vecteur vide pRNAt-U6 ou les cellules non transfectées. Les cellules HeLa transduites avec un surnageant viral de shARN contre CtBP1. Sondage primaire α -CtBP1 lapin (1/10 000), sondage secondaire α -lapin (1/5 000). Expérience reproduite (n = 4).

Dans les cellules HeLa, la transfection des shARN induit une réduction de l'expression protéique CtBP1, comparativement aux cellules non transfectées ou transfectées avec le vecteur vide pRNAt-U6. Un effet plateau est observé à partir de 10 µg de plasmide pRNAt-U6-CtBP1 transfecté.

Certaines cellules HeLa ont fait l'objet d'une transduction avec un surnageant viral produit dans des cellules HEK293T. L'efficacité de cette transduction a été observée grâce à l'expression de la fluorescence exprimée par les HeLa.

L'analyse en immunobuvardage a confirmé l'efficacité des séquences shARN à réduire l'expression protéique de CtBP1. Malgré l'efficacité des shARN, leur utilisation a été interrompue, le contexte Fanconi rendant difficile le recours à ce type de technique d'ARNi. Pour les expériences d'interférence, le recours à une autre forme d'ARNi a été favorisé, les Stealth.

3-1-3 Estimation de l'expression CtBP1, après traitement par les Stealth

Lors de la mise au point de cette procédure et afin de délimiter les zones d'efficacité de chacune des trois séquences Stealth, des transfections ont été réalisées sur les cellules HeLa, avec une gamme de concentrations variables de Stealth (**figure 3**).

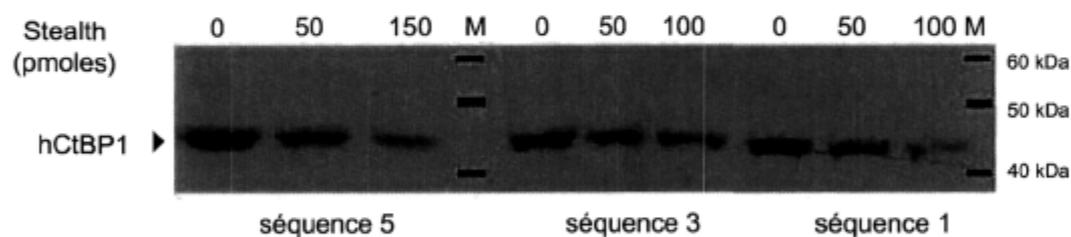


Figure 3: Réduction de l'expression protéique CtBP1 après traitement par Stealth

Analyse par immunobuvardage de l'expression protéique de CtBP1 dans les cellules HeLa transfectées avec une des trois séquences Stealth (1, 3 ou 5). Membrane sondée Anticorps primaire α -CtBP1 lapin (1/10 000), sondage secondaire α -lapin (1/5 000). Expérience reproduite avec $n = 14$.

Grâce à la transfection conjointe d'un marqueur fluorescent (Block-IT), l'efficacité de la transfection était estimée par simple observation au microscope à fluorescence. L'analyse protéique a confirmé l'efficacité de ces structures en réduisant l'expression protéique dès 50 pmoles. Cette réduction de CtBP1 devient maximale à 150 pmoles. Cependant, le recours à des concentrations plus élevées (250 à 500 pmoles) ou l'association de plusieurs séquences de Stealth, lors d'une même transfection, ne permet pas d'améliorer significativement ces résultats.

Si la réduction de l'expression de la protéine CtBP1 est notée pour toutes les séquences de Stealth (1, 3 et 5), les proportions de CtBP1 sont variables et témoignent d'une efficacité différentielle. Les plus efficaces étant les séquences 1 et 5, leurs effets sont potentialisés à 150 pmoles de Stealth. Les analyses quantitatives en Q-PCR, à partir de l'ARN extrait de cellules transfectées affinent les données obtenues précédemment (**figure 4**). La proportion de l'amplicon *CtBP1* est évaluée en fonction de la concentration de chacune des trois séquences Stealth (pmoles) (**figure 4A**). Les résultats présentés sous la forme d'un ratio CtBP1/GAPDH et comparés aux cellules non transfectées ou transfectées avec la séquence contrôle (séquence Stealth désordonnée) (**figure 4B**). L'étude a précisé la concentration et la séquence optimale, confirmant le bénéfice de la séquence 5 qui s'avère la plus active, avec une réduction de plus de 80 % de l'expression de l'amplicon, dans les HeLa transfectées. L'efficacité des constructions est proportionnelle à la concentration utilisée.

Cependant, à partir de 50 pmoles, l'efficacité de toutes les séquences Stealth devient équivalente. La réduction de l'expression du transcrit et de la protéine, valide l'efficacité des Stealth. Ces structures ont été utilisées pour évaluer l'implication de la protéine CtBP1, dans la voie cellulaire Fanconi et les conséquences induites par un défaut de son expression.

