

Inserm



Institut national
de la santé et de la recherche médicale



Epidermolyses bulleuses:

physiopathologie

génotype/phénotype

Diagnostic anténatal

Structure/fonction

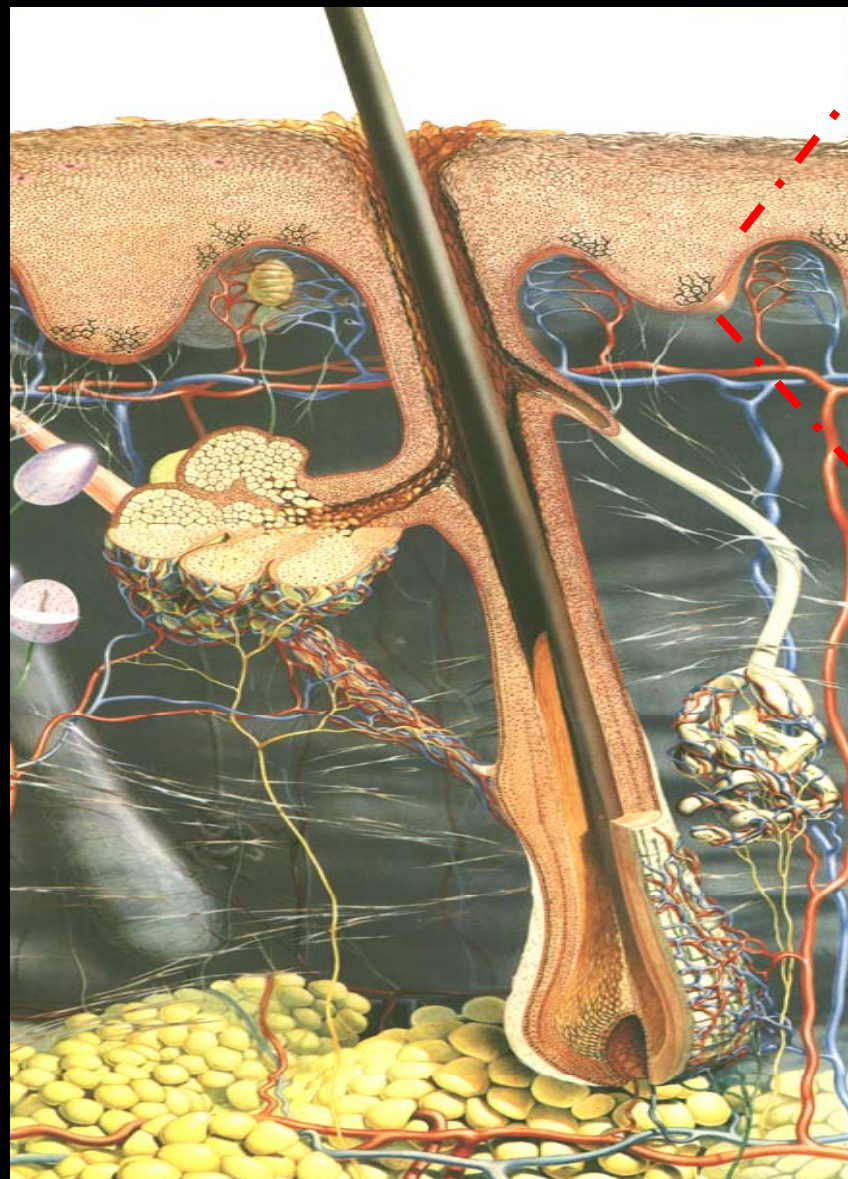
réversion phénotypique

thérapie génique

ABERDAM Daniel

INSERM U634

aberdam@unice.fr

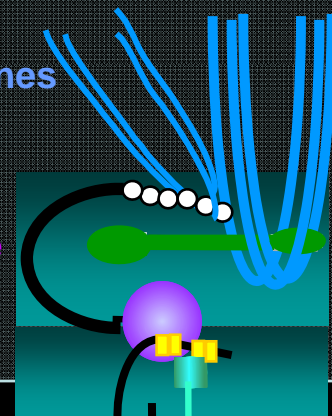


kératinocyte

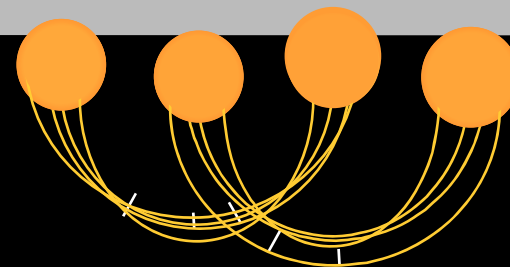
Cytokératines

Plectine

BP280



Collagène VII



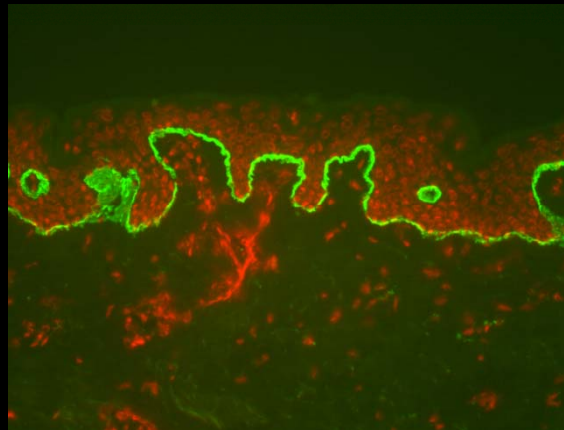
Anticorps monoclonal GB3

Immunisation de souris par des antigènes

Collecte du sérum (lymphocytes B)

Fusion des lymphocytes B avec une lignée lymphoma:
hybridome

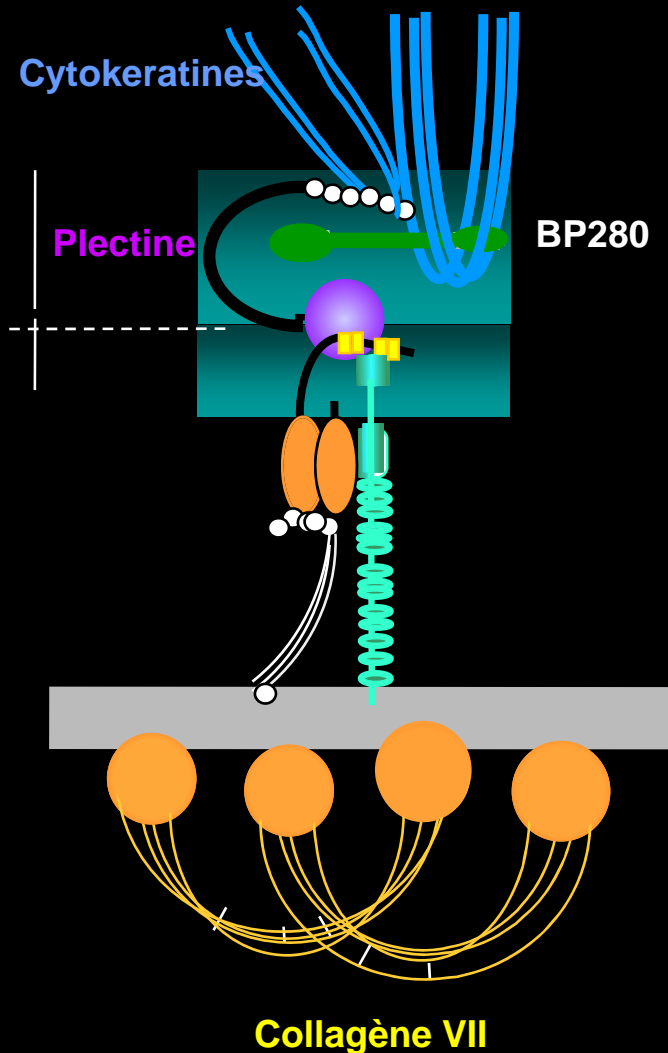
Sélection clonale d'un hybridome



EPIDERMOLYSIS BULLOSA

(EB)

Epidermolyse Bulleuse Simplex
Epidermolyse Bulleuse Jonctionnelle
Epidermolyse Bulleuse Dystrophique

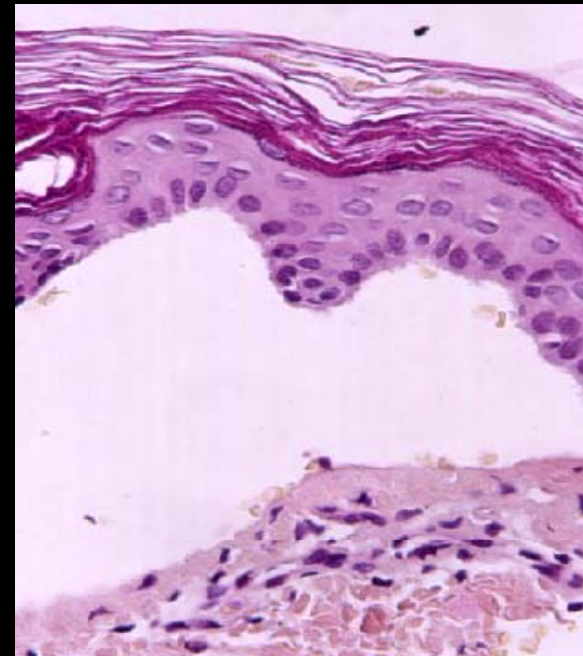


EBS
(R)

EBJ
(R)

EBD
(D et R)

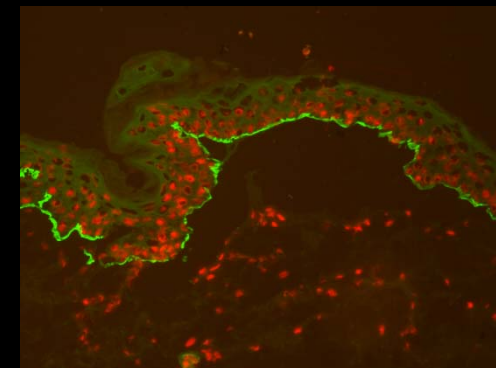
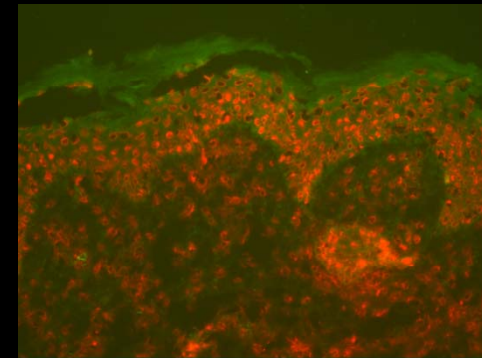
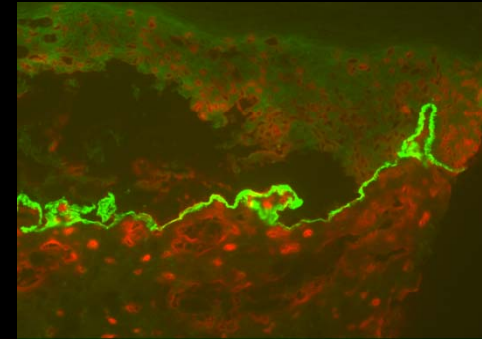
Peau EB



