

# Cellules souches épidermiques et thérapie génique cutanée *ex vivo* : application au *xeroderma pigmentosum*

Emilie Warrick<sup>1,2</sup>, Valérie Bergoglio<sup>1</sup>, Françoise Bernerd<sup>2</sup> et Thierry Magnaldo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Génétique et physiopathologie des cancers épidermiques. Génomes et cancers, CNRS FRE 2939, Institut Gustave Roussy, 39, rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif, France

<sup>2</sup> L'OREAL, Sciences du vivant, Recherche avancée, Centre C. Zviak, 90, Rue du Général Roguet, 92583 Clichy, France

Auteur correspondant : Thierry Magnaldo, [magnaldo@igr.fr](mailto:magnaldo@igr.fr)

Reçu le 30 Novembre 2007

**Résumé** – La plupart des pathologies génétiques récessives à expression cutanée, les génodermatoses, restent, à ce jour, sans traitement. Le transfert, dans les cellules en culture du patient, de l'allèle sain du gène dont l'altération est responsable de la maladie puis la réimplantation chez le patient des cellules génétiquement corrigées pourraient constituer un traitement alternatif.

La pérennité de la correction génétique des greffons chez le patient s'appuie nécessairement sur la correction des cellules souches épidermiques. Ainsi, la première greffe de cellules souches génétiquement corrigées *ex vivo* a été rapportée très récemment chez un patient atteint d'épidermolyse bulleuse jonctionnelle. En complément de ce succès, nous décrivons ici une nouvelle méthode de sélection non invasive et non immunogène des cellules souches épidermiques génétiquement manipulées. Cette stratégie pourrait être applicable à la thérapie génique cutanée *ex vivo* des génodermatoses associées à une prédisposition au cancer, comme notamment le *xeroderma pigmentosum*.

**Mots clés** : peau / cellules souche / thérapie génique / xeroderma pigmentosum

**Abstract** – Epidermal stem cells and *ex vivo* cutaneous gene therapy: application to *xeroderma pigmentosum*.

*Ex vivo* cutaneous gene therapy is an alternative treatment for recessively inherited diseases with cutaneous traits. It relies on the transfer in cultured epidermal keratinocytes of the wild-type allele of the gene whose mutation is responsible for the disease. As for severely burnt patients, epithelial sheets developed from genetically corrected cells may then be grafted back to the patients. Long term correction and graft take depend on the genetic correction of stem cells. Success of such an approach has recently been reported in the case of one patient suffering from a severe case of junctional *epidermolysis bullosae*. Here we report a method for safely selecting keratinocytes populations after genetic manipulation. The method is non invasive and non immunogenic and allows high enrichment of genetically manipulated stem keratinocytes. This could perhaps contribute to *ex vivo* gene therapy approaches of cancer prone genodermatoses such as *xeroderma pigmentosum*.

## Introduction

Les progrès réalisés dans le domaine de la génétique moléculaire ont permis d'identifier de nombreux gènes impliqués dans le large panel des maladies héréditaires

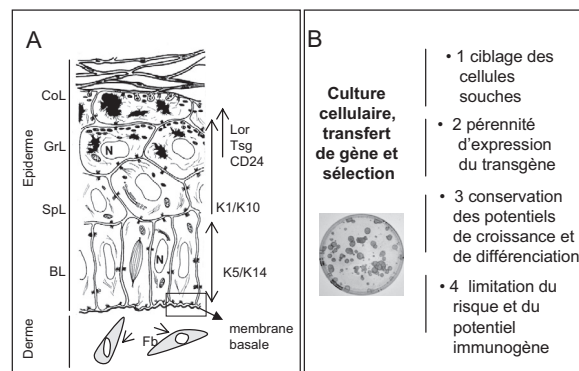
affectant l'épiderme. Celles-ci peuvent résulter de la mutation d'un gène exprimé exclusivement dans la peau, ou dont le rôle y est particulièrement essentiel, comme les gènes codant pour des protéines impliquées dans la structure même de l'épiderme. Ces maladies

peuvent aussi être dues à des mutations dans un gène exprimé de façon ubiquitaire mais dont l'altération peut affecter une fonction particulièrement importante dans la peau ou ses annexes. Ainsi, les mutations touchant les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et la maintenance du génome peuvent, comme dans le cas de patients souffrant de *xeroderma pigmentosum*, être à l'origine d'une prédisposition dramatique des individus aux cancers cutanés induits par les radiations ultraviolettes dans les zones photo-exposées. Certaines des maladies génétiques exprimées au travers d'un phénotype cutané peuvent être particulièrement graves et parfois compromettre le pronostic vital du patient. Pour la plupart d'entre elles, les rares traitements proposés restent insuffisants. La peau est l'organe le plus accessible du corps humain. Elle constitue donc une cible privilégiée pour les approches thérapeutiques par transfert de gène, ce qui constitue aujourd'hui un espoir réaliste de traitement de certains désordres héréditaires cutanés. Les progrès des méthodes de sélection non invasives des kératinocytes humains génétiquement manipulés décrits ici pourraient contribuer aux approches de thérapie génique cutanée *ex vivo* des génodermatoses prédisposées au cancer de la peau comme le *xeroderma pigmentosum*.