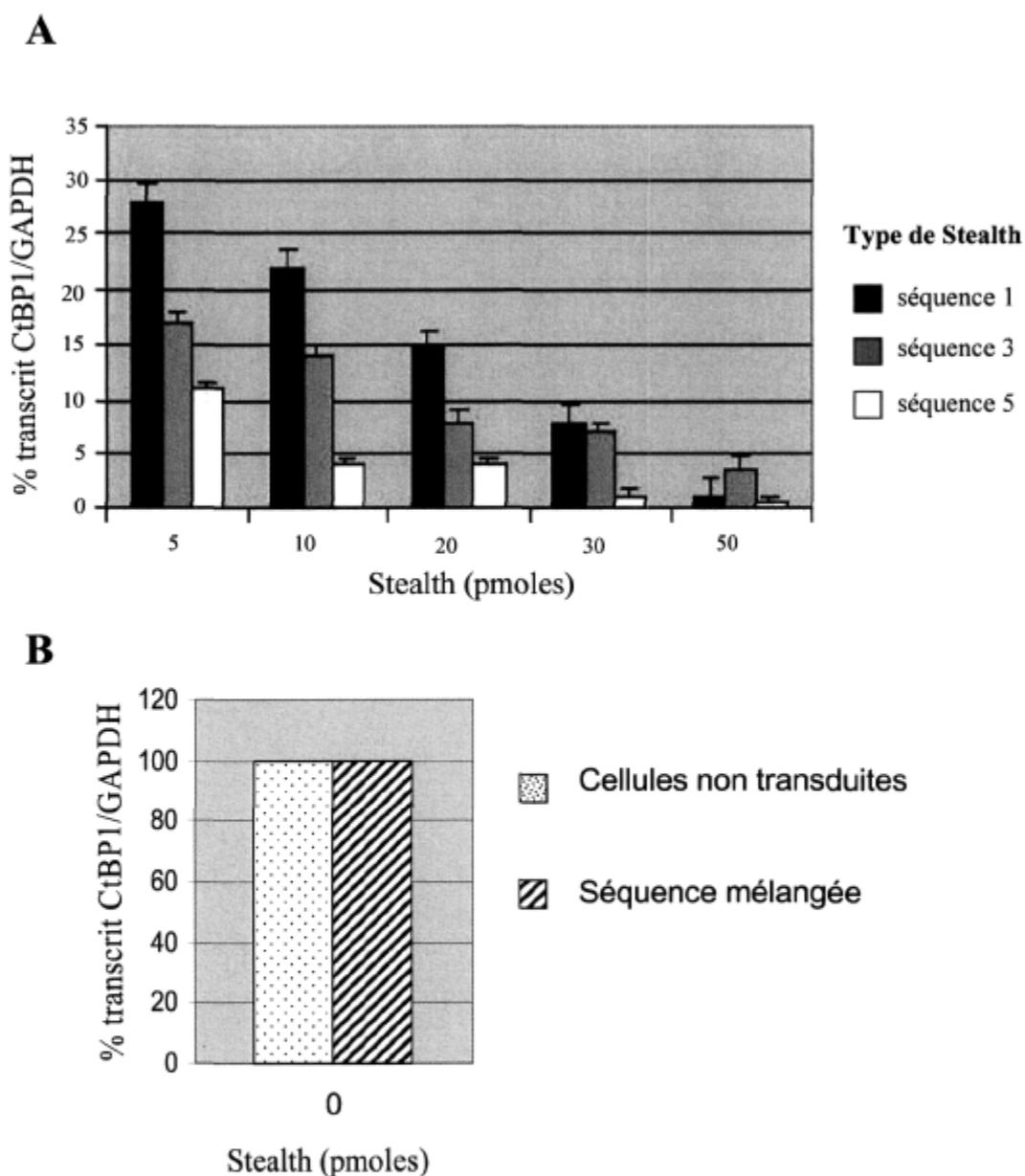


Figure 4: Q-PCR du transcrit CtBP1 dans les HeLa transfectées

(A) Analyse en Q-PCR de l'expression du transcrit *CtBP1* dans les HeLa transfectées avec chacune des trois séquences, à diverses concentrations.

(B) Analyse en Q-PCR de l'expression du transcrit *CtBP1* dans les cellules contrôles représentées par les cellules non transduites et les cellules transduites avec la séquence non interférente mélangée, +/- écart-type.

3-1-4 CtBP1 et résistance à la MMC

L'interaction entre les protéines Fanconi et le co-répresseur transcriptionnel CtBP1, observée dans notre laboratoire, suggère une potentielle implication de ces deux voies, dans un mécanisme commun.

Pour mieux cerner cette relation, dans un premier temps, l'efficacité du processus de réparation de l'ADN a été évaluée, dans les cellules HeLa. Cet examen a consisté à transfecter les cellules avec une des trois séquences Stealth, avant d'ajouter dans le milieu de culture des concentrations croissances de MMC (0, 30 et 100 nM). Pour chaque condition, les cellules sont réparties sur trois puits transfectés, le premier ne recevant que le mélange de transfection, le deuxième complété d'une concentration de 30 nM de MMC et le troisième de 100 nM de MMC.