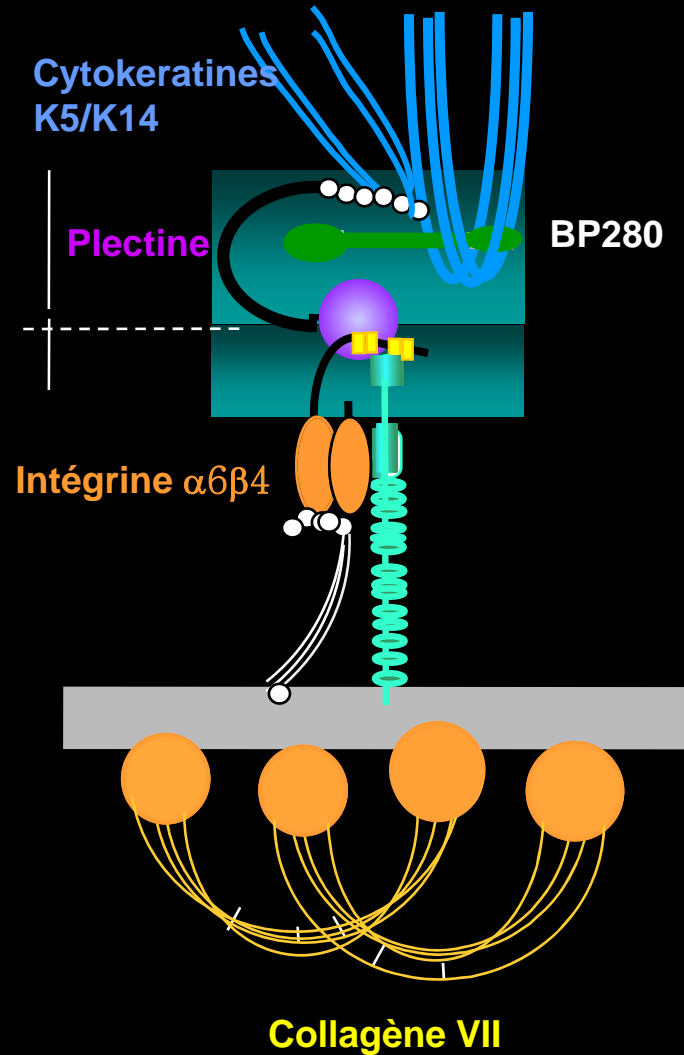
Epiderme

Derme

Anticorps monoclonal GB3



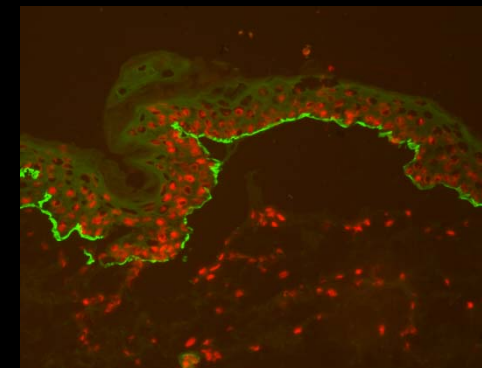
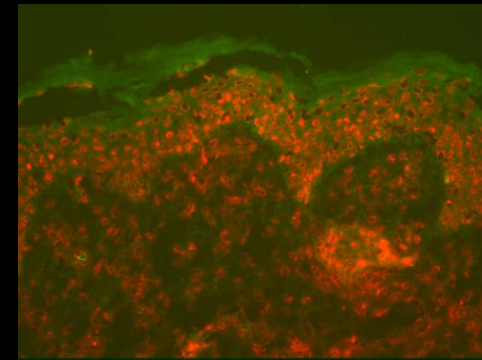
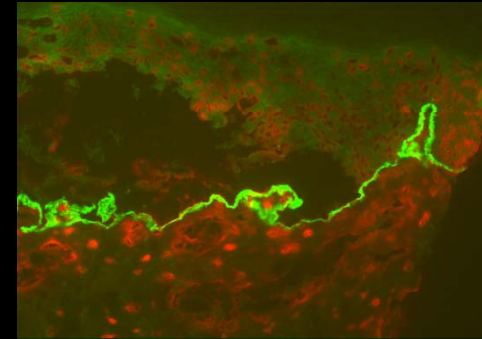
Anticorps monoclonal GB3



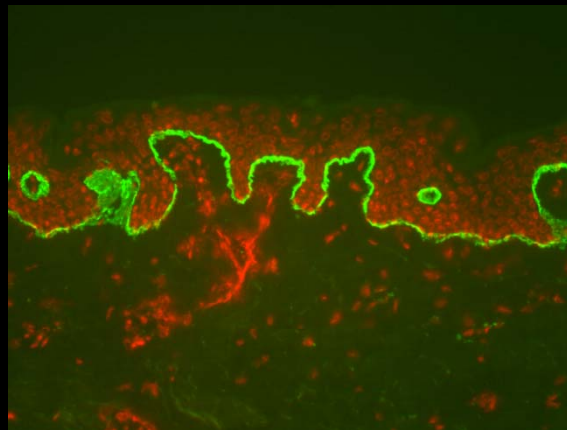
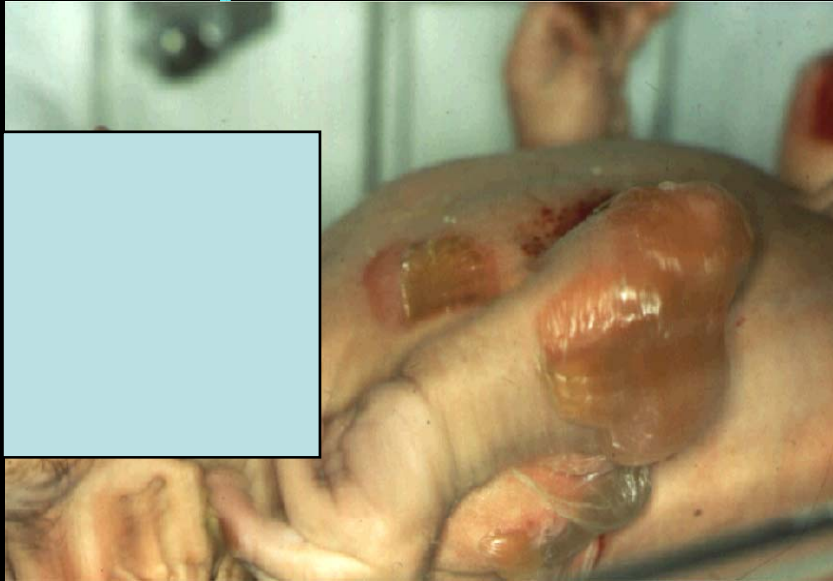
EBS

EBJ

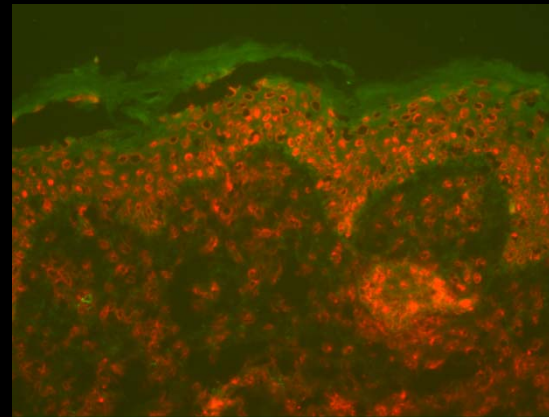
EBD



•Epidermolyse bulleuse
jonctionnelle(EBJ)



contrôle



EBJ



Cellules du patient

```
graph TD; A[Cellules du patient] --> B[ADN génomique]; A --> C[ARNm]; A --> D[Protéines]; B --- B1[Southern blot]; B --- B2[PCR]; B --- B3[Banque génomique]; B --- B4[ChIP]; C --- C1[Northern blot]; C --- C2[RT-PCR]; C --- C3[Banque d'ADNc]; C --- C4[Banque d'expression]; D --- D1[Western blot]; D --- D2[IP]; D --- D3[Anticorps];
```

ADN génomique

Southern blot

PCR

Banque génomique

ChIP

ARNm

Northern blot

RT-PCR

Banque d'ADNc

Banque d'expression

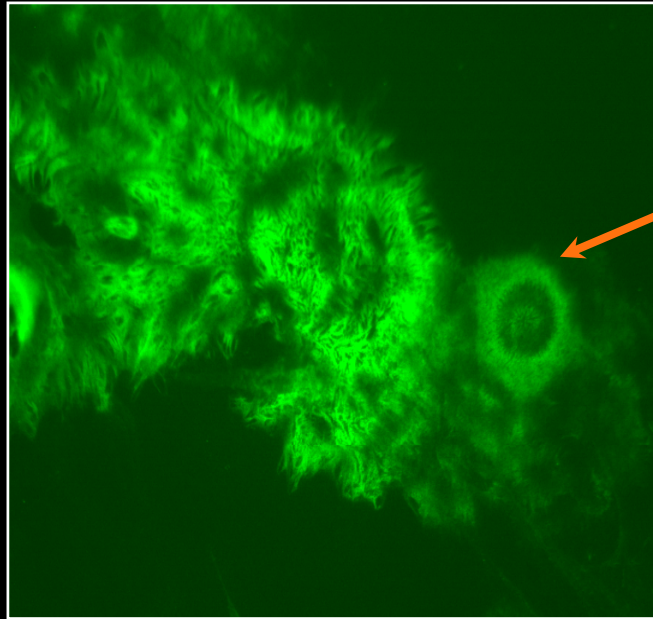
Protéines

Western blot

IP

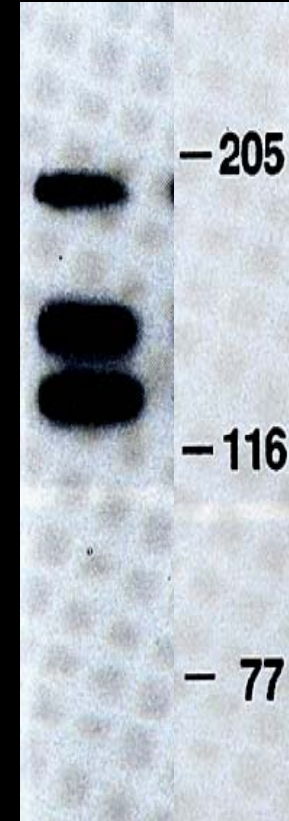
Anticorps

Molécule trimérique, sécrétée dans la MEC



IF

Protéine sécrétée



IP

Colonne d'affinité GB3

Criblage de
banque
d'expression

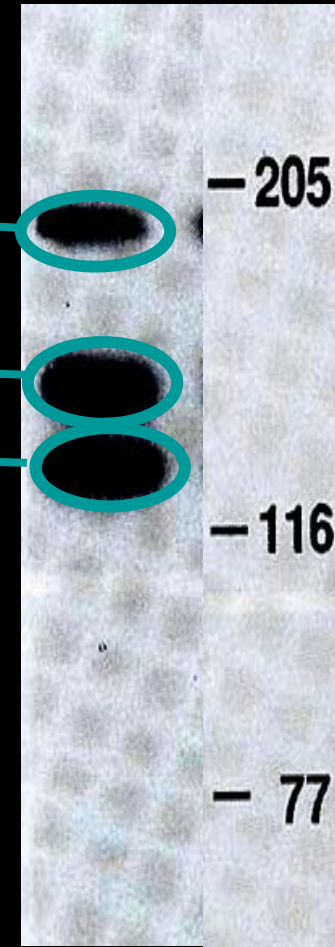
Anticorps
polyclonaux

Clonage et séquençage

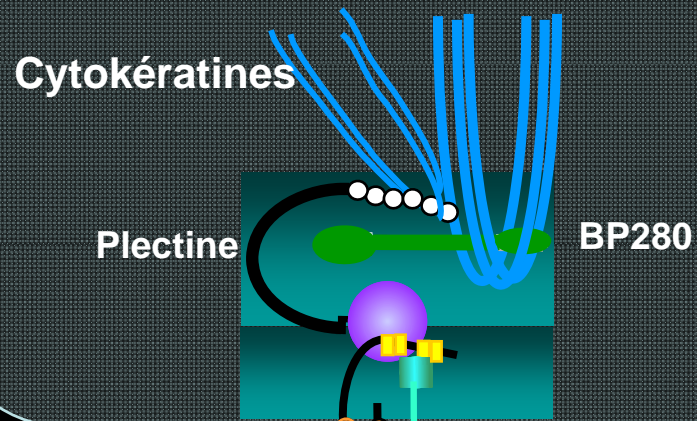
RT-PCR et clonage

Séquençage
de peptides

Oligonucléotides
dégénérés



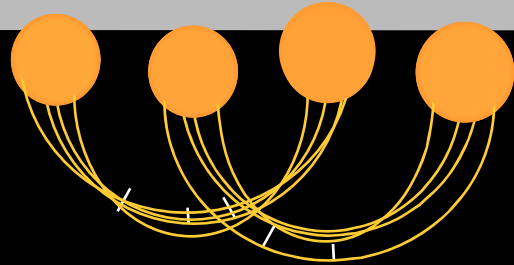
kératinocyte



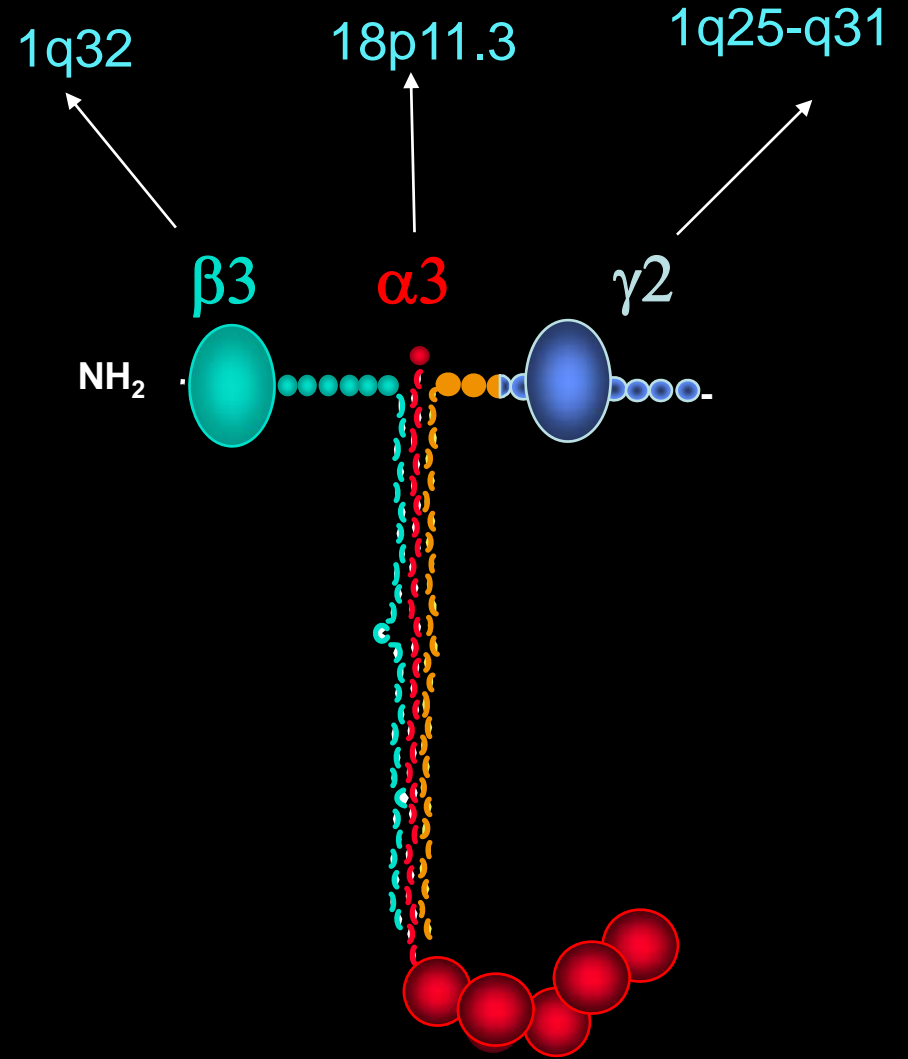
Intégrine $\alpha 6 \beta 4$

Collagène XVII (BP180)