## La cellule souche épidermique : clé de voûte de la thérapie génique cutanée

### Structure de la peau et cellules souches épidermiques interfolliculaires

La peau est un organe complexe composé de deux tissus : l'épiderme, en contact avec l'environnement extérieur, et le derme sous-jacent qui joue un rôle support et nourricier. L'épiderme, qui repose sur une membrane basale délimitant physiquement sa jonction avec le derme, est un épithélium stratifié composé principalement de cellules hautement spécialisées appelées kératinocytes. Le processus de différenciation épidermique est illustré schématiquement sur la figure 1. Lorsqu'ils s'engagent dans le processus de différenciation, les kératinocytes de la couche basale cessent de proliférer, et migrent progressivement vers la surface de l'épiderme tout en subissant des modifications morphologiques et biochimiques, ce qui permet de distinguer successivement les couches spinieuse, granuleuse et cornée. Le stade ultime de différenciation est une structure cellulaire morte, le cornéocyte, continuellement éliminé (Green, 1980). Chaque cornéocyte ainsi perdu par desquamation doit être remplacé grâce au recrutement d'un kératinocyte de la couche basale. L'épiderme humain est ainsi renouvelé de façon permanente tout au long de la vie



**Fig. 1.** (A) Représentation schématique de la peau et du processus de différenciation épidermique. Les kératinocytes de la couche basale (BL), parmi lesquels se trouvent les cellules souches, expriment les kératines K5 et K14. Lorsqu'ils s'engagent dans le processus de différenciation, les kératinocytes cessent d'exprimer K5 et K14 pour produire les kératines K1 et K10, spécifiques des couches suprabasales. La loricrine (Lor) et la transglutaminase (Tsg) sont des marqueurs plus tardifs exprimés dans la couche granuleuse (GrL). Noter que le CD24 n'est exprimé qu'à partir de la couche spinieuse (SpL) et qu'il n'est donc pas exprimé par les cellules prolifératives de la couche basale. Fb, fibroblastes dermiques; CoL, couche cornée. (B) Exigences de la thérapie génique cutanée *ex vivo*. La thérapie génique *ex vivo* consiste à propager *in vitro* les kératinocytes issus de biopsies cutanées prélevées chez le patient puis à introduire le gène thérapeutique dans ces cellules en culture avant de les réimplanter chez le patient. Cette stratégie permet l'évaluation *ex vivo* de l'efficacité de la correction génétique et du respect du « cahier des charges » indispensable à toute perspective de greffe chez le patient.

d'un individu. Ce renouvellement est possible grâce à la présence de cellules souches dans la couche basale de l'épiderme. Les cellules souches sont définies comme des cellules capables (1) de s'autorégénérer et (2) de générer une progéniture engagée dans le processus de différenciation. Le passage de la cellule souche vers la cellule différenciée passe par une population intermédiaire, constituant le compartiment des cellules en amplification transitoire. Ces cellules possèdent un potentiel prolifératif limité à cinq divisions et représentent la majorité des cellules prolifératives au sein de la couche basale épidermique (Lajtha, 1979; Gambardella & Barrandon, 2003; Kaur, 2006; Watt *et al.*, 2006).

### L'identification des cellules souches

Les techniques de culture cellulaire des kératinocytes, développées grâce aux travaux fondateurs de Rheinwald et Green (Rheinwald & Green, 1975), ont

fortement contribué à la caractérisation des cellules souches épidermiques. Dans les conditions adéquates, les kératinocytes mis en culture à partir d'un fragment d'épiderme humain sont capables de former trois types de colonies, en fonction du potentiel de croissance de la cellule fondatrice : les holoclones, les méroclones et les paraclones (Barrandon & Green, 1987).

Les holoclones, larges colonies ( $d > 4$  mm) au contour régulier, ont probablement pour origine une cellule souche épidermique. Plus de 95 % des cellules descendant d'un holoclone sont clonogéniques et forment elles aussi des colonies de grande taille. Les paraclones sont des colonies de petite taille ( $d < 1$  mm), différenciées et initiées par une cellule présentant un potentiel de prolifération limité à 15 divisions au maximum. La descendance d'un paracclone présente une clonogénicité inférieure à 5%. Les méroclones sont des colonies de taille intermédiaire ( $1 \text{ mm} < d < 4 \text{ mm}$ ), au contour irrégulier. Elles sont initiées par des cellules fondatrices à la descendance hétérogène, présentant une clonogénicité comprise entre 95 % et 5 %. L'analyse clonale permet donc d'estimer assez précisément la proportion de cellules souches épidermiques au sein d'une culture de kératinocytes.

La présence de ces cellules souches en culture a été attestée par le succès de l'autogreffe chez les grands brûlés de feuillet épithéliaux générés en laboratoire à partir des kératinocytes épidermiques issus d'une biopsie de peau saine prélevée chez le patient (Green *et al.*, 1979; Gallico *et al.*, 1984; Pellegrini *et al.*, 1998; Pellegrini *et al.*, 1999; Ronfard *et al.*, 2000). Le renouvellement à très long terme (plus de 20 ans) d'un épiderme aux caractéristiques normales, malgré l'absence d'annexes cutanées, prouve que les cellules souches ont été préservées en culture et ont conservé tous leurs potentiels après transplantation chez l'homme.

## La thérapie génique *ex vivo* des génodermatoses

### *Exigences de la thérapie génique cutanée*

La correction génétique des affections héréditaires touchant la peau nécessite une expression à très long terme du gène thérapeutique. Dans ce but il faut : (1) cibler les cellules souches épidermiques ; (2) permettre l'intégration du matériel génétique dans le génome de la cellule hôte afin d'assurer la persistance du transgène lors du renouvellement de l'épiderme, tout en évitant l'interruption de gènes vitaux ou l'activation d'oncogènes ; (3) préserver l'intégrité des potentiels de prolifération et de différenciation des cellules génétiquement manipulées ; (4) limiter les réponses

immunitaires de l'organisme hôte envers le matériel inséré dans la cellule (figure 1B). A cet effet, beaucoup d'efforts ont été déployés dans le domaine de la vectorologie afin de trouver des solutions adaptées à ces exigences.