Les cellules non transfectées, transfectées avec la séquence de Stealth non interfèrent ou ayant uniquement reçu le mélange de transfection (Lipofectamine, Opti-MEM) ont été utilisées comme contrôles négatifs.

La sensibilité les cellules fibroblastiques de patients Fanconi appartenant au groupe de complémentation A (PD430) est utilisée comme contrôle positif. Après 5 jours de culture, les cellules sont colorées et la survie estimée, après coloration au cristal violet au moyen d'une observation visuelle comparative (**figures 5**).

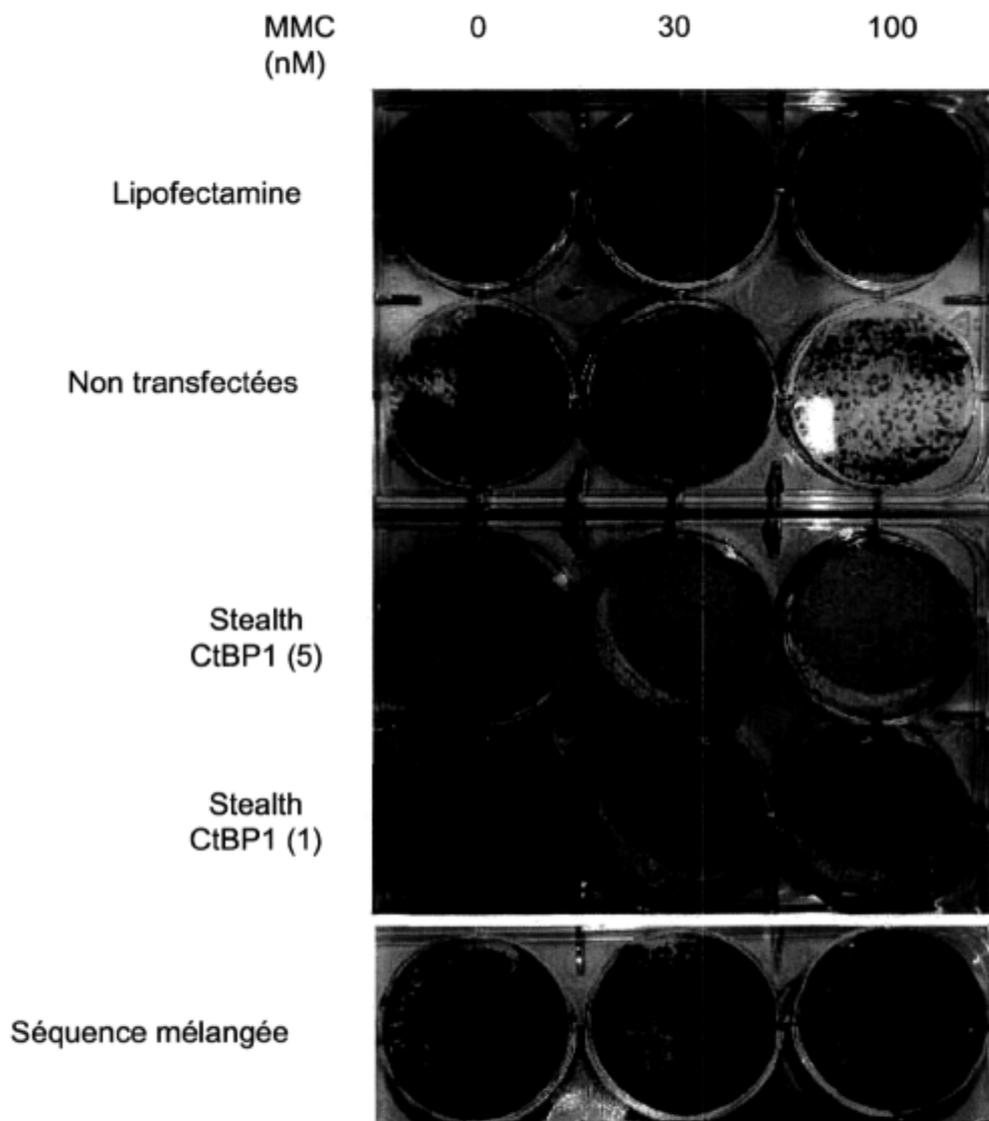


Figure 5: Survie cellulaire après traitement aux Stealth *CtBP1*

Analyse de la survie des cellules HeLa transfectées avec les séquences des Stealth 5 et 1 dirigées contre *CtBP1* et incubées 5 jours en présence de MMC. Les cellules non transfectées ou ayant reçu le mélange de transfection (Lipofectamine, Opti-MEM) sont des contrôles négatifs. Les expériences ont été reprises avec $n = 17$.

Les cellules transfectées avec l'une des trois constructions d'ARNi présentent une sensibilité exacerbée à l'agent pontant, se traduisant par une mortalité cellulaire accrue. Laquelle mortalité est comparable à celle des cellules de patients PD430, après exposition à la MMC (**figure 6**).