Laminine-5

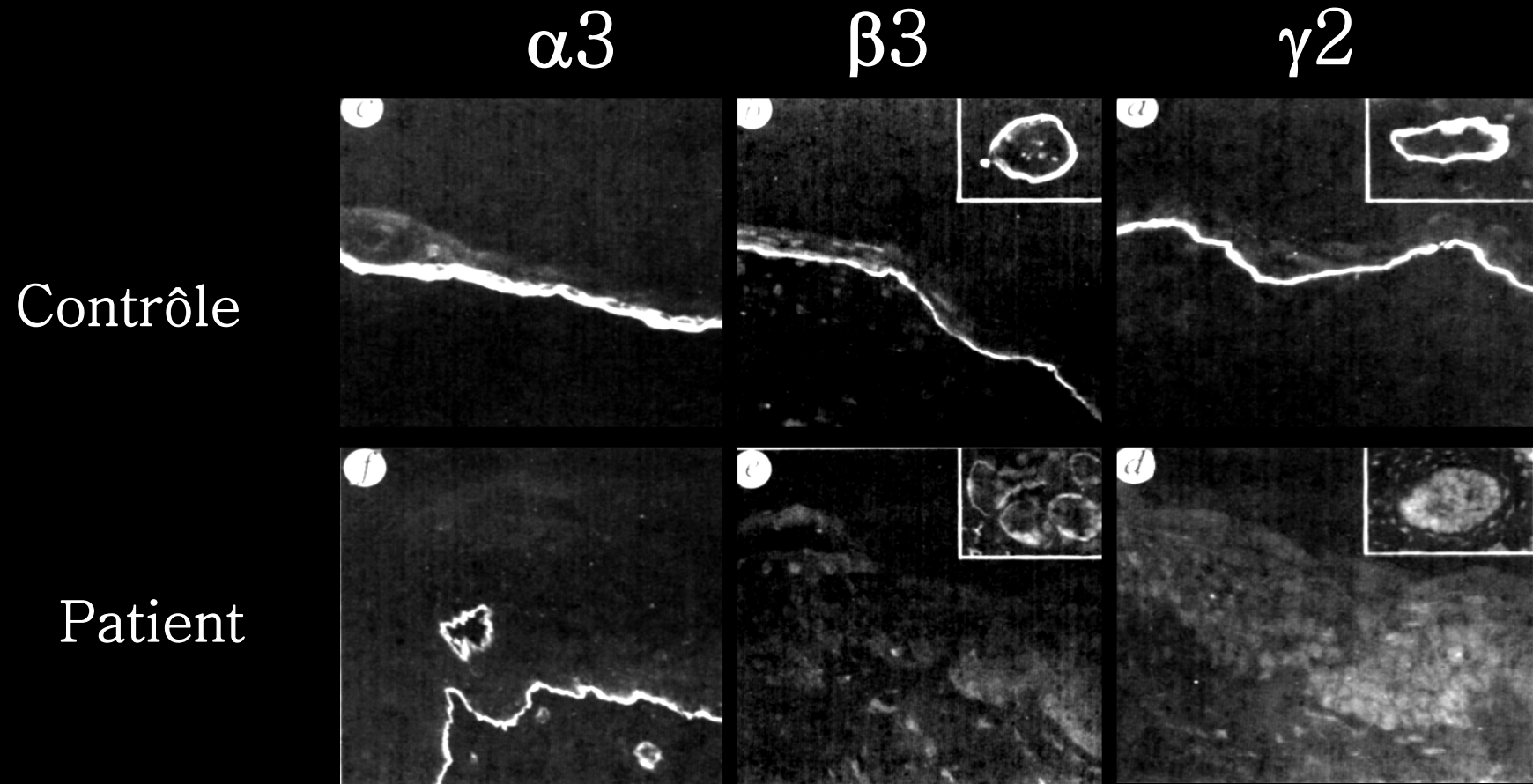


Collagène VII



Laminine-5

Immunofluorescence sur biopsies cutanées



Liaison génétique entre le gène LAMC2 et l'EBJ-H

Difficultés: trois gènes.

caractère récessif et léthal 3 familles consanguines

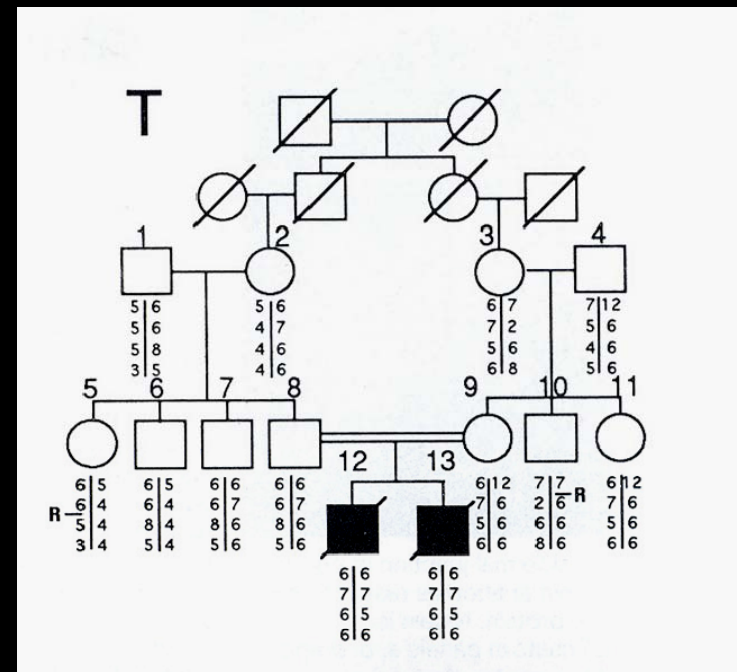
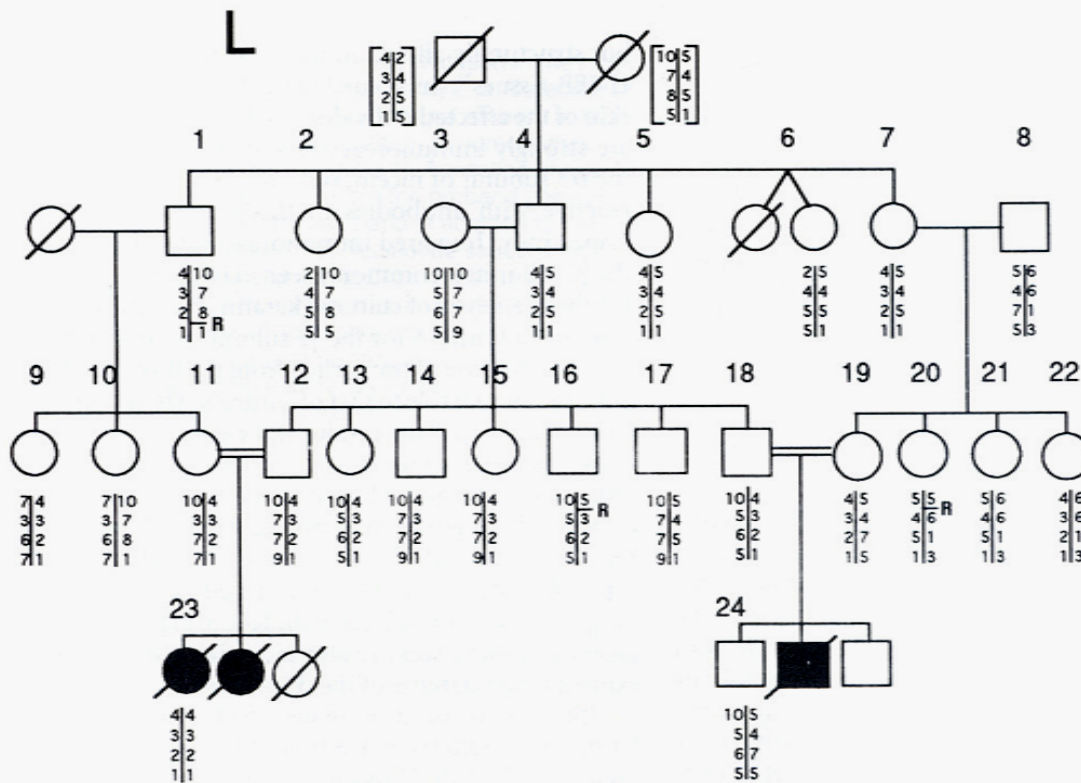
Recherche de microsatellites CA/GT proches (ou dans le locus LAMC2)

3 marqueurs AFM + un microsatellite lié à LAMC2

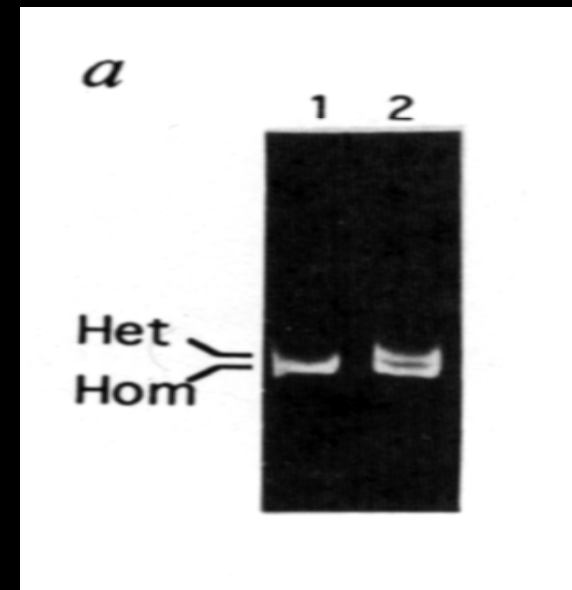
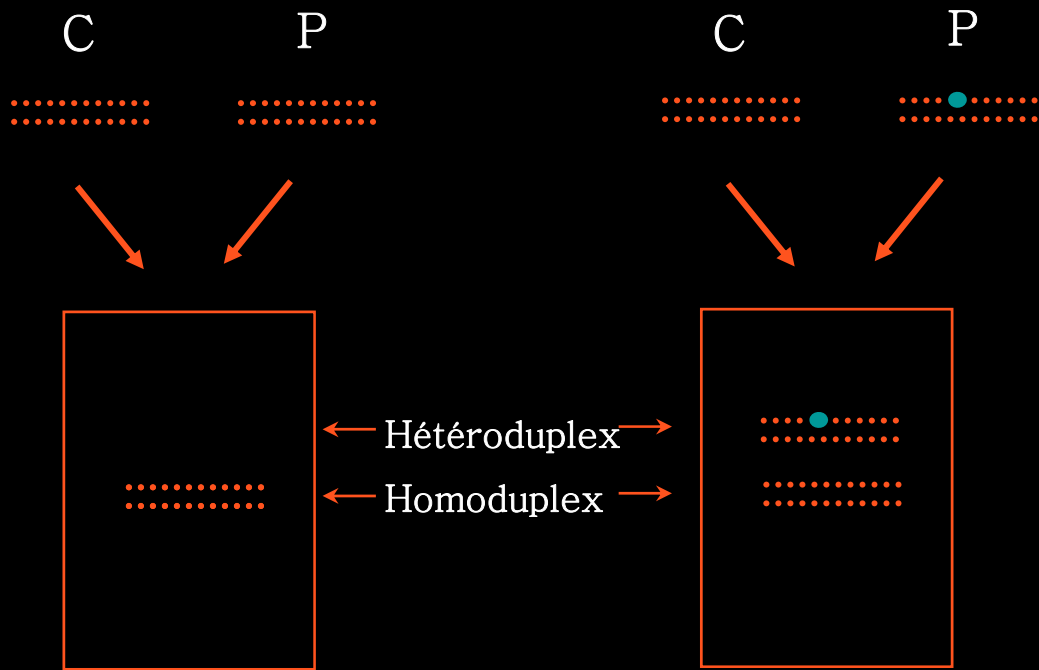
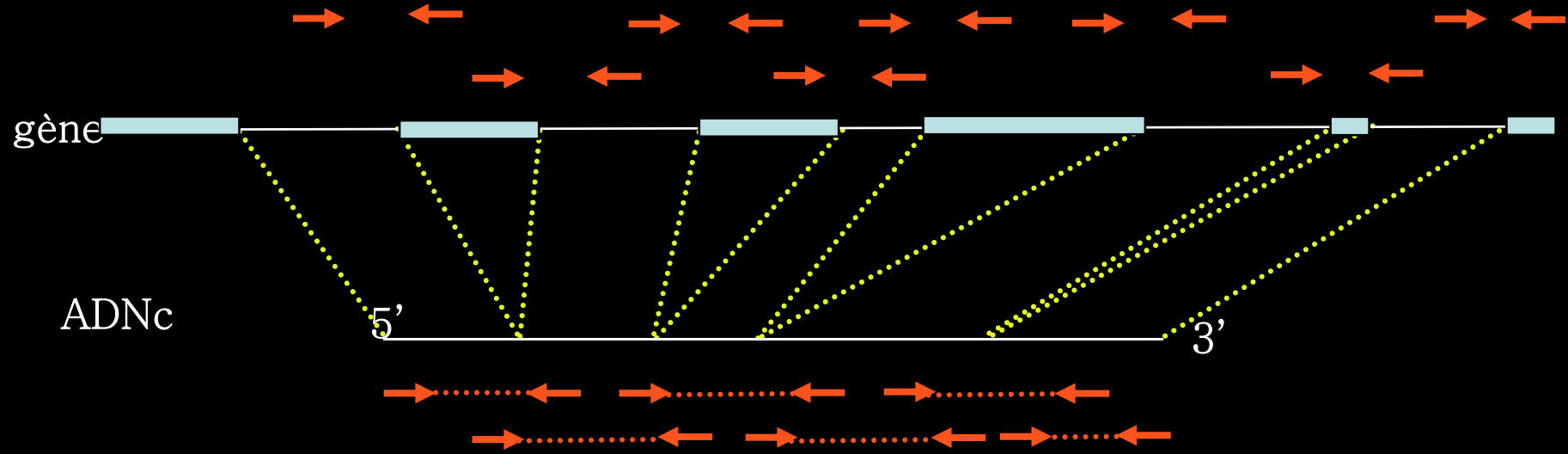
(variabilité de 13 allèles # dans la population caucasienne)