### *Thérapie génique in vivo ou ex vivo?*

Deux stratégies de thérapie génique cutanée peuvent être envisagées : d'une part l'approche *in vivo* et d'autre part l'approche *ex vivo*. La première consiste à introduire directement dans la peau le matériel génétique thérapeutique, nu ou intégré au sein d'une particule virale infectieuse. L'ADN nu peut être administré par injection, électroporation ou « bombardement » de microparticules couvertes d'ADN (« *Gene Gun* »). La transduction virale de l'ADN implique l'utilisation de particules capables d'infecter les cellules en état de quiescence, comme c'est le cas pour la majorité des cellules somatiques en condition d'homéostasie au sein d'un tissu. Grâce à leur importante capacité cargo et à leur fort pouvoir infectieux *in vivo*, les nouvelles générations de lentivirus recombinants pourraient être les meilleures candidates pour ce type d'approche (Ghazizadeh *et al.*, 2004; Gagnoux-Palacios *et al.*, 2005).

La thérapie génique cutanée *ex vivo* consiste quant à elle à : (1) propager *in vitro* les kératinocytes, issus de biopsies cutanées prélevées chez le patient ; (2) introduire le matériel génétique thérapeutique (gène correctif) dans ces cellules en culture ; (3) vérifier *ex vivo* l'activité, la fonctionnalité et l'innocuité à long terme du gène thérapeutique dans les cellules génétiquement corrigées, avant (4) de les réimplanter chez le patient. Ce schéma stratégique ne concerne pas uniquement les pathologies cutanées. Il a démontré son efficacité dans le traitement des « enfants bulles » souffrant d'un grave déficit immunitaire (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000). Dans ce cas, la population corrigée par transduction rétrovirale a pu être préalablement enrichie en cellules souches grâce à l'expression d'un marqueur de surface caractéristique des progéniteurs hématopoïétiques, le CD34. Toutefois, contrairement au cas des cellules hématopoïétiques, aucun marqueur équivalent au CD34 ne permet d'enrichir efficacement une population de kératinocytes en cellules souches. La qualité de la culture, et notamment la proportion d'holoclones, restent les meilleures garanties de réussite des approches de thérapie génique cutanée *ex vivo* (Mavilio *et al.*, 2006). Un autre problème concerne le rendement du transfert du gène thérapeutique : (1) quelle est la proportion de cellules effectivement corrigées dans la culture ? (2) la population cellulaire transplantée doit-elle être pure ? Les réponses à ces questions dépendent de la pathologie, et en particulier du fait qu'elle soit liée ou non

à une prédisposition des patients au cancer. Ainsi, le traitement des génodermatoses telles que le *xeroderma pigmentosum*, associées à une dramatique prédisposition au cancer, impose la sélection des cellules génétiquement corrigées avant toute perspective de greffes chez le patient.

### **Le problème de la pérennité d'expression du gène thérapeutique**

Les vecteurs rétroviraux dérivés du virus de la leucémie murine (MLV) ont permis les premières approches de thérapie génique cutanée *ex vivo* (Morgan *et al.*, 1987) et restent à ce jour les plus couramment utilisés. Au fil des applications visant à corriger aussi bien des pathologies liées au défaut de sécrétion d'une protéine dans l'organisme, comme l'hémophilie de type B (Gerrard *et al.*, 1993), que des désordres cutanés héréditaires comme l'ichtyose lamellaire (Choate *et al.*, 1996; Choate & Khavari, 1997) ou l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle (Dellambra *et al.*, 1998; Seitz *et al.*, 1999; Dellambra *et al.*, 2001; Robbins *et al.*, 2001) et dystrophique (Chen *et al.*, 2002; Baldeschi *et al.*, 2003; Gache *et al.*, 2004), les vecteurs ont été améliorés afin de diminuer l'inactivation par méthylation des séquences LTR promotrices de la transcription *in vivo* (Gram *et al.*, 1998; Challita & Kohn, 1994; Choate & Khavari, 1997; Fenjves *et al.*, 1996) et d'optimiser la transduction des kératinocytes en culture (Deng *et al.*, 1998; Ghazizadeh *et al.*, 2002).

La pérennité de l'expression du gène thérapeutique dépend aussi de la correction génétique des cellules souches. Mathor et collègues (1996) ont montré que la transduction d'holoclones isolés par clonage en culture permet effectivement de maintenir l'expression du transgène *in vitro* pendant plus de 150 générations (environ 6 mois) et *in vivo* pendant 40 semaines après greffe des cellules transduites chez la souris athymique (Kolodka *et al.*, 1998; Levy *et al.*, 1998). En revanche, jusqu'à notre étude décrite ci-dessous (Bergoglio *et al.*, 2007) aucune investigation n'avait rapporté jusqu'alors la sélection de cellules souches épidermiques génétiquement modifiées.

### **Sélection et greffe des cellules génétiquement corrigées : le problème de l'immunité**

Dans le cas des génodermatoses associées à une prédisposition au cancer de la peau, en particulier le *xeroderma pigmentosum* ou les épidermolyses bulleuses dystrophiques (Gache *et al.*, 2004), la sélection des cellules génétiquement corrigées est une exigence supplémentaire à prendre à compte. Il est en effet