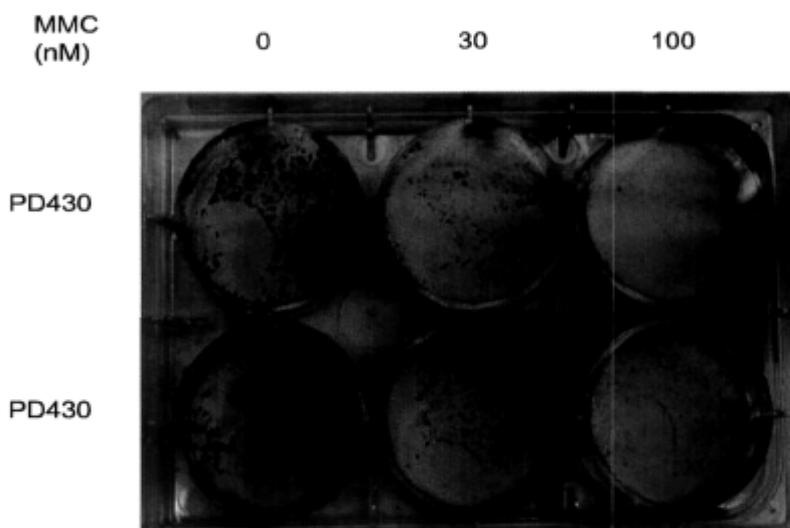


Figure 6: Survie des cellules de patients Fanconi après traitement à la MMC

Analyse de la capacité de survie des cellules fibroblastiques de patients Fanconi (PD430). Cellules utilisées comme contrôle, expérience reproduite avec (n = 4).

Ces expériences de survie cellulaire évoquent l'implication directe ou indirecte de la protéine CtBP1, dans le processus menant à la réparation des dommages causés par cette drogue. Si le rôle exact de la protéine CtBP1, dans le mécanisme qui conduit à restaurer l'intégrité de l'ADN n'est pas encore compris, les interactions qu'elle établit avec les éléments du complexe Fanconi sont de toute évidence un préalable indispensable. Un défaut de CtBP1 abolit ou réduit ces interactions, induisant un défaut dans l'activation de la cascade protéique de la voie Fanconi.

3-1-5 Expression du transcrit *CtBP1*, dans les cellules souches hématopoïétiques

L'éventualité d'une modification du profil d'expression du gène *CtBP1*, dans les cellules souches Fanconi a été suspectée. Des expériences en Q-PCR ont estimé les variations de cette voie, dans les cellules LT et dans les cellules CD34⁺ de souris *FancC*^{-/-} et sauvages. Le recours au facteur Wnt3a, activateur de la voie *CtBP1* a permis d'évaluer l'intégrité et la fonctionnalité de cette voie dans les CSH Fanconi (**figure 7**).

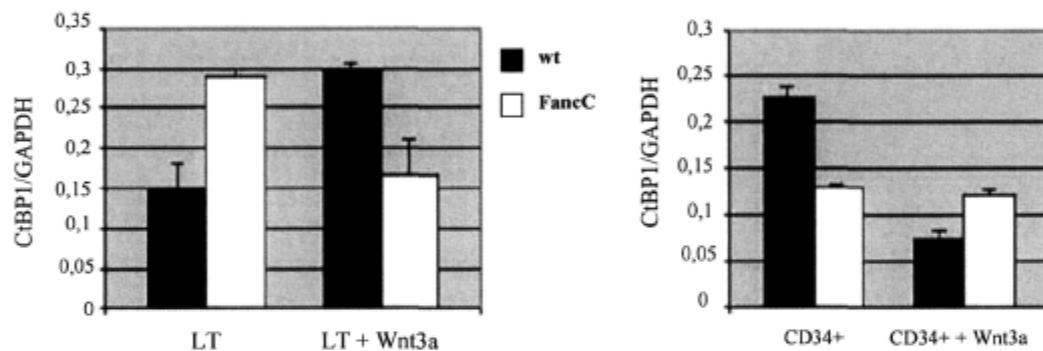


Figure 7: Expression du transcrit *CtBP1* dans les Lin-Thy1.2- et CD34+

Analyse par Q-PCR de l'expression du transcrit *CtBP1* dans les Lin-Thy1.2- (LT) et CD34⁺ de souris sauvages et *FancC*^{-/-}, à l'état basal et lors de l'activation par le facteur Wnt3a. Les données représentent l'expression relative du gène. Deux expériences indépendantes en duplicata, +/- écart-type.

Cette étude a été menée afin de déterminer si son atteinte est rapportée dans les cellules Fanconi et si ce transcrit peut agir comme facteur aggravant. Ces analyses ont révélé une surexpression de deux fois, du transcrit *CtBP1*, dans les cellules murines Lin-Thy1.2- *FancC*^{-/-}, comparativement aux cellules sauvages.