Calcul du lod score

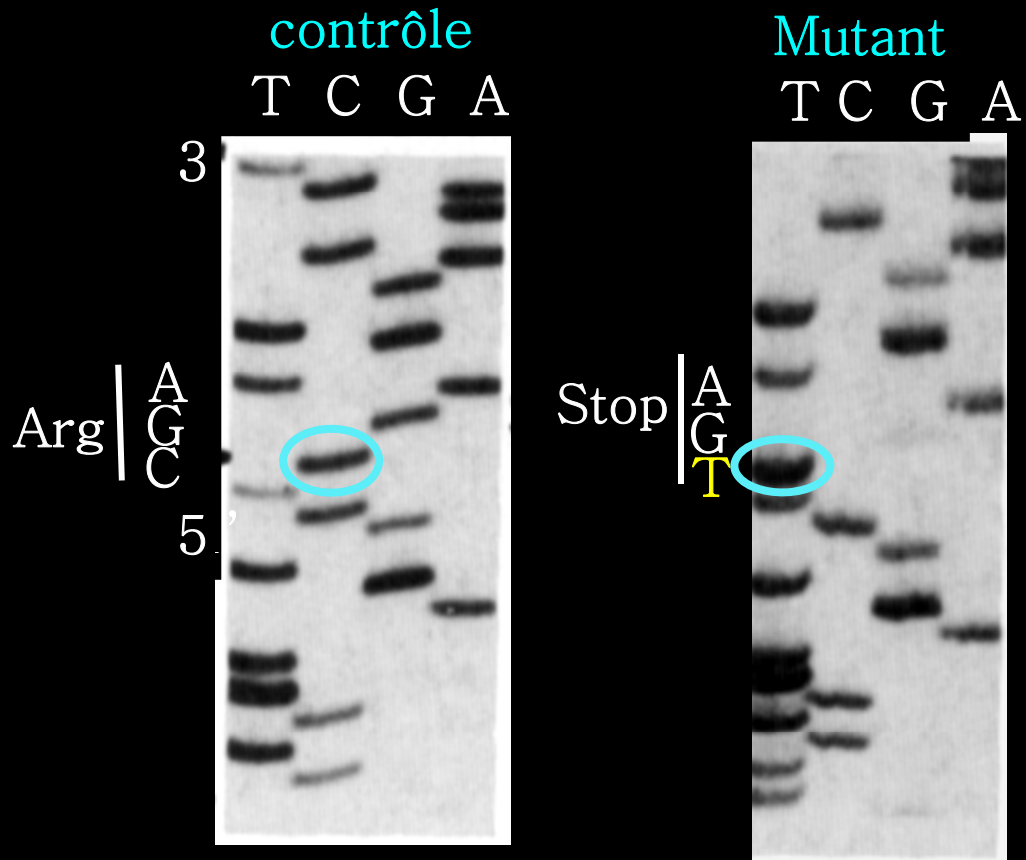
— CACA...CACA —
 → ←



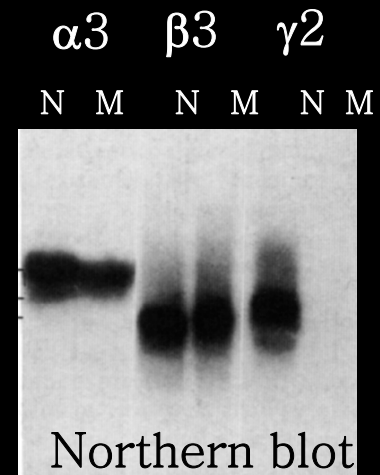
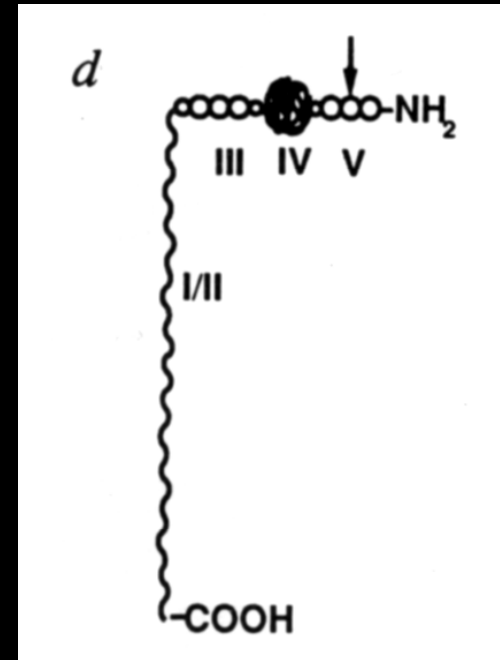
HETERODUPLEX ANALYSIS



Famille consanguine. Patient homozygote



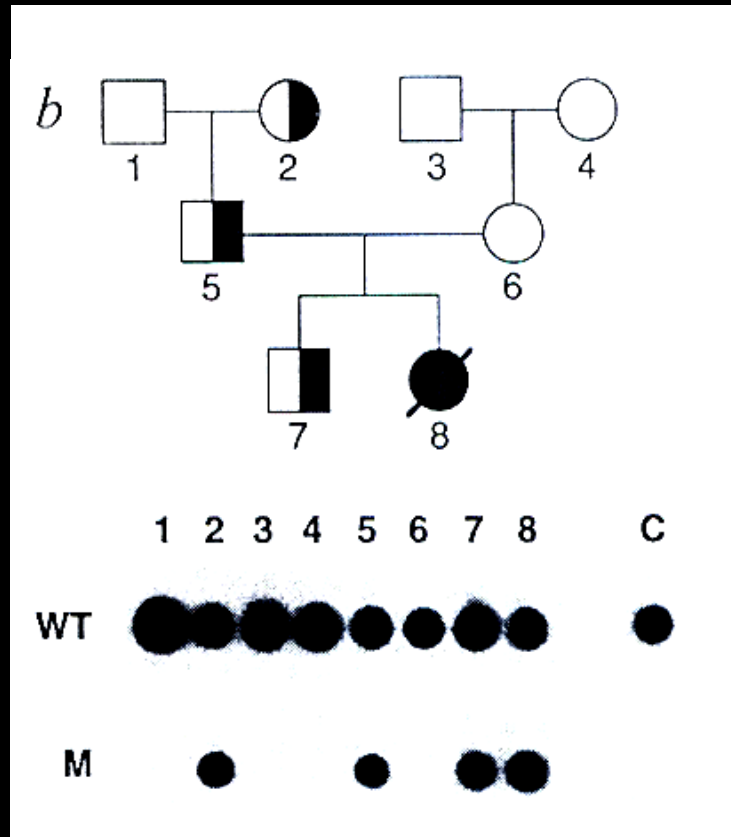
Exon 3



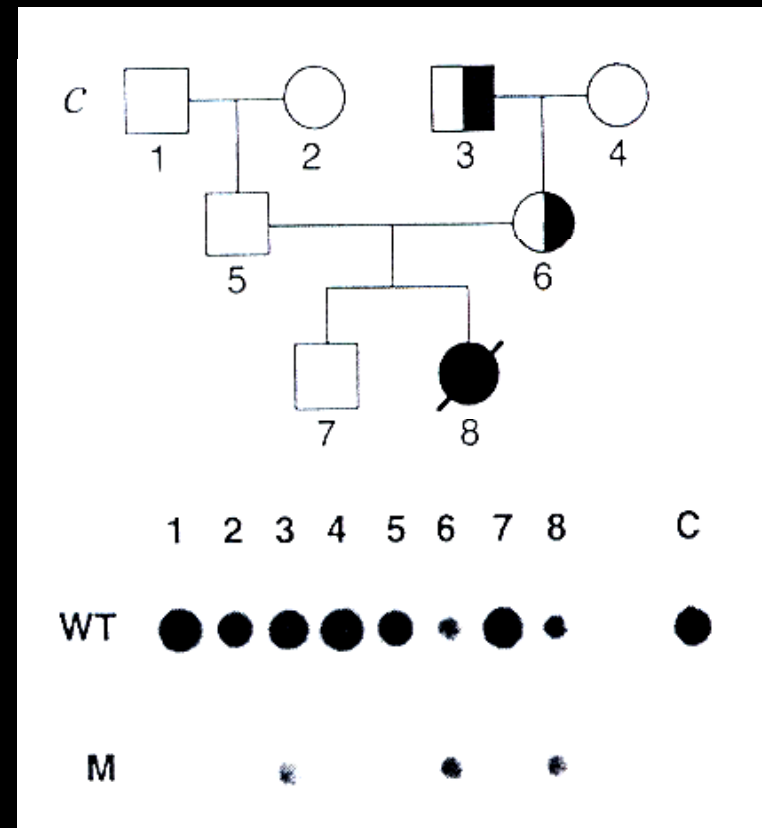
Allele-Specific Oligonucleotide (ASO)