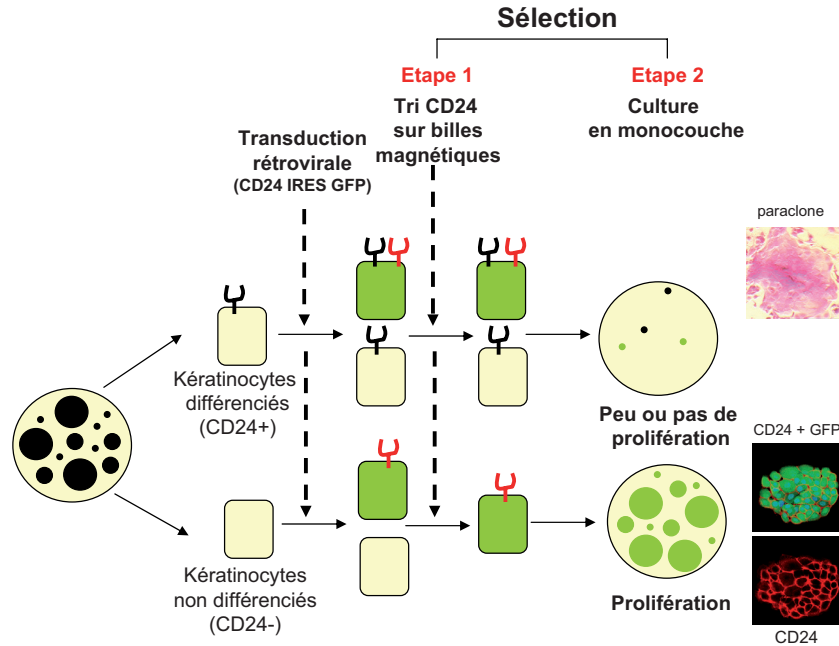
nécessaire, pour ces pathologies, de limiter la possibilité de réimplanter chez le patient des cellules susceptibles d'initier une tumeur dans le greffon. Les techniques classiques de sélection consistent généralement à co-exprimer le gène thérapeutique avec un gène dont le produit confère la résistance à un antibiotique (Deng *et al.*, 1998). Toutefois, la plupart des gènes de sélection proviennent de micro-organismes (par exemple le gène bactérien *neo*/TN5 qui confère la résistance à la néomycine), leurs produits protéiques sont donc potentiellement immunogènes chez l'individu immunocompétent et conduiraient sans doute au rejet du greffon. L'utilisation de tels gènes de sélection est donc tout simplement exclue des perspectives de greffe.

Dans la plupart des pathologies candidates à la thérapie génique cutanée, le produit protéique du gène muté est partiellement tronqué, voire totalement absent, dans les cellules des patients. La réintroduction dans ces cellules d'une protéine fonctionnelle, contenant des domaines potentiellement reconnus comme non-soi, est donc susceptible d'initier une réponse immunitaire ciblée pouvant aussi mener au rejet de la greffe. Ainsi, Ghazizadeh a montré que l'expression d'une protéine produite à la suite d'une infection rétrovirale *in vivo* de l'épiderme interfolliculaire d'une souris immunocompétente conduit à l'élimination des cellules infectées en 3 semaines (Ghazizadeh *et al.*, 1999). La réimplantation de cellules génétiquement manipulées *ex vivo* peut aussi conduire à leur élimination chez la souris immunocompétente (Lu & Ghazizadeh, 2005), une limitation qui pourrait être contournée par neutralisation des cytokines impliquées dans le rejet des greffes (Lu & Ghazizadeh, 2007). Si la question du potentiel de réponse immunitaire est réelle, elle est aussi imprévisible et dépend hautement du contexte de la maladie.

Ainsi, un patient atteint d'épidermolyse bulleuse jonctionnelle a récemment été greffé à long terme, et sans qu'aucune réponse immunitaire ne soit détectée, grâce à la correction *ex vivo* de ses kératinocytes à l'aide de vecteurs rétroviraux classiques permettant de réexprimer la protéine laminine 5 qui fait défaut dans la maladie (Mavilio *et al.*, 2006). Le succès de cet essai suscite un immense espoir pour le traitement des nombreuses génodermatoses candidates à ce type d'approche.

### **Des progrès dans la thérapie génique cutanée sélective *ex vivo***

L'originalité de notre stratégie de sélection est basée sur l'expression ectopique d'une protéine ancrée à la membrane, CD24, à la surface des kératinocytes à fort potentiel prolifératif.



**Fig. 2.** Schéma théorique de la stratégie de sélection CD24. Les kératinocytes cultivés à partir d'une petite biopsie cutanée sont transduits à l'aide d'un rétrovirus (*CD24 IRES GFP*) permettant d'exprimer à la fois l'antigène de surface CD24 et le gène d'intérêt (ici le « gène fluorescent *GFP* »). Après cette étape de transduction, les kératinocytes exprimant le CD24 à leur surface sont sélectionnés grâce à un anticorps anti-CD24 et un système de tri par billes magnétiques. Toutes les cellules exprimant le CD24 de façon naturelle et/ou ectopique sont ainsi isolées et remises en culture. Après quelques passages, seules les cellules de la couche basale efficacement transduites (et exprimant donc à la fois le CD24 ectopique et la *GFP*) persisteront en culture car ce sont les seules à conserver un pouvoir prolifératif.

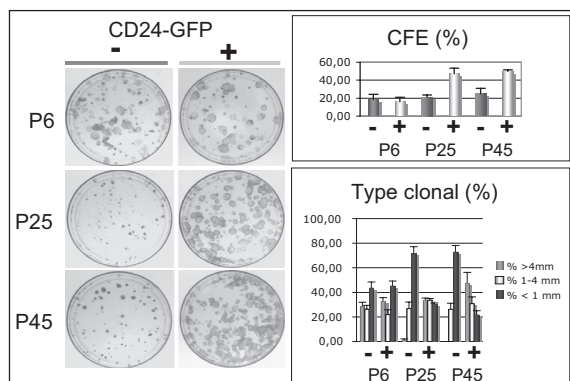
L'expression de CD24 a été mise en évidence à la surface des cellules suprabasales de l'épiderme. Les cellules prolifératives de la couche basale n'expriment pas ce marqueur (Magnaldo & Barrandon, 1996) (figure 1, figure 2). Cette observation souligne deux points essentiels qui sont à la base du développement de notre stratégie : (1) la co-expression ectopique de CD24 et du gène thérapeutique d'intérêt dans les cellules prolifératives (i.e. dans les cellules d'amplification transitoire et dans les cellules souches) devrait permettre de les sélectionner à l'aide d'un anticorps spécifique ; (2) CD24 est une protéine naturellement exprimée dans l'épiderme, ce qui suggère que son expression ectopique dans les cellules basales devrait être tolérée par l'organisme après réimplantation chez le patient immunocompétent.