Alors que les cellules CD34⁺ FancC^{-/-} expriment ce transcrite dans une proportion réduite de trois fois comparativement aux cellules sauvages. Les analyses ont été reproduites en présence d'un activateur de la voie CtBP1 (Wnt3a) démontrant que les LT sauvages répondent à ce stimulus par une augmentation d'un facteur deux, de la proportion du transcrite. Alors que les LT FancC^{-/-} ne répondent pas de façon adéquate et diminuent de moitié l'expression de *CtBP1*, comparativement à son niveau basal. Une altération de l'expression du transcrite *CtBP1* est donc observable dans les cellules LT FancC^{-/-}. Dans les cellules CD34⁺, le facteur Wnt3a semble produire l'effet inverse. Alors que cette voie est retro-réglée négativement, dans le cas des cellules CD34⁺ sauvages, elle est maintenue à un niveau stable dans les CD34⁺ FancC^{-/-}.

Il est démontré que la surexpression du co-répresseur transcriptionnel CtBP1 est retrouvée, dans les lignées cellulaires cancéreuses³⁹. Ces résultats présument d'une implication du transcrite *CtBP1*, dans la voie Fanconi, sans permettre d'impliquer plus précisément ce gène. Par ailleurs, la différence entre les cellules LT et CD34⁺ témoigne d'un effet différentiel de ce transcrite, en fonction de la nature des cellules.

Dans les cellules plus primitives, CtBP1 inhiberait la différenciation, en réprimant la transcription de gènes impliqués. Sa présence et son interaction avec certains facteurs pourraient favoriser la croissance cellulaire⁴.

De plus, son implication est évoquée dans la différenciation anormale des progéniteurs médullaires, dans le modèle murin⁴. Ce qui pourrait représenter un indicateur de la survenue de telles pathologies chez les Fanconi. *CtBP1* apparaît donc comme un élément clé à surveiller, dans le contexte Fanconi.

3-1 Résultats-Discussion relative à la protéine Hes-1

3-2-1 *Hes1* et résistance à la MMC

L'étude ici présentée vise à compléter ces travaux en fournissant une preuve de l'implication de *Hes1* dans un processus physiologique, la restauration des dommages MMC-induits. Afin d'évoquer plus avant l'implication du facteur transcriptionnel *Hes1*, dans la voie Fanconi, des expériences similaires à CtBP1, ont été réalisées. Les cellules HeLa ont été transfectées avec une des deux séquences Stealth dirigées contre *Hes1*, puis stimulées à la MMC, pendant 5 jours consécutifs, avant analyse de leur capacité de survie (**figure 8**).

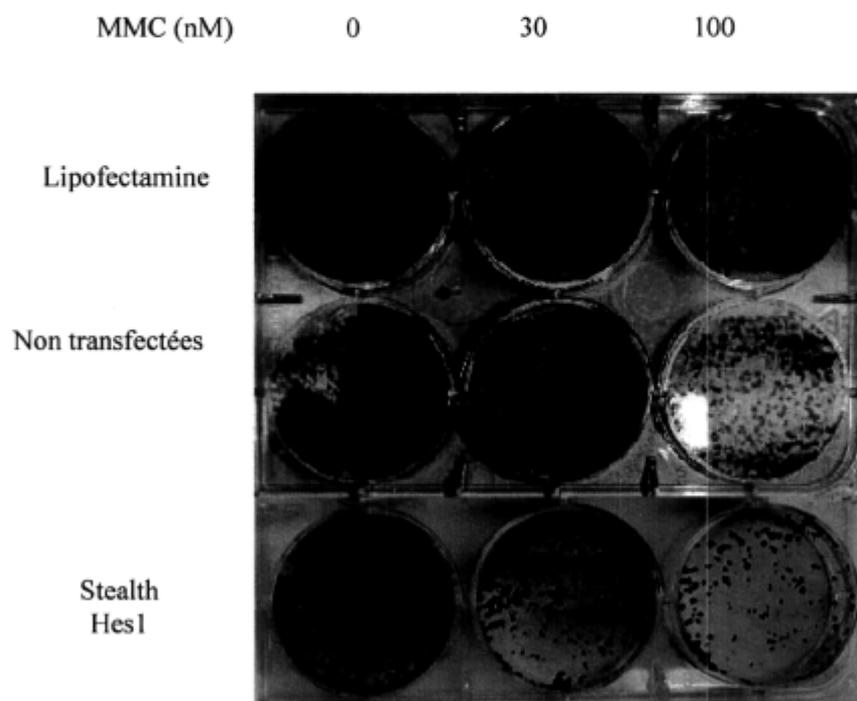


Figure 8: Survie cellulaire après traitement aux Stealth *Hes1*

Analyse de la survie des cellules HeLa transfectées avec un Stealth *Hes1* et traitées à la MMC. Contrôles négatifs, cellules non transfectées, transfectées avec la séquence mélangée. Contrôle positif, fibroblastes de patients PD430. Expérience reproduite avec n = 4.

Ces analyses ont utilisé comme contrôles négatifs, les cellules HeLa non transduites, les cellules HeLa transduites avec la séquence mélangée. Les contrôles positifs étaient représentés par les cellules de patients Fanconi (PD430).