Exemple d'une famille non consanguine

Mutation portée par la mère



Mutation portée par le père



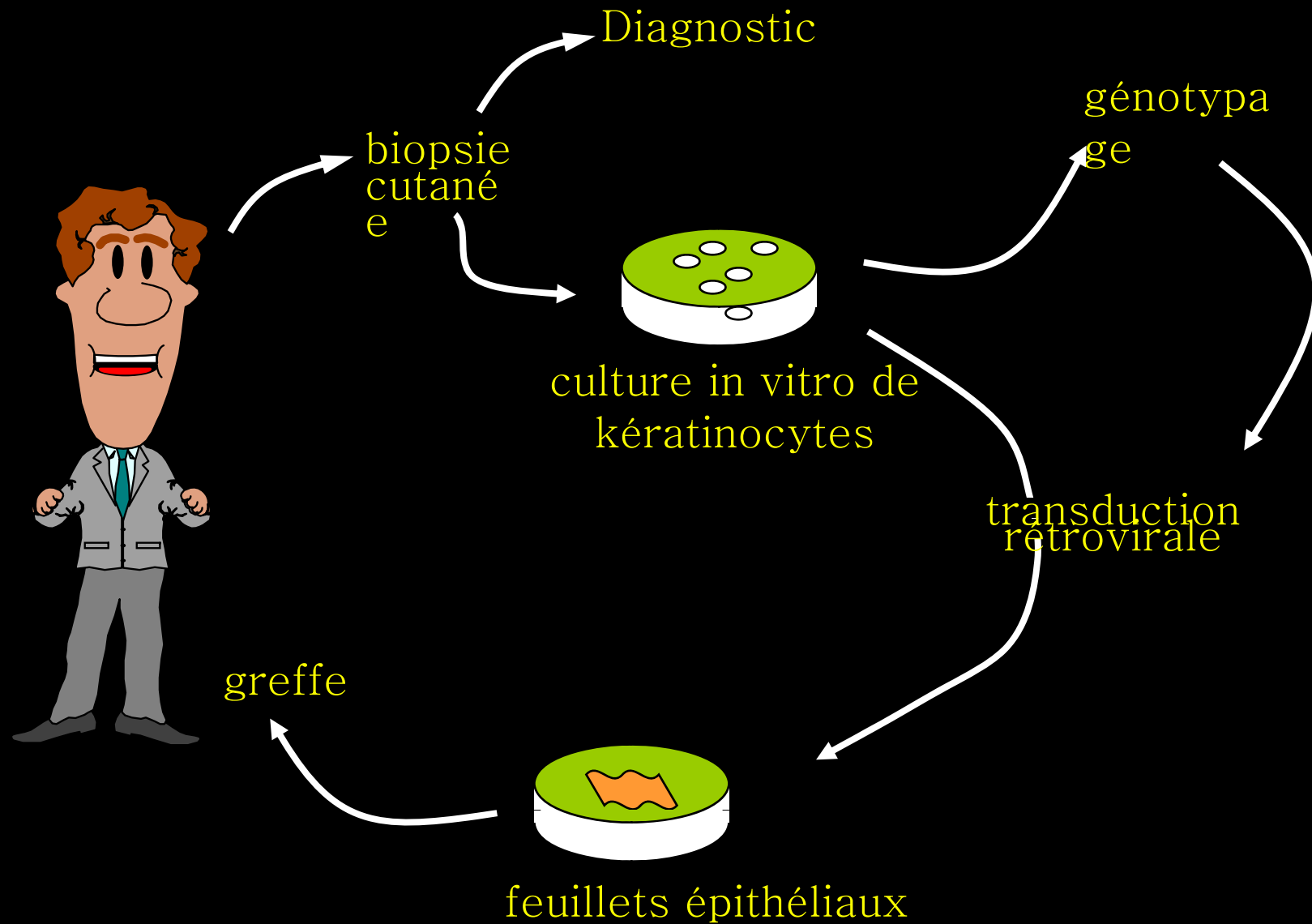
Formes non léthales d'EBJ



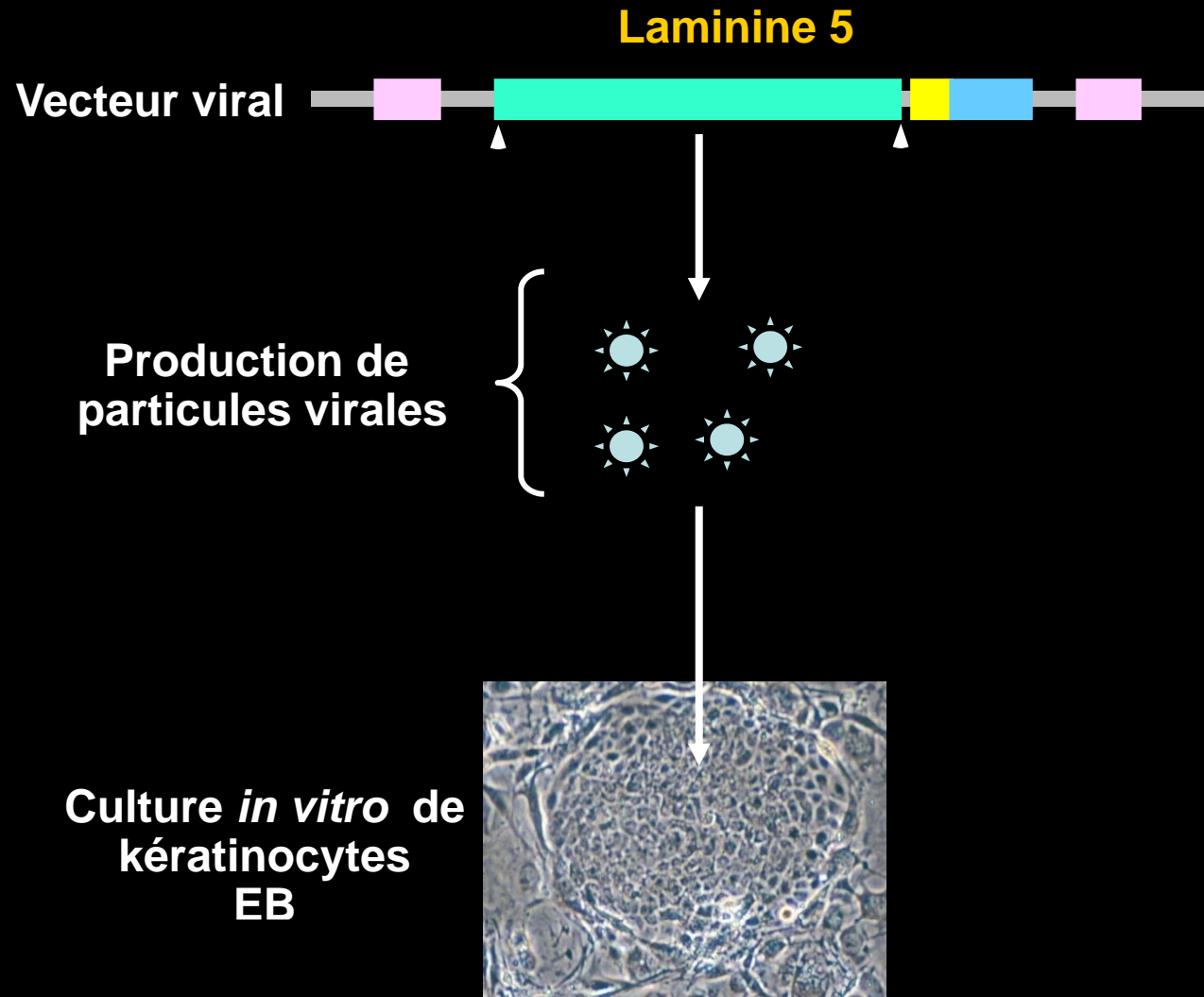
- Expression réduite de laminine-5 mutée
- Etat traumatique, sans soins efficaces

THERAPIE GENIQUE CUTANEE

Ex vivo

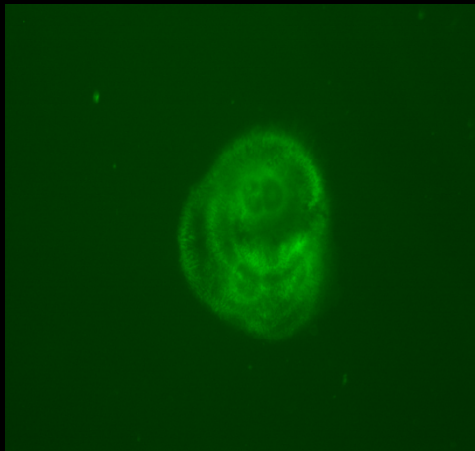


PRODUCTION D 'UN VIRUS « CURATIF »

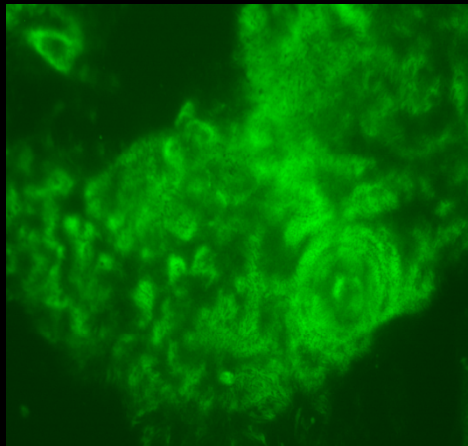


R2version phénotypique des kératinocytes EBJ

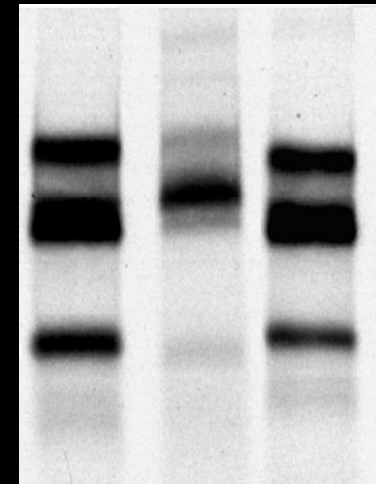
EBJ

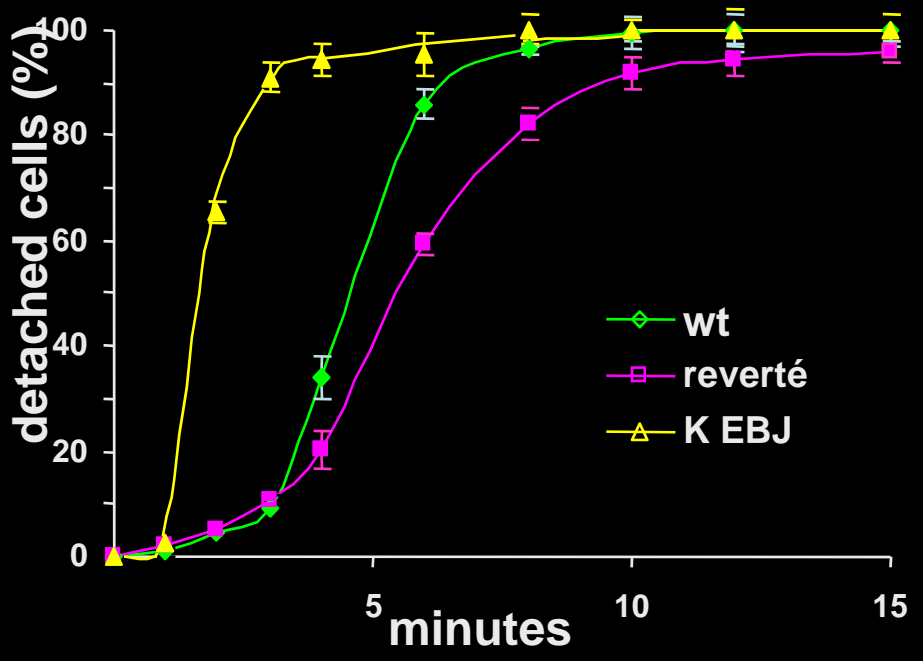
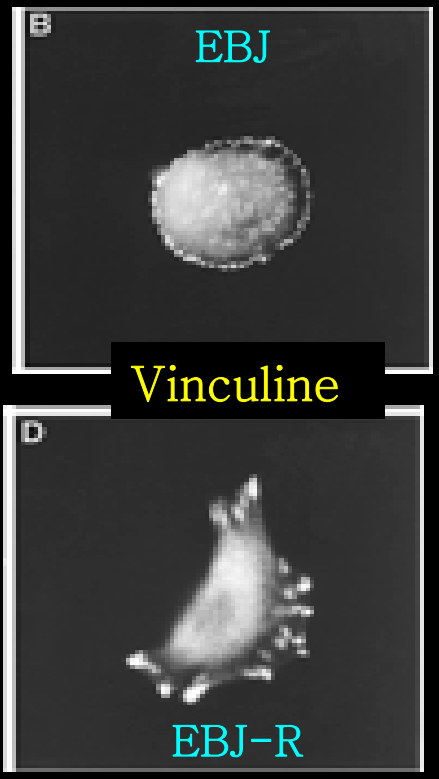
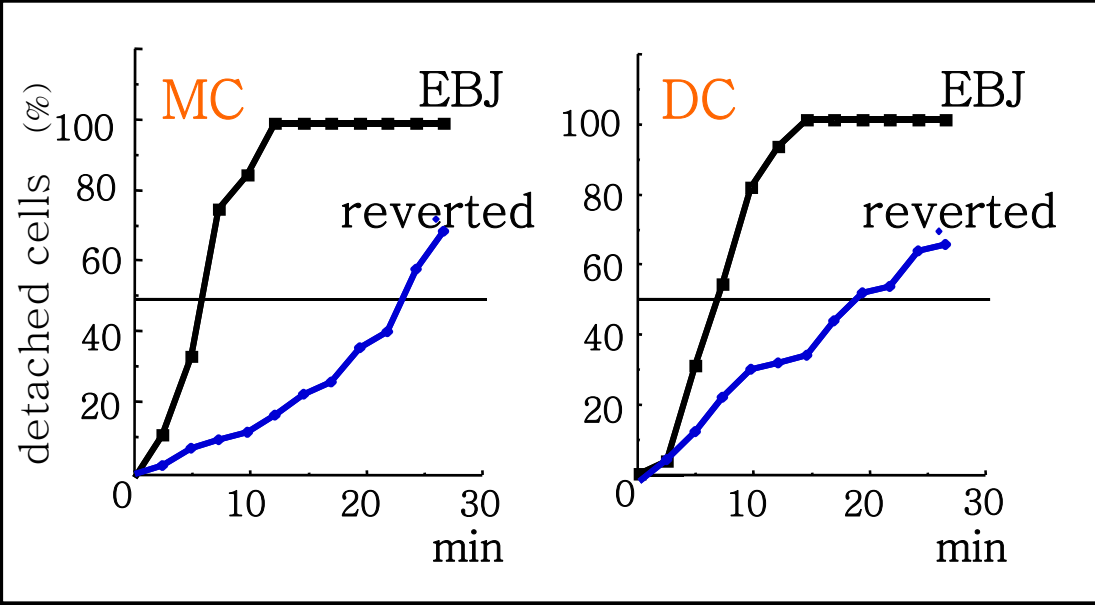