La stratégie mise en œuvre est illustrée par la figure 2. Une culture de masse de kératinocytes primaires (contenant à la fois des cellules souches et des cellules engagées dans la différenciation) est infectée par des rétrovirus permettant l'expression de CD24 et du gène d'intérêt (gène thérapeutique ou gène traceur, ici la protéine fluorescente *GFP*). La sélection des cellules transduites se déroule en deux étapes. La première étape consiste à isoler toutes les cellules qui expriment le CD24 à leur surface

après la transduction grâce à un anticorps spécifique couplé à des billes magnétiques. Les kératinocytes prolifératifs qui expriment CD24 de façon ectopique et les kératinocytes différenciés qui expriment de façon naturelle (et/ou ectopique) ce marqueur seront ainsi isolés. La population kératinocytaire ainsi sélectionnée est ensuite remise en culture en conditions standards. A ce stade, une étape de « sélection naturelle » va permettre d'éliminer en un ou deux passages les cellules différenciées car elles sont incapables de proliférer (figure 2). Grâce à cette stratégie, il est possible d'obtenir en quelques passages une population homogène de cellules présentant un potentiel prolifératif élevé. Mais quelle est la nature des cellules transduites et ainsi sélectionnées et surtout, cette population contient-elle des cellules souches ?

### **Quel est le potentiel de croissance des cellules sélectionnées ?**

Afin de répondre à cette question, il a été nécessaire de réaliser des passages en série des cellules transduites et sélectionnées (*CD24+/GFP+*) et des cellules non transduites et non sélectionnées (cellules témoins). Plus de 45 passages ont été réalisés et à chacun de ces passages, nous avons déterminé de façon quantitative

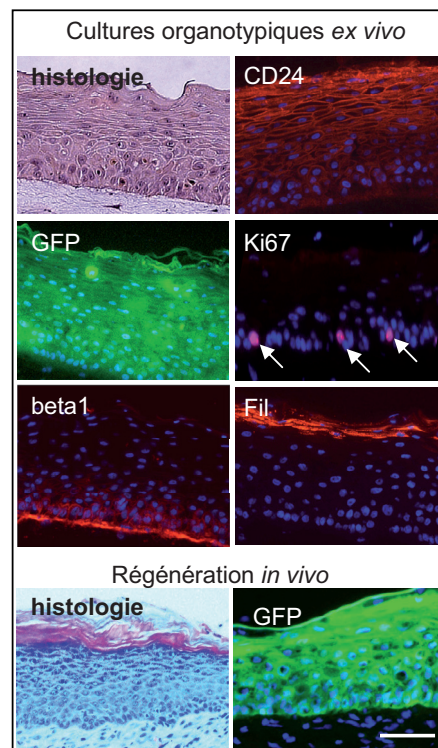


**Fig. 3.** Analyses clonales des kératinocytes transduits et sélectionnés à l'aide du marqueur CD24. Tout au long de leur passage sérié, les kératinocytes primaires humains témoins (non transduits et non sélectionnés, (-)) ou transduits par les vecteurs rétroviraux CD24 IRES GFP et sélectionnés à l'aide du marqueur CD24 (+) ont été soumis à des analyses clonales. Les passages intermédiaires (P6, P25, P45) sont indiqués sur la gauche. La CFE (colony forming efficiency, %) donne la capacité relative des cellules à former des colonies. Le type clonal (%) indique la représentation relative des trois types clonaux dans les cellules contrôle (-) et les cellules transduites et sélectionnées (+).

(colony forming efficiency, CFE) et qualitative (distribution en fonction du type de colonie) l'efficacité de ces cellules à former des colonies (figure 3). Grâce aux critères morphologiques du classement de Barandon et Green (1987), nous avons pu mettre en évidence qu'aux premiers passages après transduction, les cellules CD24+/GFP+ présentent une efficacité de clonage et une distribution des types de colonies identiques à celles des cellules témoins. Entre le passage 6 et le passage 15, la CFE augmente de 20 % à 50%, et reste stabilisée jusqu'au passage 45. L'analyse qualitative montre une augmentation progressive du nombre de colonies de plus de 4 mm (comprenant les holoclones) au cours des passages, associée à une diminution du nombre de paraclones dans la population CD24+/GFP+. Au contraire, dans la population témoin, on observe une diminution du pourcentage d'holoclones au profit des paraclones. La capacité des cellules CD24+/GFP+ à : (1) proliférer pendant plus de 300 générations; (2) atteindre une CFE d'environ 50% et, (3) former une majorité d'holoclones suggère que la stratégie de sélection CD24 permet d'enrichir la population transduite en cellules souches (figure 3).

#### Les cellules sélectionnées expriment-elles le transgène à long terme *ex vivo* ?

Cette question est évidemment primordiale dans toute approche de thérapie génique. Les protéines extraites



**Fig. 4.** Reconstruction d'un épiderme *in vitro* puis *in vivo* chez la souris SCID. Des cultures organotypiques de peau ont été générées *ex vivo* à partir des kératinocytes génétiquement modifiés exprimant le CD24. L'expression du marqueur de surface CD24, révélée par immunofluorescence indirecte, est homogène dans tout l'épiderme. C'est donc bien la version exogène du CD24 qui est exprimée dans les cellules basales et directement suprabasales. La fluorescence de la GFP a été révélée sous lumière ultraviolette. Ki67 est un antigène associé aux cellules en division ; son expression, révélée ici par immunofluorescence indirecte (flèches), témoigne d'un taux de prolifération normal. Les profils d'expression de l'intégrine beta 1 (*beta1*), marqueur de la couche basale, et de la filaggrine (*Fil*), marqueur tardif, sont tout à fait normaux et témoignent du bon déroulement de la différenciation épidermique des cellules génétiquement manipulées.