Les expériences ont constaté l'hypersensibilité à la MMC des cellules transfectées avec les séquences Stealth dirigées contre le gène *Hes1*. Contrairement aux cellules contrôles, ces cellules ne sont plus en mesure de restaurer les dommages induits et d'assurer l'intégrité de leur patrimoine génétique. La protéine Hes1 serait impliquée d'une façon qui reste à déterminer dans le processus de réparation de l'ADN.

3-2-2 Expression du transcrit *Hes1*, dans les cellules souches hématopoïétiques

Le profil d'expression du gène *Hes1*, dans les CSH *FancC*^{-/-} et sauvages a été examiné, au cours d'expériences en Q-PCR. Alors que la stimulation par le facteur Wnt3a, a permis d'évaluer l'intégrité et la fonctionnalité de cette voie chez les Fanconi (**figure 9**).

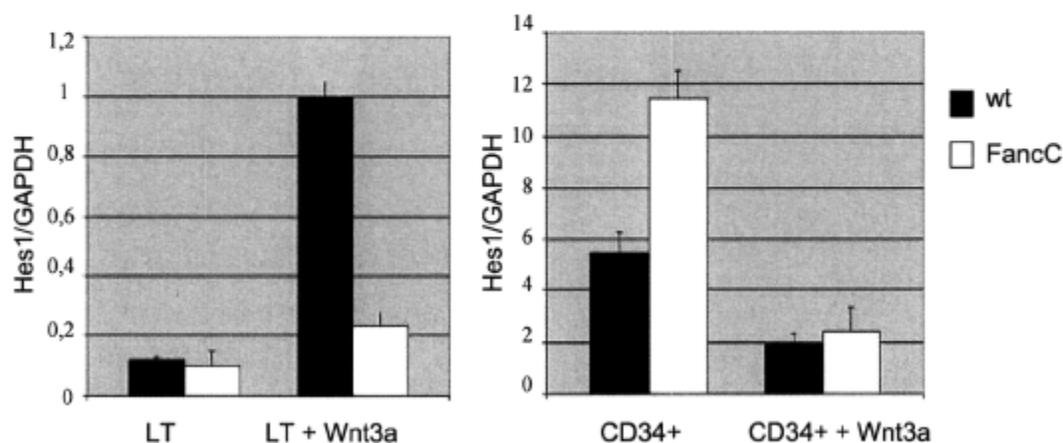


Figure 9: Expression du transcrit *Hes1* dans les Lin-Thy1.2- et CD34+

Analyses en Q-PCR du transcrit *Hes1* dans les cellules Lin-Thy- et CD34+, des souris sauvages et *FancC*^{-/-}, à l'état basal et après stimulation par Wnt3a. Les données représentent l'expression relative du gène. Trois expériences indépendantes en duplicata, +/- écart-type.

Plusieurs expérimentations, ont conclu que le niveau d'expression de ce transcrit est proportionnel au caractère immature d'une cellule. Les cellules CD34+ qui s'engagent vers la différenciation T⁴⁰ expriment des niveaux plus forts de *Hes1*. Les analyses en Q-PCR, réalisées sur différentes CSH, ont permis de démontrer une expression différentielle de *Hes1*, selon le caractère plus ou moins souche d'une cellule. Ainsi, ses niveaux sont en moyenne 60 fois plus élevés, dans les cellules CD34+ sauvages, que dans les cellules Lin-Thy1.2- sauvages. Lorsque l'on examine les niveaux du transcrit, dans les cellules CD34+ et Lin-Thy1.2- de souris *FancC*^{-/-}, la majoration de *Hes1* dans les cellules primitives CD34+ est retrouvée, mais dans une proportion plus importante, puisque le transcrit est 110 fois plus exprimé dans les cellules primitives qu'il ne l'est dans les Lin-Thy1.2-. Ces données confirment le caractère fondamental de ce transcrit dans le maintien de l'état indifférencié des cellules primitives.

Par ailleurs, ces données révèlent que la préservation du caractère souche des CSH primitives issues des souris *FancC*^{-/-} est en moyenne deux fois plus importante que dans les sauvages. Lors d'une stimulation par le facteur Wnt3a, l'expression du transcrit dans les cellules Lin-Thy1.2- est augmentée d'un facteur 10, dans les sauvages et d'un facteur 2 dans les *FancC*^{-/-}. La voie qui conduit à l'activation de l'expression du transcrit *Hes1*, dans les LT est donc altérée chez les animaux *FancC*^{-/-}.

En revanche, dans toutes les CD34+, sauvages comme Fanconi, le facteur Wnt3a réduit de façon drastique l'expression de *Hes1*, qui devient alors équivalente dans les CD34+, indifféremment du génotype après une stimulation par Wnt3a.

4- Conclusion

Des études ont permis de conforter la théorie voulant que la protéine CtBP1 puisse être impliquée dans la voie Fanconi. Les expériences d'ARNi révèlent son implication, dans les mécanismes de réparation de l'ADN consécutivement aux lésions induites par la MMC. L'examen de l'expression du transcrit *CtBP1* dans les CSH *FancC*^{-/-} et sa comparaison avec les sauvages, démontre un problème dans l'induction de son expression, en réponse à un stimulus induit par Wnt3a.

L'ensemble de ces données semble confirmer l'implication de cette protéine dans l'une des séquences activatrices de la voie Fanconi.

Les expériences en ARNi sur le co-répresseur transcriptionnel Hes1 et l'examen de son expression dans les CSH ont permis de conforter les hypothèses émises par notre équipe sur la possible implication de cette protéine dans la voie Fanconi. Les cellules sous exprimant la protéine Hes1 développent une sensibilité à la MMC. Alors que les cellules LT sous expriment le transcrit, dont l'expression n'est que faiblement induite par le facteur Wnt3a. En revanche, il semble que pour préserver leur caractère immature, les cellules CD34+ favorisent sa surexpression.

Dans le cas de la protéine CtBP1, comme dans celui de la protéine Hes1, l'étape essentielle serait de parvenir à disposer de patients décrits phénotypiquement comme étant Fanconi et présentant une mutation de l'une ou de l'autre de ces protéines. Cette étape permettrait de les identifier clairement comme un élément à part entière du complexe et donc comme de nouvelles protéines Fanconi. Il existe actuellement une certaine fraction de patients, qui bien que présentant toutes les caractéristiques d'un patient Fanconi, n'appartient à aucun des 13 groupes de complémentation connus. Ces malades sont d'autant plus importants qu'ils suggèrent l'implication d'autres protéines Fanconi.

BIBLIOGRAPHIE

1. Haneline LS, Gobbett TA, Ramani R, et al. Loss of FancC function results in decreased hematopoietic stem cell repopulating ability. *Blood*. 1999;94:1-8.
2. Haneline LS, Li X, Ciccone SL, et al. Retroviral-mediated expression of recombinant Fance enhances the repopulating ability of Fance^{-/-} hematopoietic stem cells and decreases the risk of clonal evolution. *Blood*. 2003;101:1299-1307.
3. Chinnadurai G. CtBP family proteins: more than transcriptional corepressors. *Bioessays*. 2003;25:9-12.
4. Senyuk V, Chakraborty S, Mikhail FM, Zhao R, Chi Y, Nucifora G. The leukemia-associated transcription repressor AML1/MDS1/EVI1 requires CtBP to induce abnormal growth and differentiation of murine hematopoietic cells. *Oncogene*. 2002;21:3232-3240.
5. Rathbun RK, Faulkner GR, Ostroski MH, et al. Inactivation of the Fanconi anemia group C gene augments interferon-gamma-induced apoptotic responses in hematopoietic cells. *Blood*. 1997;90:974-985.
6. Haneline LS, Broxmeyer HE, Cooper S, et al. Multiple inhibitory cytokines induce deregulated progenitor growth and apoptosis in hematopoietic cells from Fac^{-/-} mice. *Blood*. 1998;91:4092-4098.
7. Otsuki T, Nagakura S, Wang J, Bloom M, Grompe M, Liu JM. Tumor necrosis factor-alpha and CD95 ligation suppress erythropoiesis in Fanconi anemia C gene knockout mice. *J Cell Physiol*. 1999;179:79-86.
8. Habi O, Delisle MC, Messier N, Carreau M. Lack of self-renewal capacity in Fance^{-/-} stem cells after ex vivo expansion. *Stem Cells*. 2005;23:1135-1141.
9. Pagano G, Degan P, d'Ischia M, et al. Oxidative stress as a multiple effector in Fanconi anaemia clinical phenotype. *Eur J Haematol*. 2005;75:93-100.
10. Miyake N, Brun AC, Magnusson M, Miyake K, Scadden DT, Karlsson S. HOXB4-induced self-renewal of hematopoietic stem cells is significantly enhanced by p21 deficiency. *Stem Cells*. 2006;24:653-661.
11. Carlesso N, Aster JC, Sklar J, Scadden DT. Notch1-induced delay of human hematopoietic progenitor cell differentiation is associated with altered cell cycle kinetics. *Blood*. 1999;93:838-848.
12. Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:3120-3125.
13. Stier S, Cheng T, Dombkowski D, Carlesso N, Scadden DT. Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood*. 2002;99:2369-2378.
14. Aster JC, Pear WS. Notch signaling in leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2001;8:237-244.

15. Capobianco AJ, Zagouras P, Blaumueller CM, Artavanis-Tsakonas S, Bishop JM. Neoplastic transformation by truncated alleles of human NOTCH1/TAN1 and NOTCH2. *Mol Cell Biol.* 1997;17:6265-6273.
16. Kunisato A, Chiba S, Nakagami-Yamaguchi E, et al. HES-1 preserves purified hematopoietic stem cells ex vivo and accumulates side population cells in vivo. *Blood.* 2003;101:1777-1783.
17. Li X, Le Beau MM, Ciccone S, et al. Ex vivo culture of Fancc^{-/-} stem/progenitor cells predisposes cells to undergo apoptosis, and surviving stem/progenitor cells display cytogenetic abnormalities and an increased risk of malignancy. *Blood.* 2005;105:3465-3471.
18. Kleber M, Sommer L. Wnt signaling and the regulation of stem cell function. *Curr Opin Cell Biol.* 2004;16:681-687.
19. Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1653:1-24.
20. Simon M, Grandage VL, Linch DC, Khwaja A. Constitutive activation of the Wnt/beta-catenin signalling pathway in acute myeloid leukaemia. *Oncogene.* 2005;24:2410-2420.
21. Kikuchi A. Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. *Cancer Sci.* 2003;94:225-229.
22. Forster K, Obermeier A, Mitina O, et al. Role of p21(WAF1/CIP1) as an attenuator of both proliferative and drug-induced apoptotic signals in BCR-ABL-transformed hematopoietic cells. *Ann Hematol.* 2007.
23. Wang X, Andreassen PR, D'Andrea AD. Functional interaction of monoubiquitinated FANCD2 and BRCA2/FANCD1 in chromatin. *Mol Cell Biol.* 2004;24:5850-5862.
24. Sengupta A, Banerjee D, Chandra S, et al. Deregulation and cross talk among Sonic hedgehog, Wnt, Hox and Notch signaling in chronic myeloid leukemia progression. *Leukemia.* 2007;21:949-955.
25. Troadec MB, Courselaud B, Detivaud L, et al. Iron overload promotes Cyclin D1 expression and alters cell cycle in mouse hepatocytes. *J Hepatol.* 2006;44:391-399.
26. Bouchard C, Thieke K, Maier A, et al. Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *Embo J.* 1999;18:5321-5333.
27. Sala-Trepat M, Rouillard D, Escarceller M, Laquerbe A, Moustacchi E, Papadopoulo D. Arrest of S-phase progression is impaired in Fanconi anemia cells. *Exp Cell Res.* 2000;260:208-215.
28. Dang CV, Resar LM, Emison E, et al. Function of the c-Myc oncogenic transcription factor. *Exp Cell Res.* 1999;253:63-77.
29. Baena E, Ortiz M, Martinez AC, de Alboran IM. c-Myc is essential for hematopoietic stem cell differentiation and regulates Lin(-)Sca-1(+)c-Kit(-) cell generation through p21. *Exp Hematol.* 2007;35:1333-1343.
30. Srour EF, Jetmore A, Wolber FM, et al. Homing, cell cycle kinetics and fate of transplanted hematopoietic stem cells. *Leukemia.* 2001;15:1681-1684.
31. Szilvassy SJ, Meyerrose TE, Ragland PL, Grimes B. Homing and engraftment defects in ex vivo expanded murine hematopoietic cells are associated with downregulation of beta1 integrin. *Exp Hematol.* 2001;29:1494-1502.

32. Jetmore A, Plett PA, Tong X, et al. Homing efficiency, cell cycle kinetics, and survival of quiescent and cycling human CD34(+) cells transplanted into conditioned NOD/SCID recipients. *Blood*. 2002;99:1585-1593.
33. Kang EM, Hanazano Y, Frare P, et al. Persistent low-level engraftment of rhesus peripheral blood progenitor cells transduced with the fanconi anemia C gene after conditioning with low-dose irradiation. *Mol Ther*. 2001;3:911-919.
34. Verger A, Quinlan KG, Crofts LA, et al. Mechanisms directing the nuclear localization of the CtBP family proteins. *Mol Cell Biol*. 2006;26:4882-4894.
35. Deftos ML, Huang E, Ojala EW, Forbush KA, Bevan MJ. Notch1 signaling promotes the maturation of CD4 and CD8 SP thymocytes. *Immunity*. 2000;13:73-84.
36. Jarriault S, Le Bail O, Hirsinger E, et al. Delta-1 activation of notch-1 signaling results in HES-1 transactivation. *Mol Cell Biol*. 1998;18:7423-7431.
37. Kaneta M, Osawa M, Sudo K, Nakauchi H, Farr AG, Takahama Y. A role for pref-1 and HES-1 in thymocyte development. *J Immunol*. 2000;164:256-264.
38. Tomita K, Hattori M, Nakamura E, Nakanishi S, Minato N, Kageyama R. The bHLH gene *Hes1* is essential for expansion of early T cell precursors. *Genes Dev*. 1999;13:1203-1210.
39. Jin W, Scotto KW, Hait WN, Yang JM. Involvement of CtBP1 in the transcriptional activation of the MDR1 gene in human multidrug resistant cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 2007;74:851-859.
40. Hoebeke I, De Smedt M, Stolz F, et al. T-, B- and NK-lymphoid, but not myeloid cells arise from human CD34(+)CD38(-)CD7(+) common lymphoid progenitors expressing lymphoid-specific genes. *Leukemia*. 2007;21:311-319.