EBJ-R

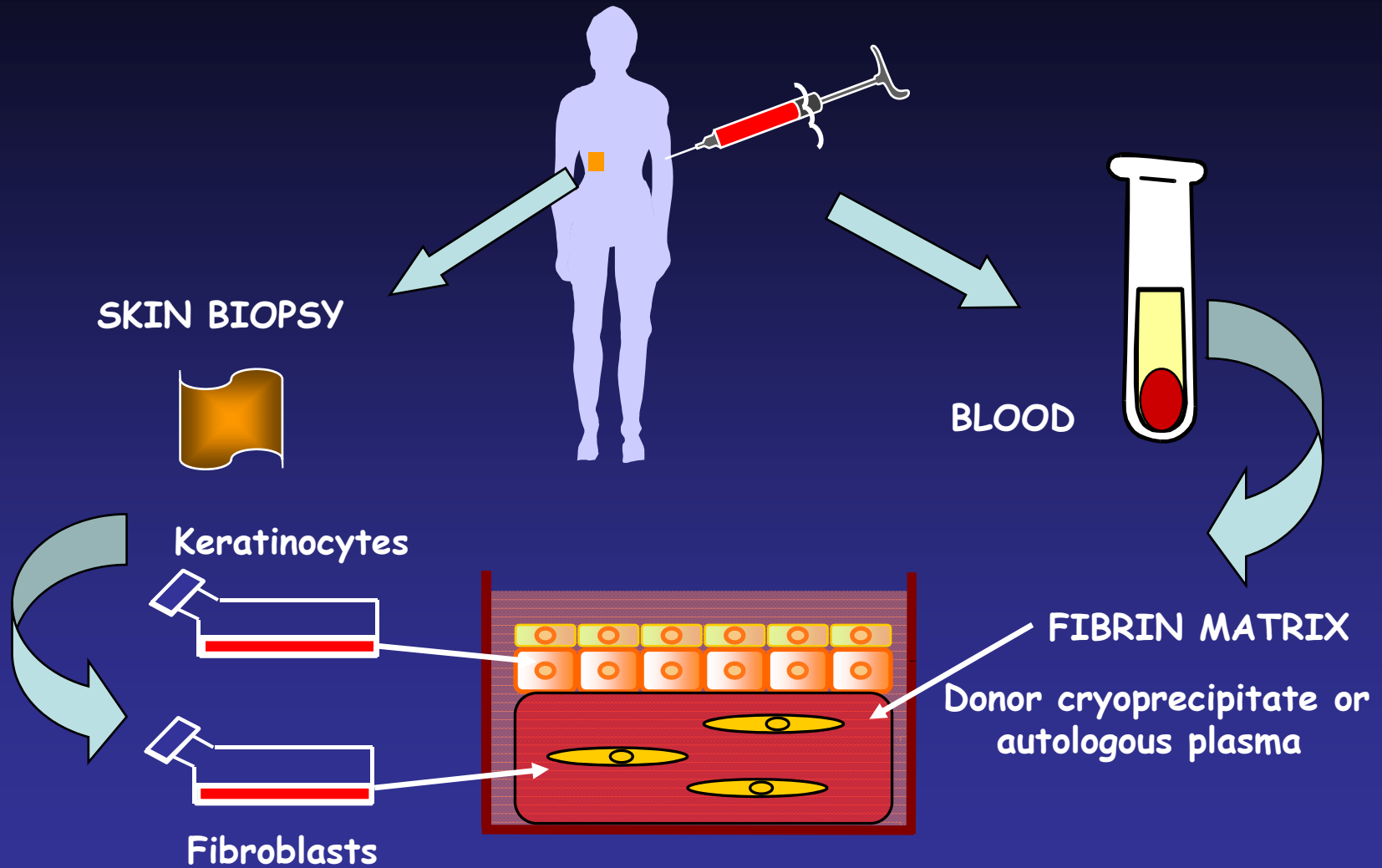


WT EBJ EBJ-R





SKIN EQUIVALENT



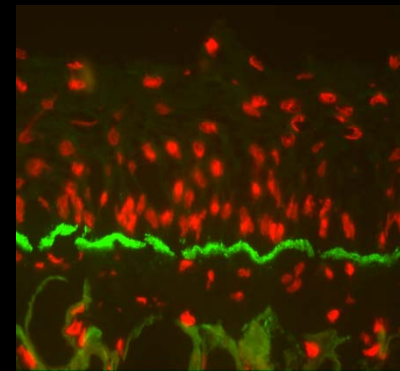
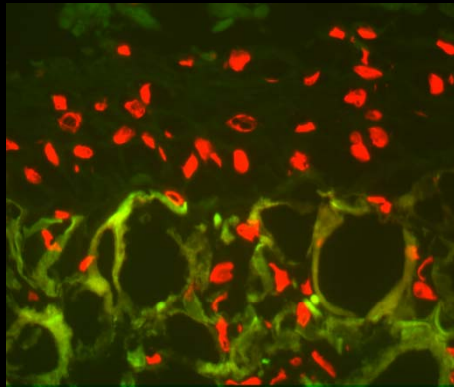
Génération de peau artificielle in vitro

Cellules EBJ

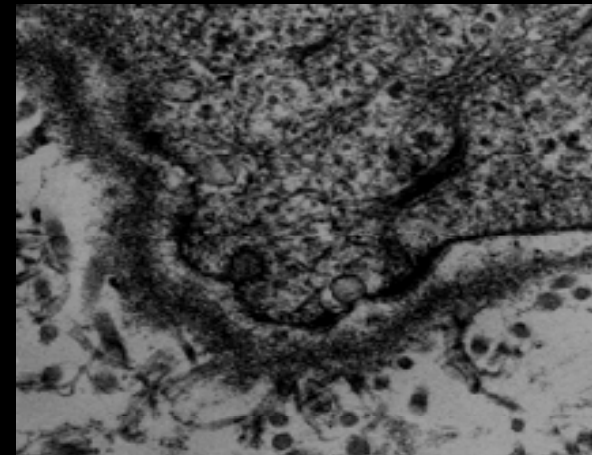
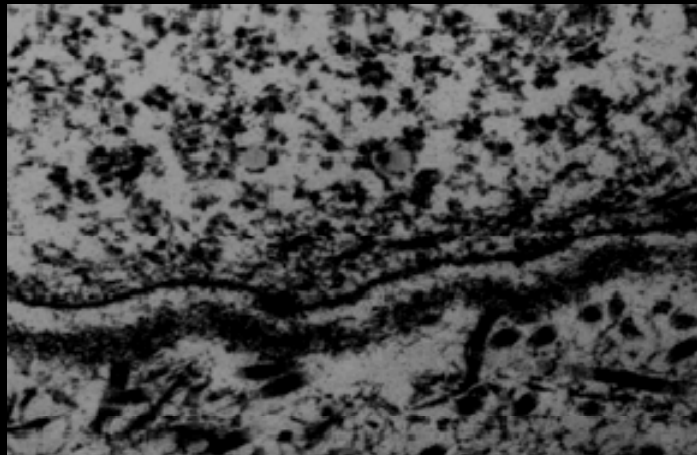
Cellules EBJ-R

Epiderme

Derme
équivalent

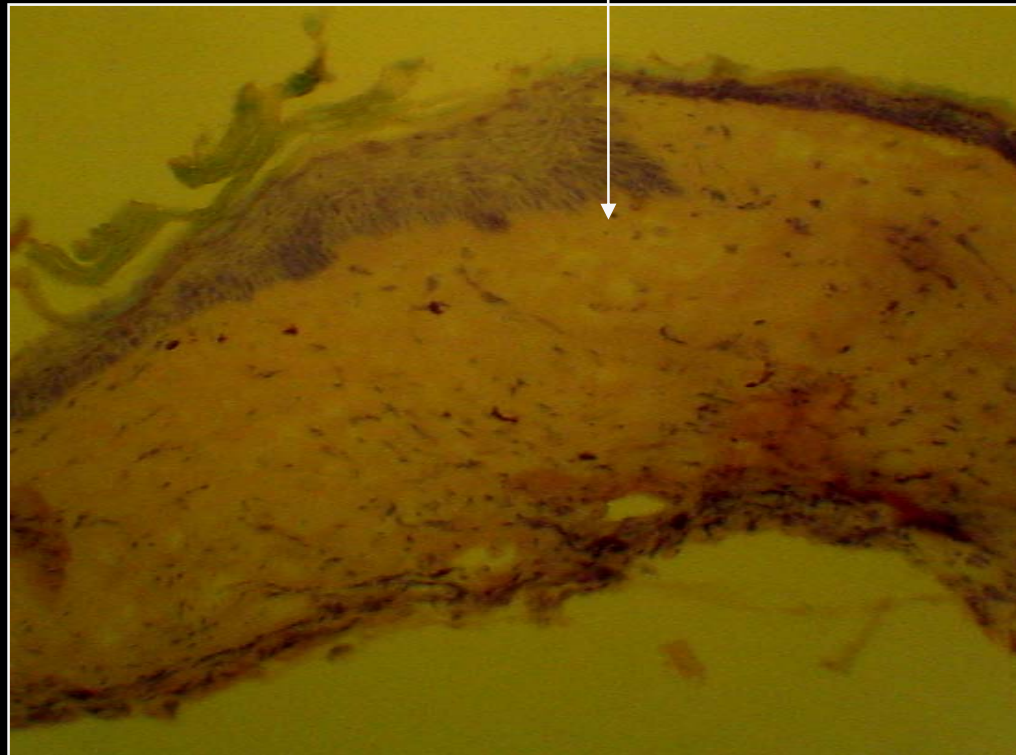


← Laminine 5

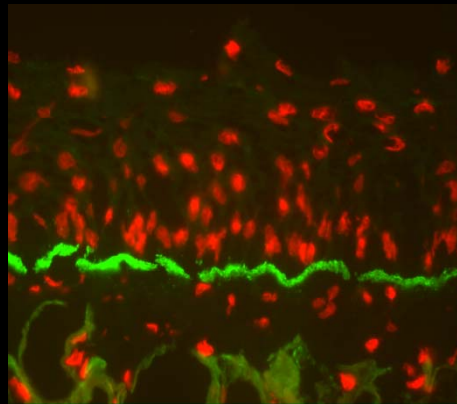
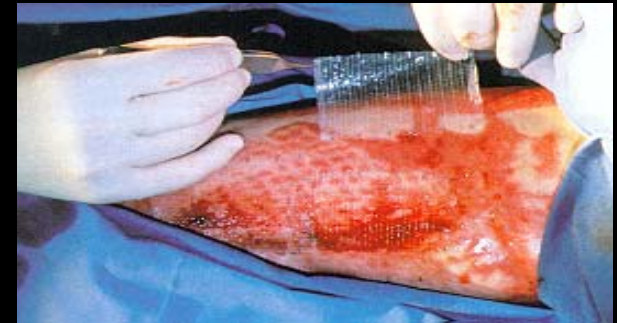
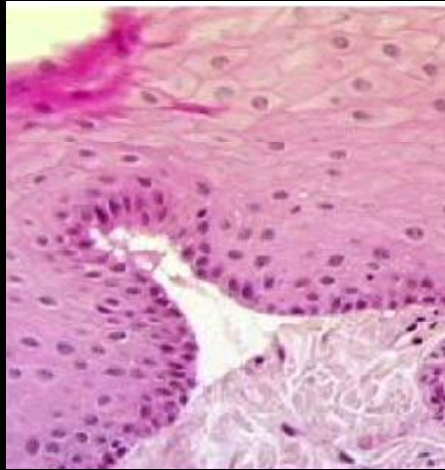


greffon

souris



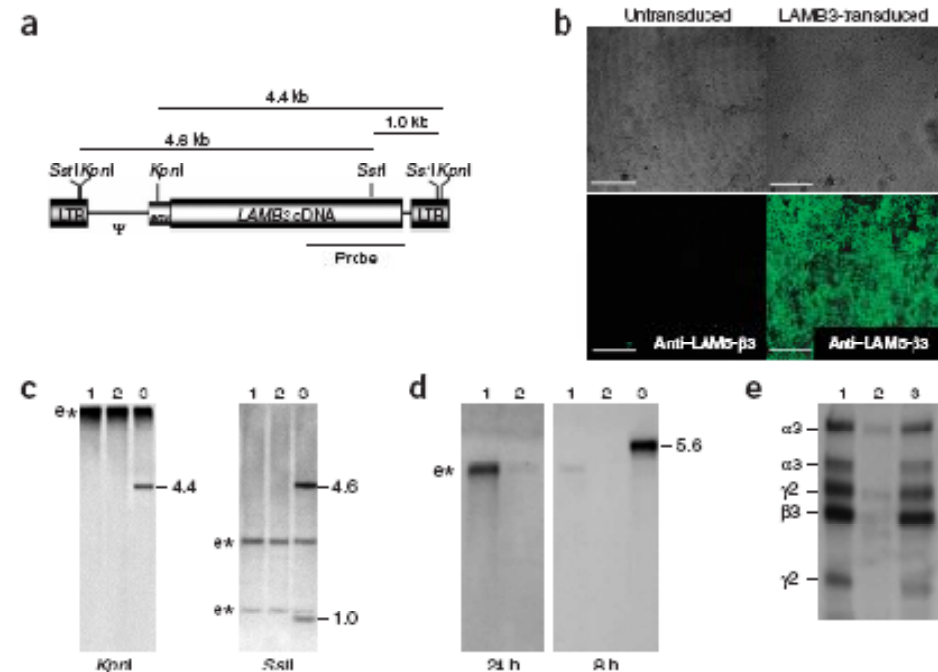
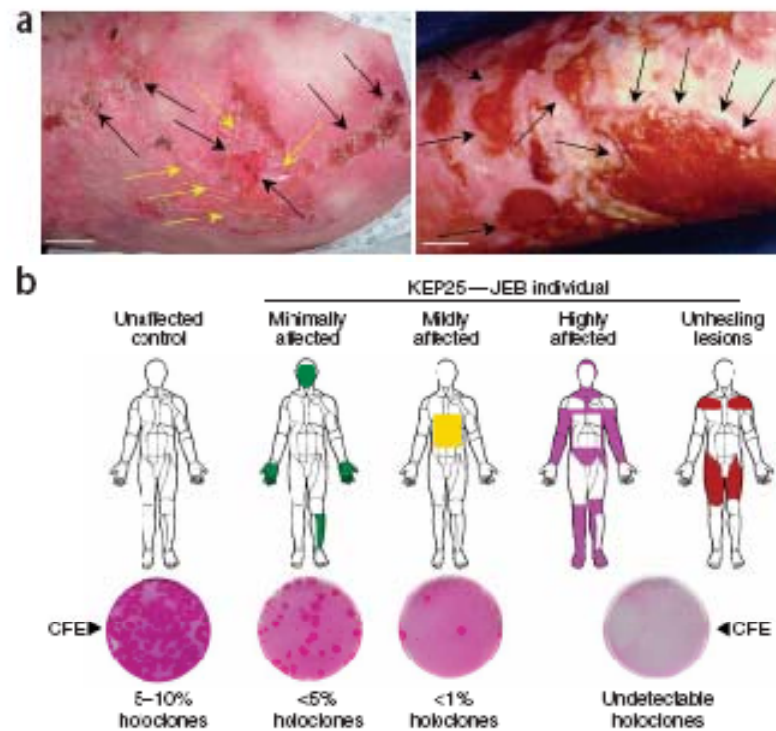
Modèle canin d'EBJ