La régénération *in vivo*, chez la souris athymique, d'un épiderme normal à partir des kératinocytes génétiquement manipulés est illustrée par l'histologie du greffon après 22 semaines de greffe. La fluorescence de la GFP est présente sans atténuation tout au long de la survie de la greffe, ce qui témoigne de la pérennité d'expression du transgène. Barre : 100  $\mu$ m.

à chaque passage à partir des cellules transduites ou témoins ont été analysées par les techniques de western blot et d'immunofluorescence (données non montrées et figure 4) (Bergoglio *et al.*, 2007). Les résultats montrent que l'expression ectopique du CD24 et du gène traceur de la GFP restent stables au cours de la propagation des cellules CD24+/GFP+.

### **La sélection est-elle compatible avec le respect du programme de différenciation épidermique *ex vivo* ?**

Le bon déroulement du programme de différenciation des kératinocytes CD24+/GFP+ a été démontré par leur capacité à former un épiderme normalement stratifié en culture organotypique *ex vivo*. Les épidermes formés par les cellules CD24+/GFP+ sont histologiquement comparables aux épidermes formés par les cellules contrôles. De plus, la détection par immunomarquage de marqueurs de différenciation spécifiques de la couche basale (intégrine  $\beta$  1) ou des couches suprabasales (kératine 10 et filaggrine) ont permis de confirmer le bon déroulement du programme de différenciation épidermique dans les peaux CD24+/GFP+ organotypiques reconstruites *in vitro*.

Grâce à la technique de greffe orthotopique sur des souris athymiques, nous avons également vérifié la capacité des kératinocytes CD24+/GFP+ à régénérer à long terme un épiderme normal *in vivo*. Tout comme les cultures de peau organotypique *ex vivo*, les épidermes régénérés *in vivo* présentent des caractéristiques histologiques normales et un programme de différenciation respecté.

## **Application au xeroderma pigmentosum**

### **Rayonnement ultraviolet et cancérogénèse cutanée**

La peau, enveloppe protectrice de l'organisme, est la première cible du rayonnement ultraviolet (UVB, 280-320 nm; UVA, 320-400 nm) issu de la lumière solaire. Ce rayonnement constitue le principal facteur environnemental responsable des dégradations structurales et fonctionnelles de la peau. Les UVB sont en effet absorbés par les cycles aromatiques de l'ADN et provoquent la formation de photoproduits génotoxiques au niveau des séquences bipyrimidiques de la double hélice : les dimères cyclobuténiques de pyrimidines (CPD) et les dimères (6-4) pyrimidine-pyrimidone (6-4PP). Au cours de la division cellulaire, la réplication de ces lésions peut être mutagène et donc potentiellement oncogénique. Ainsi, l'introduction de mutations dans une cellule souche de la couche basale épidermique conduit au développement des cancers de la peau les plus fréquents chez l'homme : les carcinomes baso- et spino-cellulaires, dont l'étiologie est clairement liée à l'exposition solaire. La réparation de l'ADN constitue donc la première ligne de défense des cellules de la peau. Le mécanisme de réparation par excision de nucléotides (NER) est le processus le plus polyvalent prenant en charge la réparation des dommages présents sur l'ADN. Les principaux substrats du NER, et les plus importants d'un point de vue clinique, sont les dimères de pyrimidines induits par les UV (Bergoglio & Magnaldo, 2006).

### **Le xeroderma pigmentosum, maladie du NER (Nucleotide Excision Repair)**

Le *xeroderma pigmentosum* (XP) est une maladie génétique rare (1/500.000 naissances environ dans notre région du globe), transmise sur le mode autosomique et récessif. Les patients XP souffrent d'une photosensibilité exacerbée, associée à une prédisposition dramatique au développement de tumeurs cutanées (carcinomes cutanés baso- et spino-cellulaires, mélanomes malins) dans les zones corporelles photo-exposées (Kraemer *et al.*, 1987). Les analyses biochimiques et génétiques ont montré que les cellules de ces patients présentent une incapacité majeure à éliminer les lésions introduites dans l'ADN par les UV en raison de l'altération du fonctionnement du NER. Le décryptage moléculaire du XP a été compliqué par la variabilité des symptômes cliniques indépendants de la photosensibilité. Ainsi, alors que certains patients XP présentent des désordres neurologiques, d'autres en sont épargnés. L'hétérogénéité clinique reflète en réalité une hétérogénéité génétique. On sait maintenant que les cellules des patients XP forment sept groupes de complémentation, XP-A à XP-G, tous déficitaires pour le NER puisque les sept gènes correspondants (*XPA* à *XPG*) codent tous pour des protéines impliquées directement dans ce processus de réparation (Hoeijmakers, 2001).

Environ 50 % de patients XP appartiennent au groupe de complémentation XP-C. La protéine XPC joue un rôle essentiel dans la reconnaissance de la lésion et le recrutement du complexe multiprotéique chargé de sa résolution. Le taux de NER résiduel chez ces patients est donc très faible (environ 10 %). Les symptômes des patients XP-C sont, en principe, limités à la photosensibilité et à la prédisposition aux cancers cutanés. Le groupe XP-C semble donc être le meilleur candidat à la thérapie génique cutanée (Magnaldo, 2004).

### **La thérapie génique cutanée *ex vivo* : un véritable espoir pour le xeroderma pigmentosum**

En dehors d'une surveillance dermatologique très sérieuse, associée à une photoprotection maximale, il n'existe pas de solution thérapeutique pour les patients XP. Comme pour le cas des grands brûlés, les zones cutanées trop endommagées par le développement, puis l'exérèse des tumeurs épidermiques peuvent être remplacées par de la peau saine par autogreffe. Les cellules greffées demeurent toutefois incapables de réparer leur ADN. La thérapie génique *ex vivo* des cellules souches épidermiques pourrait donc constituer, pour les patients XP-C notamment, un réel espoir thérapeutique. Une des

premières étapes a été de réaliser la première re-contruction organotypique de peau XP *ex vivo*, d'en décrire pour la première fois les anomalies (Bernerd *et al.*, 2001; Bernerd *et al.*, 2005) puis d'en proposer la première étape de la thérapie génique épidermique *ex vivo*, bien que toutefois à court terme (six semaines) (Arnaudeau-Begard *et al.*, 2003). Ainsi la réintroduction d'une ou de plusieurs copies saines du gène *XPC* à l'aide des moyens appropriés dans des kératinocytes de patients XP-C propagés en culture permettrait de générer, puis de greffer chez le patient, de petites surfaces d'épithélium de culture génétiquement corrigé. La mise au point d'un système de sélection non invasif des cellules souches épidermiques génétiquement corrigées devrait être une aide précieuse à cet égard.

## Conclusions :

Les efforts de manipulation génétique des cellules souches épidermiques à visée thérapeutique devraient apporter beaucoup d'informations sur la connaissance fondamentale de ces cellules. Chez les patients aux conditions de vie particulièrement difficiles, les greffes de feuilletts épidermiques génétiquement corrigés constituent un espoir réel.

## Remerciements

La recherche a été soutenue par l'Association pour la Recherche sur le Cancer, la Fondation de l'Avenir, la Société Française de Dermatologie, l'Association Française contre les Myopathies. Ces associations sont vivement remerciées pour leur aide. Emilie Warrick est titulaire d'une allocation CIFRE CNRS/L'Oréal.

## Références

Arnaudeau-Begard, C., Brellier, F., Chevallier-Lagente, O., Hoeijmakers, J., Bernerd, F., Sarasin, A. & Magnaldo, T. Genetic correction of DNA repair-deficient/cancer-prone xeroderma pigmentosum group C keratinocytes. *Hum Gene Ther.* 2003, 14, 983-96.

Baldeschi, C., Gache, Y., Rattenholl, A., Bouille, P., Danos, O., Ortonne, J. P., Bruckner-Tuderman, L. & Meneguzzi, G. Genetic correction of canine dystrophic epidermolysis bullosa mediated by retroviral vectors. *Hum Mol Genet.* 2003, 12, 1897-905.

Barrandon, Y. & Green, H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987, 84, 2302-6.

Bergoglio, V., Larcher, F., Chevallier-Lagente, O., Bernheim, A., Danos, O., Sarasin, A., Rio, M. D. & Magnaldo, T. Safe Selection of Genetically Manipulated Human Primary Keratinocytes with Very High Growth Potential Using CD24. *Mol Ther.* 2007.

Bergoglio, V. & Magnaldo, T. Nucleotide Excision Repair and Related Human Diseases. *Volff J-N (ed) : Genome and Disease. Genome Dyn. Basel, Karger.* 2006, vol 1, 35-52.

Bernerd, F., Asselineau, D., Frechet, M., Sarasin, A. & Magnaldo, T. Reconstruction of DNA repair-deficient xeroderma pigmentosum skin in vitro : a model to study hypersensitivity to UV light. *Photochem Photobiol.* 2005, 81, 19-24.

Bernerd, F., Asselineau, D., Vioux, C., Chevallier-Lagente, O., Bouadjar, B., Sarasin, A. & Magnaldo, T. Clues to epidermal cancer proneness revealed by reconstruction of DNA repair-deficient xeroderma pigmentosum skin in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2001, 98, 7817-22.

Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J. L., Bousso, P., Deist, F. L. & Fischer, A. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science.* 2000, 288, 669-72.

Challita, P. M. & Kohn, D. B. Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994, 91, 2567-71.

Chen, M., Kasahara, N., Keene, D. R., Chan, L., Hoeffler, W. K., Finlay, D., Barcova, M., Cannon, P. M., Mazurek, C. & Woodley, D. T. Restoration of type VII collagen expression and function in dystrophic epidermolysis bullosa. *Nat. Genet.* 2002, 32, 670-5.

Choate, K. A. & Khavari, P. A. Sustainability of keratinocyte gene transfer and cell survival in vivo. *Hum. Gene Ther.* 1997, 8, 895-901.

Choate, K. A., Medalie, D. A., Morgan, J. R. & Khavari, P. A. Corrective gene transfer in the human skin disorder lamellar ichthyosis. *Nat. Med.* 1996, 2, 1263-7.

Dellambra, E., Prislei, S., Salvati, A. L., Madeddu, M. L., Golisano, O., Siviero, E., Bondanza, S., Cicuzza, S., Orecchia, A., Giancotti, F. G., Zambruno, G. & De Luca, M. Gene correction of integrin beta4-dependent pyloric atresia-junctional epidermolysis bullosa keratinocytes establishes a role for beta4 tyrosines 1422 and 1440 in hemidesmosome assembly. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 41336-42.

Dellambra, E., Vailly, J., Pellegrini, G., Bondanza, S., Golisano, O., Macchia, C., Zambruno, G., Meneguzzi, G. & De Luca, M. Corrective transduction of human epidermal stem cells in laminin-5-dependent junctional epidermolysis bullosa. *Hum. Gene Ther.* 1998, 9, 1359-70.

Deng, H., Choate, K. A., Lin, Q. & Khavari, P. A. High-efficiency gene transfer and pharmacologic selection of genetically engineered human keratinocytes. *Biotechniques.* 1998, 25, 274-80.

Fenjves, E. S., Yao, S. N., Kurachi, K. & Taichman, L. B. Loss of expression of a retrovirus-transduced gene in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 1996, 106, 576-8.

Gache, Y., Baldeschi, C., Del Rio, M., Gagnoux-Palacios, L., Larcher, F., Lacour, J. P. & Meneguzzi, G.

- Construction of skin equivalents for gene therapy of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Hum. Gene Ther.* 2004, 15, 921-33.
- Gagnoux-Palacios, L., Hervouet, C., Spirito, F., Roques, S., Mezzina, M., Danos, O. & Meneguzzi, G. Assessment of optimal transduction of primary human skin keratinocytes by viral vectors. *J. Gene Med.* 2005, 7, 1178-86.
- Gallico, G. G., 3rd, O'Connor, N. E., Compton, C. C., Kehinde, O. & Green, H. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N. Engl. J. Med.* 1984, 311, 448-51.
- Gambardella, L. & Barrandon, Y. The multifaceted adult epidermal stem cell. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2003, 15, 771-7.
- Gerrard, A. J., Hudson, D. L., Brownlee, G. G. & Watt, F. M. Towards gene therapy for haemophilia B using primary human keratinocytes. *Nat. Genet.* 1993, 3, 180-3.
- Ghazizadeh, S., Doumeng, C. & Taichman, L. B. Durable and stratum-specific gene expression in epidermis. *Gene Ther.* 2002, 9, 1278-85.
- Ghazizadeh, S., Harrington, R. & Taichman, L. In vivo transduction of mouse epidermis with recombinant retroviral vectors : implications for cutaneous gene therapy. *Gene Ther.* 1999, 6, 1267-75.
- Ghazizadeh, S., Katz, A. B., Harrington, R. & Taichman, L. B. Lentivirus-mediated gene transfer to human epidermis. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 2004, 9, 269-75.
- Gram, G. J., Nielsen, S. D. & Hansen, J. E. Spontaneous silencing of humanized green fluorescent protein (hGFP) gene expression from a retroviral vector by DNA methylation. *J. Hematother.* 1998, 7, 333-41.
- Green, H. The keratinocyte as differentiated cell type. *Harvey. Lect.* 1980, 74, 101-39.
- Green, H., Kehinde, O. & Thomas, J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1979, 76, 5665-8.
- Hoeijmakers, J. H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 2001, 411, 366-74.
- Kaur, P. Interfollicular epidermal stem cells : identification, challenges, potential. *J. Invest. Dermatol.* 2006, 126, 1450-8.
- Kolodka, T. M., Garlick, J. A. & Taichman, L. B. Evidence for keratinocyte stem cells in vitro : long term engraftment and persistence of transgene expression from retrovirus-transduced keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1998, 95, 4356-61.
- Kraemer, K. H., Lee, M. M. & Scotto, J. Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular, and neurologic abnormalities in 830 published cases. *Arch. Dermatol.* 1987, 123, 241-50.
- Lajtha, L. G. Stem cell concepts. *Differentiation.* 1979, 14, 23-34.
- Levy, L., Broad, S., Zhu, A. J., Carroll, J. M., Khazaal, I., Peault, B. & Watt, F. M. Optimised retroviral infection of human epidermal keratinocytes : long-term expression of transduced integrin gene following grafting on to SCID mice. *Gene. Ther.* 1998, 5, 913-22.
- Lu, Z. & Ghazizadeh, S. Host immune responses in *ex vivo* approaches to cutaneous gene therapy targeted to keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 2005, 14, 727-35.
- Lu, Z. & Ghazizadeh, S. Loss of transgene following *ex vivo* gene transfer is associated with a dominant Th2 response : implications for cutaneous gene therapy. *Mol. Ther.* 2007, 15, 954-61.
- Magnaldo, T. Xeroderma pigmentosum : from genetics to hopes and realities of cutaneous gene therapy. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2004, 4, 169-79.
- Magnaldo, T. & Barrandon, Y. CD24 (heat stable antigen, nectadrin), a novel keratinocyte differentiation marker, is preferentially expressed in areas of the hair follicle containing the colony-forming cells. *J. Cell. Sci.* 1996, 109 (Pt 13), 3035-45.
- Mathor, M. B., Ferrari, G., Dellambra, E., Cilli, M., Mavilio, F., Cancedda, R. & De Luca, M. Clonal analysis of stably transduced human epidermal stem cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1996, 93, 10371-6.
- Mavilio, F., Pellegrini, G., Ferrari, S., Di Nunzio, F., Di Iorio, E., Recchia, A., Maruggi, G., Ferrari, G., Provasi, E., Bonini, C., Capurro, S., Conti, A., Magnoni, C., Giannetti, A. & De Luca, M. Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nat. Med.* 2006, 12, 1397-402.
- Morgan, J. R., Barrandon, Y., Green, H. & Mulligan, R. C. Expression of an exogenous growth hormone gene by transplantable human epidermal cells. *Science*, 1987, 237, 1476-9.
- Pellegrini, G., Bondanza, S., Guerra, L. & De Luca, M. Cultivation of human keratinocyte stem cells : current and future clinical applications. *Med. Biol. Eng. Comput.* 1998, 36, 778-90.
- Pellegrini, G., Ranno, R., Stracuzzi, G., Bondanza, S., Guerra, L., Zambruno, G., Micali, G. & De Luca, M. The control of epidermal stem cells (holoclon) in the treatment of massive full-thickness burns with autologous keratinocytes cultured on fibrin. *Transplantation*, 1999, 68, 868-79.
- Rheinwald, J. G. & Green, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes : the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell.* 1975, 6, 331-43.
- Robbins, P. B., Lin, Q., Goodnough, J. B., Tian, H., Chen, X. & Khavari, P. A. In vivo restoration of laminin 5 beta 3 expression and function in junctional epidermolysis bullosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2001, 98, 5193-8.
- Ronfard, V., Rives, J. M., Neveux, Y., Carsin, H. & Barrandon, Y. Long-term regeneration of human epidermis on third degree burns transplanted with autologous cultured epithelium grown on a fibrin matrix. *Transplantation*, 2000, 70, 1588-98.
- Seitz, C. S., Giudice, G. J., Balding, S. D., Marinkovich, M. P. & Khavari, P. A. BP180 gene delivery in junctional epidermolysis bullosa. *Gene. Ther.* 1999, 6, 42-7.
- Watt, F. M., Lo Celso, C. & Silva-Vargas, V. Epidermal stem cells : an update. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2006, 16, 518-24.