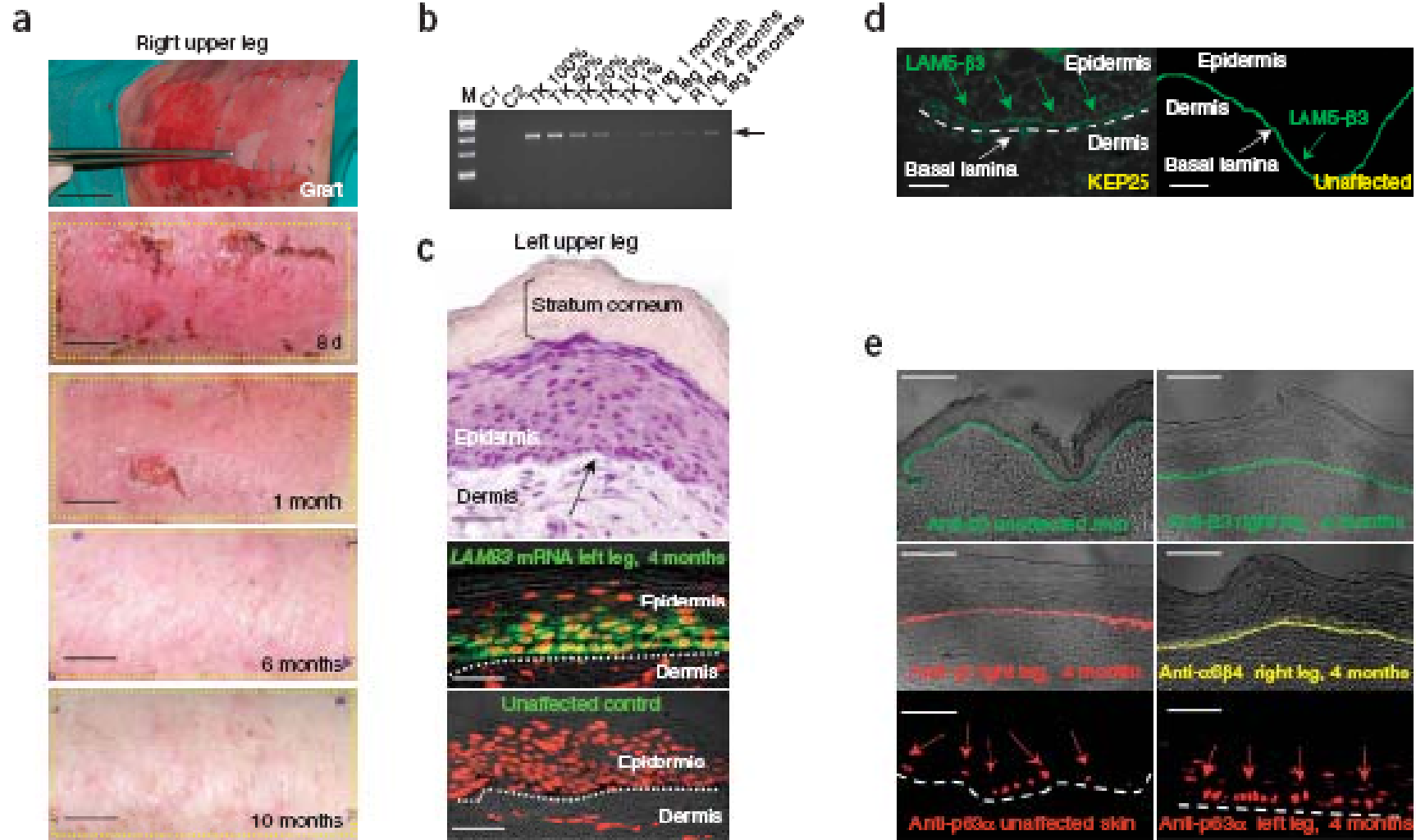


Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells

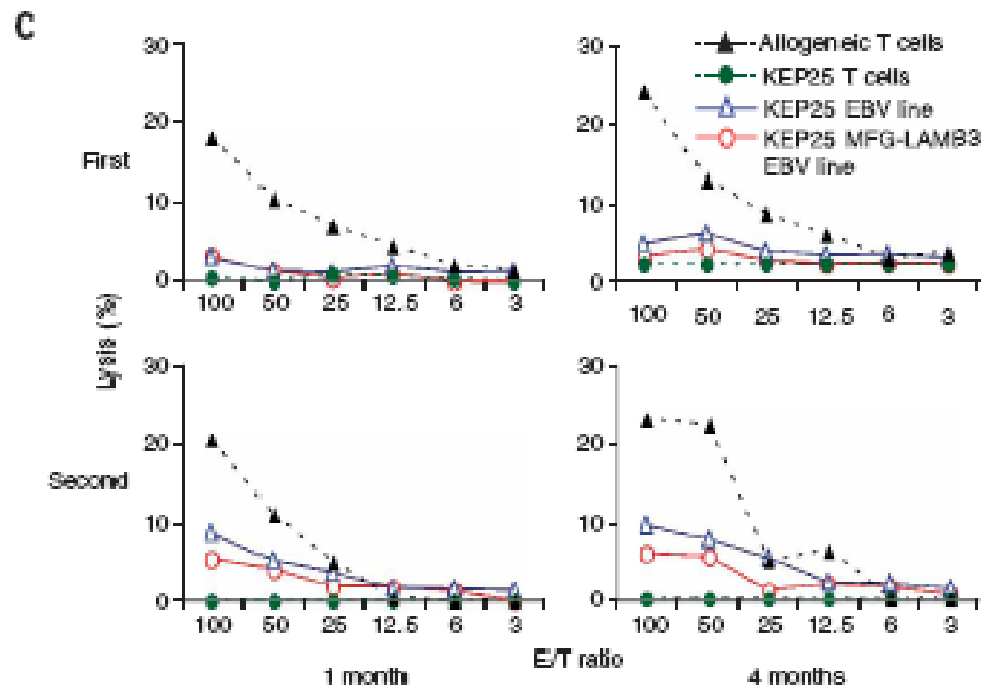
Fulvio Mavilio¹, Gaucella Bellegriani^{1,2}, Stefano Ferrari², Francesca Di Nuzzio¹, Ettore Di Iorio², Alessandra Rocchia¹, Giuletta Mazzugi¹, Giuliana Petrucci¹, Elena Provasi², Chiara Bonini¹, Sergio Caporaso³, Andrea Conti⁴, Cristina Magnoni⁴, Alberto Giannetti⁴ & Michele De Luca^{1,2}

continuation of article





Follow up sur plus d'un an.
 Supporte stress mécanique
 PCR-Q sur ADN
 $\gamma 2$ à la basale; $\Delta Np63$ à la basale.
 Prise de greffe: rétro. présent et réversion phénotypique.



Mutation: substitution

Pas de fixation des peptides 9-mer (restorés) aux mol. HLA de classe I

Pas d'infiltrats, ni inflammation

Pas d'anticorps anti-lamb3,...

Construction d'une banque génomique des sites d'intégration rétrovirale puis séquençage:
36 intégrations indépendantes à 1 mois et 4 mois.

Preuve supplémentaire que la greffe est d'origine exogène.

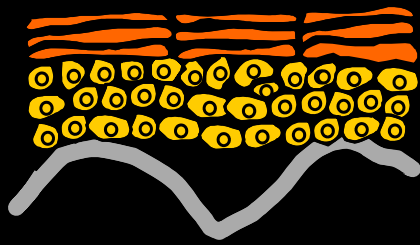
L'AMAUROSE CONGÉNITALE DE LEBER:

rétinite pigmentaire entraînant précocement une quasi-cécité chez l'enfant.

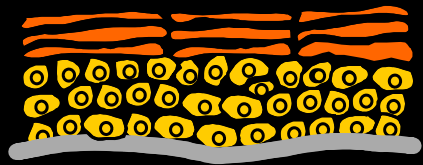
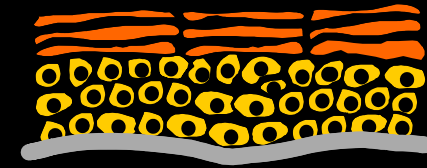
RPE65 code pour une protéine spécifiquement exprimée dans l'épithélium rétinien (enzyme qui recycle une protéine permettant la synthèse du pigment indispensable à la vision : le chromophore 11-cis retinal)



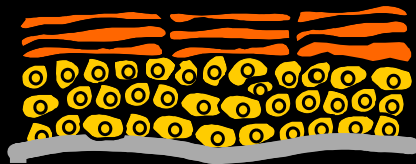
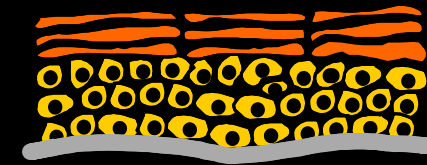
Applications potentielles de la thérapie génique cutanée



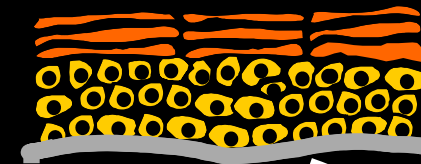
correction de
défauts géniques



catabolisme de toxines
circulantes



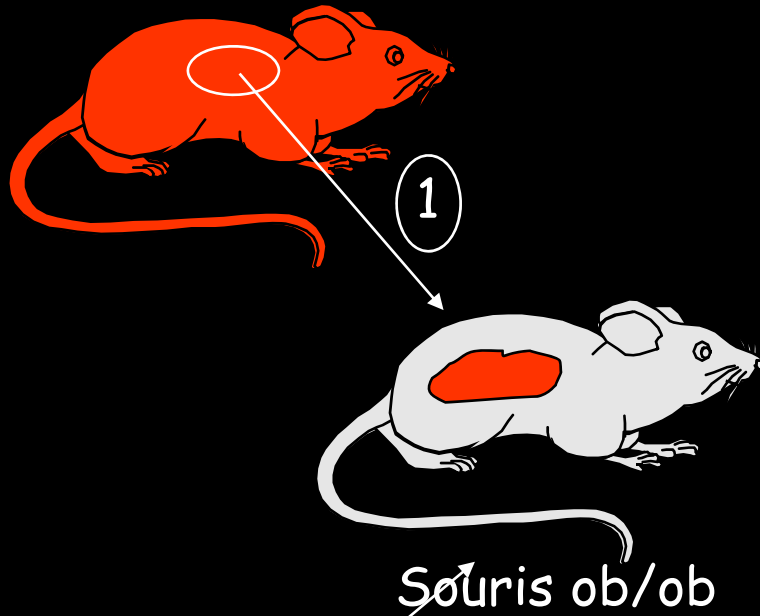
sécrétion de
médicaments diffusibles



Correction du phénotype d'obésité par transplantation d'une peau transgénique

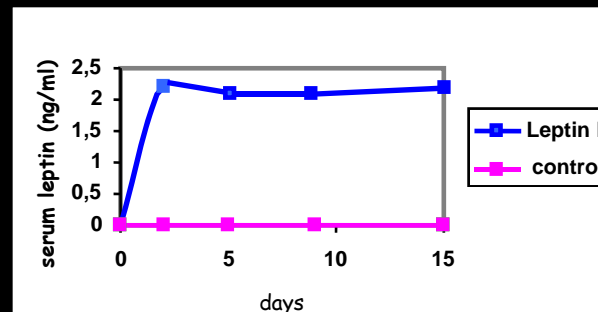
Larcher et al.(2001) . FASEB J 15: 1529-38

Promoteur K5-leptin-LacZ



2

Grefe d'épiderme human exprimant la leptine



Thérapie génique cutanée

1. Justification:

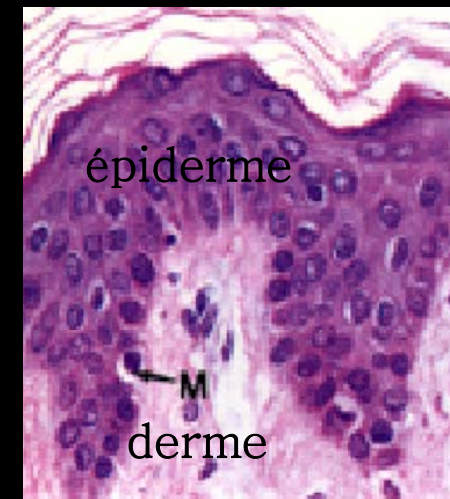
- pathologies cutanées non létales invalidantes: EBJ (lam-5 et collagène Type XVII; EBD (collagène de type VII); Ichthyose liée chr. X (Arylsulfatase C), Ichthyose Lamellaire (Tgase 1),

2. Avantages:

- accessibilité des kératinocytes
- maîtrise des conditions de culture
- transduction des cellules souches
- maîtrise des techniques de greffe

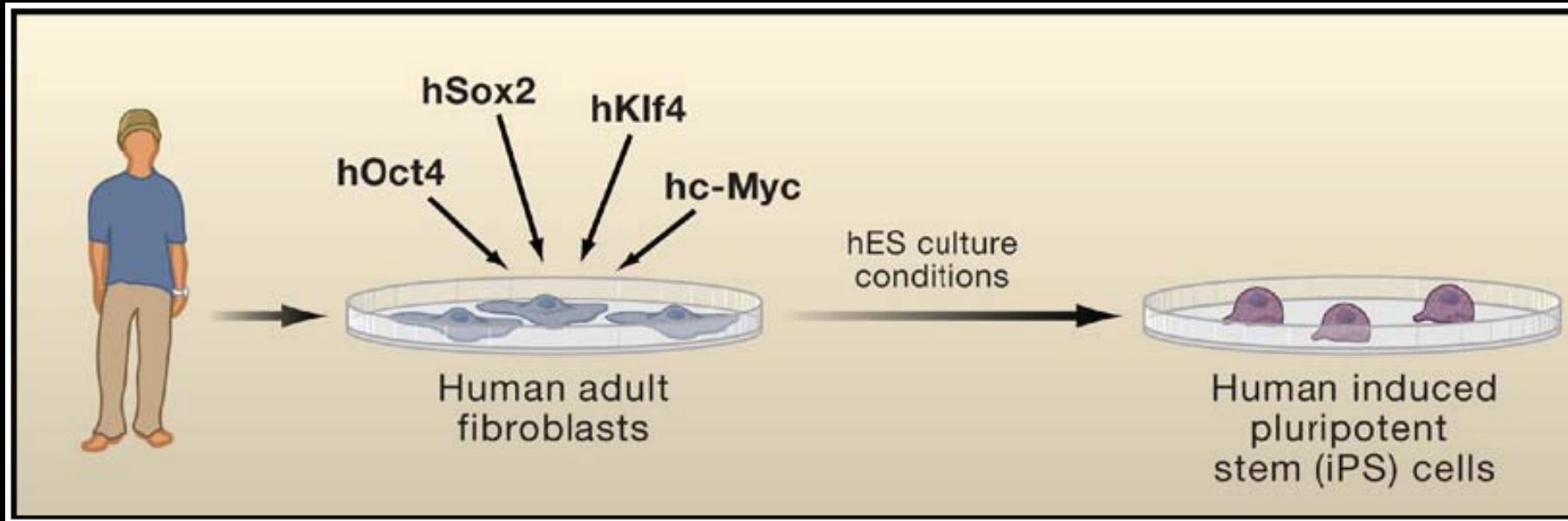
3. A résoudre:

- expression permanente du transgène *in vivo*
- enrichissement en cellules souches
- contrôle de la réponse immunitaire
- justification d'une thérapie (non létale)
- prise à long terme (remplacement par l'hôte, avantage sélectif?)



Gènes de l'auto renouvellement identifiés grâce aux études faites sur les ES humaines: oct-4, c-myc, sox-2, Klf4 (nanog, Lin-28)

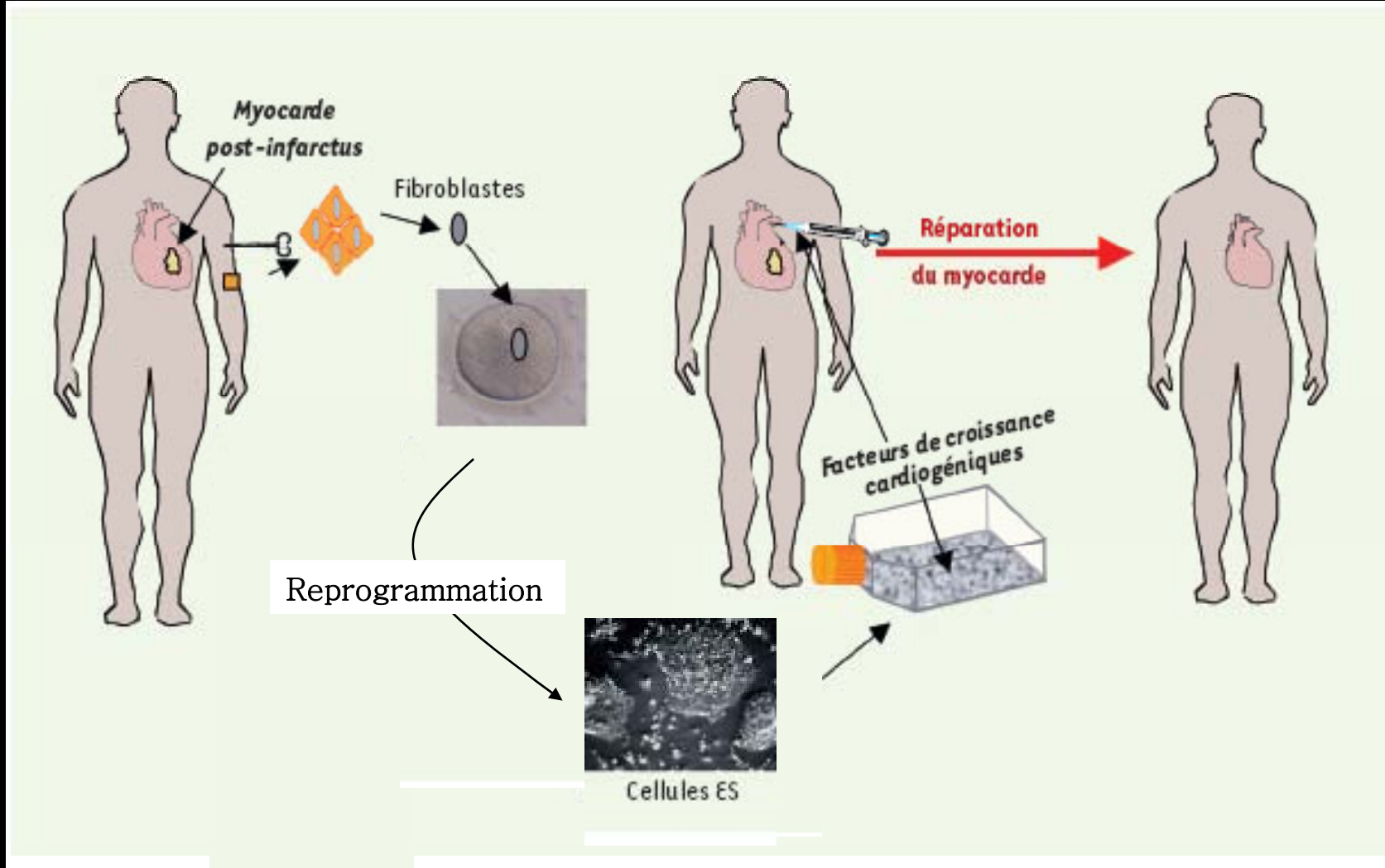
2007-2008: Nouvelle révolution en biologie: les iPS



Avantages:

- pas de problème d'éthique ?
- autogreffe
- thérapie génique (rec. homologue)

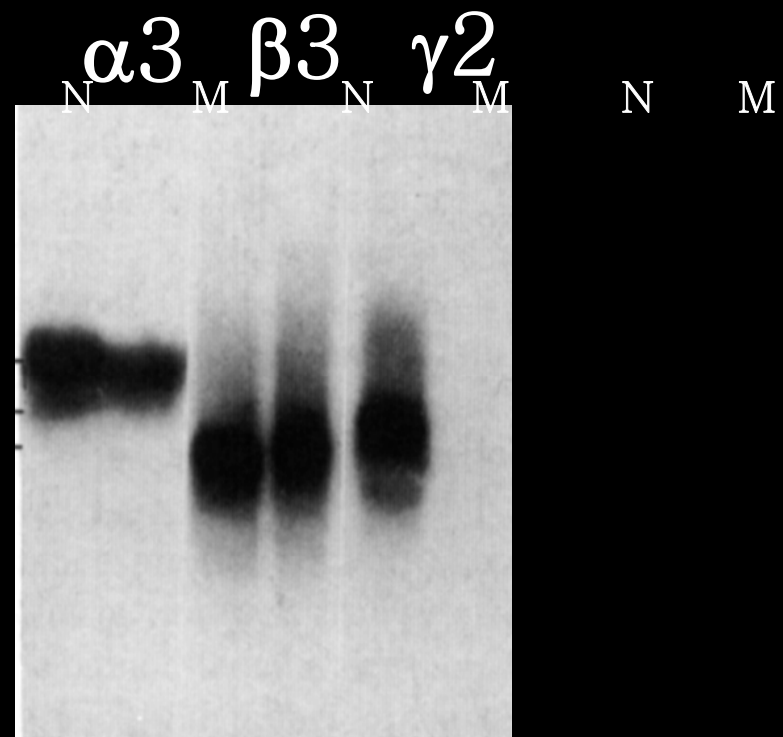
Pluripotence



aberdam@unice.fr



Northern blot



Liaison et lod score

Compare la probabilité d'obtenir des résultats observés entre deux hypothèses:

Hypothèse 1: proba d'obtenir ces résultats si le marqueur et le gène sont liés (co-ségrégation)

Hypothèse 2: proba d'obtenir ces résultats si le marqueur et le gène ne sont pas liés (ségrégation indépendante)

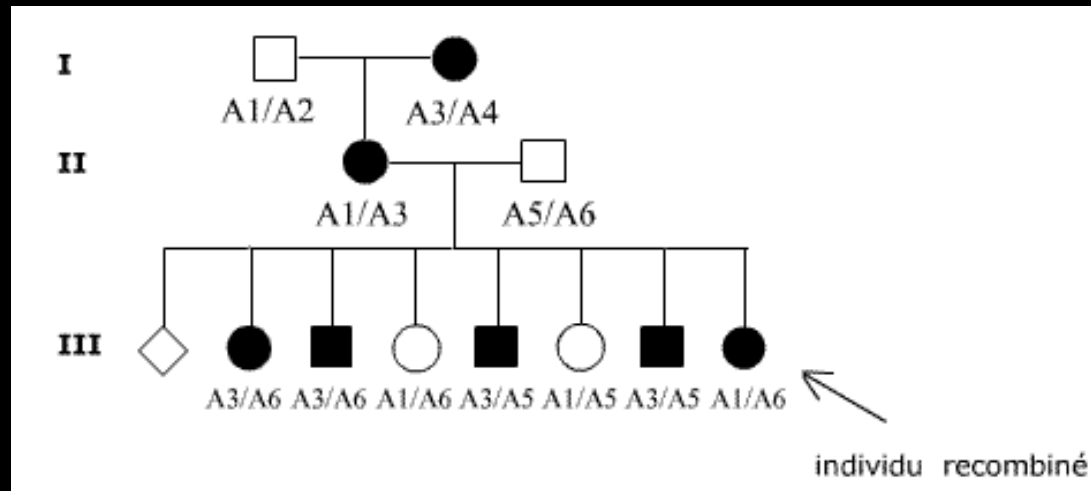
Ces proba sont exprimées sous forme de ratio de proba:
hypothèse1/hypothèse2

Lod Score: \log_{10} du ratio de probabilité

Ex. si ratio de proba est 10:1, le Lod Score est égal à 1

Un Lod score de 3 représente un ratio de 1000:1 en faveur de la liaison, ce qui est significatif (avec erreur de 5%).

Il faut en général combiner plusieurs familles pour obtenir un résultat statistiquement significatif



La probabilité de recombinaison entre un gène et un marqueur est de 5% (θ)
 Donc, les deux resteront liés dans 95% des méioses observées et il y aura
 une recombinaison dans 5% des cas.

Donc: proba de non recombinaison (pour θ de 5%) = 0.95 (donc de co-
 ségrégation)

proba de non recombinaison 0.5 (donc de co-ségrégation par chance
 est de 50%)

$$\text{Ratio} = 0.95/0.5 = 1.9 \quad \text{Lod Score (Log10)} = 0.279$$

proba de recombinaison (pour q de 5%) = 0.05

proba de non recombinaison par chance = 0.5

$$\text{ratio} = 0.05/0.5 = 0.1 \quad \text{Lod Score} = -1$$

L'arbre montre 6 non-recombinants et 1 recombinant ce qui donne: