

Université de Liège



GIGA-Research

Faculté de Médecine
Département des
Sciences Biomédicales

La phénylcétonurie : étude de la myélinisation
du système nerveux central et contribution à la
thérapie génique

Génétique Humaine
Professeur V. Bours

Mémoire de
Thèse soumis par
Schoemans Renaud
En vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Année académique
2009 - 2010

Remerciements

Tout d'abord je voudrais remercier le Professeur Vincent Bours, qui m'a permis de travailler au laboratoire de Génétique Humaine. Merci à lui pour ses conseils et son soutien tout au long de ces années de thèse. Merci à Frédéric Princen et Valéry Leduc pour leur collaboration et tout particulièrement à Claire Josse d'avoir partagé mon parcours avec tant d'investissement.

Merci au Docteur Shibeshih Belachew dont l'aide fût précieuse lors de l'élaboration et la concrétisation du versant neurobiologique de mes recherches. L'aide logistique du Docteur Brigitte Malgrange ainsi que l'avis éclairé du Docteur Bernard Rogister ont contribué à l'aboutissement de ce travail.

Les six mois passés à Paris ont permis de faire progresser significativement ma thèse. Cela n'aurait pas été possible sans le support et le chaleureux accueil que j'ai reçu à l'Unité INSERM 711. Merci au Professeur Catherine Lubetzki et Marie-Stéphane Aigrot pour le soutien et l'altruisme dont elles ont fait preuve dès mon arrivée.

J'ai été amené à demander à maintes reprises de l'aide extérieure au service de Génétique Humaine. J'ai eu la chance de rencontrer de nombreuses personnes prêtes à donner de leur temps. Il est impossible de les citer toutes, cependant je voudrais mentionner Raphaël Marée, Renaud Vandebosch, Patricia Ernst, Arlette Brose, Jean-Paul Cheramy-Bien, Morgan Bodson, Jérôme Kroonen, pour leur généreuse contribution.

Ensuite je tiens à exprimer ma reconnaissance envers mes collègues/compères de laboratoire que sont ou ont été Jean-Stéphane, Sabine, Marie-Alice, Dominique, Isabelle, Aurore, Catherine C., Pierre, Emilie, Maria, Kim, Céline, Catherine V., Neville, Christelle, Cécile, Olivier, Valérie, Magali, Ayman, Gael, Marianne mais aussi Cyril et Patricia à Paris. Merci pour les interactions scientifiques ou administratives mais aussi pour les discussions, blagues, dégustations et albums photos qui ont agrémenté mon quotidien de chercheur.

Un tout grand merci à Grégory Nolens, Vincent Chabottaux, Laurent Hemelaers, Olivier Waroux, Medhi El Hour, Lorin Host, Françoise Bruyère, Sophie Ledant, Sarah Berndt pour ces temps de midi mémorables. En termes de support à ces précieux instants, merci à Monsieur Plus pour la corne d'abondance aux boulets-frites à emporter.

Enfin, j'exprime toute ma gratitude envers la Région Wallonne, le Fond Léon Fredericq, le FNRS qui ont financé les recherches présentées dans ce travail, ainsi que l'Université de Liège et le GIGA.

Mes remerciements ne seraient pas complets sans évoquer le soutien moral de ma famille avec une mention toute particulière à ma compagne Charlotte. Merci à elle pour sa compréhension et sa patience particulièrement durant mon séjour en France et ces derniers mois, ainsi que pour tout le bonheur à venir. J'ai beaucoup de chance.

TABLE DES MATIÈRES

1	INTRODUCTION.....	1
1.1	LA PHÉNYLCÉTONURIE.....	1
1.1.1	<i>Historique</i>	1
1.1.2	<i>Symptômes</i>	1
1.1.3	<i>Bases biologiques</i>	1
1.1.4	<i>Tissus exprimant la PAH</i>	2
1.1.5	<i>Métabolisme</i>	3
1.1.6	<i>Régulation de la PAH</i>	4
1.1.7	<i>Génétique</i>	5
1.1.7.1	Général.....	5
1.1.7.2	Evolution.....	5
1.1.7.3	Régulation.....	5
1.1.7.4	Mutations.....	6
1.1.7.5	Relation génotype-phénotype.....	7
1.1.8	<i>Dépistage</i>	8
1.1.9	<i>Traitement</i>	8
1.2	ATTEINTES NEUROLOGIQUES LIÉES À LA PHÉNYLCÉTONURIE.....	9
1.2.1	<i>La myéline</i>	9
1.2.2	<i>Myélinisation du SNC</i>	10
1.2.3	<i>Composition de la myéline</i>	10
1.2.4	<i>L'oligodendrocyte</i>	11
1.2.5	<i>Bases de l'investigation</i>	11
1.2.5.1	Déficit en tyrosine.....	12
1.2.5.2	Le transport des grands acides aminés neutres.....	13
1.2.5.3	Perturbations neurobiologiques.....	14
1.3	L'AVENIR DU TRAITEMENT DE LA PCU.....	16
1.3.1	<i>La problématique du traitement actuel de la PCU</i>	16
1.3.2	<i>La thérapie cellulaire pour les maladies métaboliques hépatiques</i>	16
1.3.2.1	Les cellules souches mésenchymateuses.....	18
1.3.3	<i>Le principe de la thérapie génique</i>	19
1.3.3.1	Les lentivirus, une sous famille des rétrovirus.....	20
1.3.4	<i>Thérapie génique de la PCU</i>	22
2	BUT DU TRAVAIL.....	24
2.1	ETUDE DE LA MYÉLINISATION.....	24
2.2	THÉRAPIE GÉNIQUE DE LA PCU.....	25
3	RÉSULTATS.....	26
3.1	NEUROBIOLOGIE DE LA PCU.....	26
3.1.1	<i>Investigations in vivo</i>	26
3.1.1.1	Prolifération des OPC.....	27
3.1.1.2	Densité oligodendrocytaire au sein du corps calleux.....	27
3.1.2	<i>Investigations in vitro</i>	28
3.1.2.1	Test de viabilité.....	29

3.1.2.2	Tests fonctionnels	29
3.2	THÉRAPIE GÉNIQUE DE LA PCU	33
3.2.1	<i>Hépatocytes</i>	33
3.2.2	<i>Cellules souches mésenchymateuses</i>	36
3.2.2.1	Cellules souches mésenchymateuses murines.....	36
3.2.2.2	Cellules souches mésenchymateuses humaines.....	40
4	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	44
4.1	DÉFICIT NEUROLOGIQUE ET PCU	44
4.2	THÉRAPIE GÉNIQUE DE LA PCU	46
5	MATÉRIEL ET MÉTHODES	50
5.1	MODÈLES EXPÉRIMENTAUX	50
5.1.1	<i>Lignées animales</i>	50
5.1.1.1	Génotypage	50
5.1.2	<i>Lignées cellulaires</i>	51
5.2	TRAITEMENTS EN MODÈLE <i>IN VIVO</i>	51
5.2.1	<i>Protocoles de lésion hépatique</i>	51
5.2.2	<i>Injection intrasplénique CSM</i>	52
5.2.3	<i>Protocole d'immunosuppression</i>	52
5.2.4	<i>Test du protocole d'immunosuppression</i>	53
5.2.5	<i>Exposition au BrdU</i>	53
5.3	ISOLEMENTS DE CELLULES PRIMAIRES ET CULTURES.....	53
5.3.1	<i>Isolement d'une population cellulaire enrichie en oligodendrocytes</i>	53
5.3.2	<i>Cultures myélinisantes</i>	54
5.3.3	<i>Isolement d'hépatocytes primaires murins</i>	55
5.3.4	<i>Isolement de CSM murines</i>	55
5.3.4.1	Cytométrie en flux.....	56
5.3.4.2	Différenciation des CSM.....	56
5.4	VECTEUR LENTIVIRAL	57
5.4.1	<i>Description</i>	57
5.4.2	<i>Production des vecteurs lentiviraux</i>	57
5.4.3	<i>Titration p24</i>	58
5.4.4	<i>Transduction par vecteur lentiviral</i>	58
5.5	HISTOLOGIE.....	58
5.5.1	<i>Traitement des échantillons</i>	58
5.5.2	<i>Immunohistochimie</i>	59
5.5.3	<i>Immunocytochimie</i>	59
5.5.4	<i>Prolifération des progéniteurs d'oligodendrocytes (OPC)</i>	60
5.5.5	<i>Densité oligodendrocytaire</i>	60
5.6	ESSAIS.....	61
5.6.1	<i>Test de viabilité</i>	61
5.6.2	<i>Evaluation de l'activité β-galactosidase</i>	61
5.6.3	<i>Quantification in vitro de la myélogénèse</i>	62
5.6.4	<i>Western blotting anti PAH</i>	63
5.6.5	<i>Quantification de l'activité PAH</i>	63
5.6.6	<i>PCR quantitative et extraction d'ADN génomique</i>	63

5.7	RÉACTIFS	64
5.8	ANALYSE STATISTIQUE DES RÉSULTATS.....	64
6	RÉFÉRENCES	65
6.1	LIENS.....	65
6.2	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	65
7	ANNEXES	75
7.1	ARTICLE 1	75
7.2	ARTICLE 2.....	75

Abréviations :

ADNc	ADN complémentaire
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
Ap-2	<i>Activator Protein-2</i>
BH2	Dihydroptérine quinonoïde
BH4	Tétrahydrobioptérine
BrdU	Bromodéoxyuridine
CC-1	Anticorps dirigé contre APC
CFU-F	<i>Colony forming units-fibroblast</i>
CMV	Cytomégalovirus
CSM	Cellule souche mésenchymateuse
DHRP	Dihydroptéridine réductase
EF-1α	<i>Elongation factor 1 alpha</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FAH	Fumarylacétoacétyl-CoA hydrolase
GaIC	Galactosylcéramide
GAPDH	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GFAP	<i>Glial fibrillary acid protein</i>
GFP (e)	<i>Green fluorescent protein (enhanced)</i>
GRE	<i>Glucocorticoid response elements</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HMGR	3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase
HNF1	<i>Hepatocyte nuclear factor 1</i>
HPA	Hyperphénylalaninémie
I.S.	Immunosuppresseur
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
LAT1	<i>Large amino acid transporter 1</i>
LDH	Lactate déshydrogénase
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
LMO2	<i>LIM domain only 2</i>
LNAA	<i>Large neutral amino acid</i>

LTR	<i>Long terminal repeat</i>
MBP	<i>Myelin basic protein</i>
MMF	Mycophénolate mofétil
Olig2	<i>Oligodendrocyte lineage transcription factor 2</i>
OPC	<i>Oligodendrocyte progenitor cell</i>
PA	Phénylacétate
PAH	Phénylalanine hydroxylase
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PCU	Phénylcétonurie
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PFS	Promoteur foie-spécifique
Phe	Phénylalanine
PLP	<i>Proteolipid protein</i>
PP	Phénylpyruvate
QI	Quotient intellectuel
rAAV	<i>Recombinant adeno-associated virus</i>
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SIN	<i>Self inactivating</i>
SNC	Système nerveux central
Sp-1	<i>Stimulatory Protein-1</i>
TGO	Transaminase glutamate oxaloacétique
TGP	Transaminase glutamate pyruvate
Tyr	Tyrosine
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VSVG	<i>Vesicular stomatitis virus G protein</i>
ZSVDL	Zone sous ventriculaire dorso latérale

1 Introduction

1.1 La phénylcétonurie

1.1.1 Historique

La phénylcétonurie a été pour la première fois décrite en 1934 par Asbørn Følling (OMIM #261600). Celui-ci a étudié le rapport entre l'odeur particulière de l'urine de deux frères et leur retard mental. Il a découvert que ces urines étaient riches en cétones, et plus particulièrement en acide phénylpyruvique. Une investigation d'une cohorte plus large de sujets atteints de retard mental lui permit d'identifier huit autres patients présentant la même augmentation en acide phénylpyruvique dans leurs urines. Il publia ces données et suggéra le nom « imbecillitas phenylpyruvica » soulignant le déficit mental engendré. La dénomination « phénylcétonurie » (PCU) fût ensuite proposée en 1935 par Penrose. Jervis caractérisa en 1953 le déficit enzymatique sous-tendant la modification de la composition des urines. Les patients souffrant de PCU présentent une augmentation du taux plasmatique de phénylalanine (Phe) libre causant l'apparition de corps cétoniques. Cette augmentation est due à un déficit d'activité de l'enzyme phénylalanine hydroxylase (PAH) (Jervis 1953).

1.1.2 Symptômes

Le phénotype classique du phénylcétonurique est un retard mental profond (QI moyen=35), une hypopigmentation, un retard de croissance, une odeur urinaire et corporelle souvent qualifiée de murine, ceci associé à des crises d'épilepsies pour un quart des patients. D'autres anomalies du comportement comme la schizophrénie ou l'agressivité sont associés à la PCU mais d'une manière moins systématique. Il est intéressant de noter que le symptôme majeur, le retard mental, est certainement le moins bien expliqué (Scriver et Kaufman 2008).

1.1.3 Bases biologiques

Cette pathologie est caractérisée par un déficit de conversion de la phénylalanine (Phe) en tyrosine (Tyr), fonction assurée par l'enzyme phénylalanine hydroxylase (PAH) (figure 1). La PAH nécessite la présence de son cofacteur la tétrahydrobioptérine (BH4), ainsi que de l'oxygène moléculaire O₂ pour réaliser la réaction d'hydroxylation de la Phe en Tyr (figure 1). La réaction oxyde le BH4 en 4-hydroxytétrahydroptérine, qui est ensuite prise en charge par une 4 α -carbinolamine déshydratase et la dihydroptéridine réductase (DHPR) pour régénérer du BH4 (figure 1). Ainsi l'activité de l'enzyme PAH mais aussi la quantité disponible du cofacteur sont essentiels à l'hydroxylation de la Phe en Tyr. Cette

enzyme a une localisation cellulaire cytoplasmique et est présente en grande partie sous forme tétramérique (figure 2).

La PAH contient en son site actif un atome de fer, celui-ci est essentiel à son activité catalytique et interagit avec les histidines 285 et 290, ainsi qu'avec la glutamine 330. Trois molécules d'eau sont liées à cet atome de fer (Erlandsen et Stevens 1999). Il apparaît que quand la Phe et le BH₄ sont liés à l'enzyme, l'ion ferreux perd de l'eau ce qui permet la formation d'un centre de coordination permettant la génération d'un intermédiaire actif d'O₂ et l'hydroxylation couplée de la Phe et du BH₄. Afin d'exercer pleinement son activité, quatre monomères PAH doivent s'associer. Cette association passe par l'interaction de leur partie C-terminale (résidus 414 à 420) qui présente deux conformations hélicoïdales alignées tête-bêche (Bassan et al. 2003; Erlandsen et al. 1997; Erlandsen et Stevens 1999; Wasinger et al. 2002). Il a été démontré que les formes dimériques et tétramériques de l'enzyme sont physiologiquement présentes, la forme tétramérique ayant une activité cinq fois supérieure à la forme dimérique (Scriver et Kaufman 2008).

Il existe des formes plus ou moins sévères d'hyperphénylalaninémie (HPA). Cette gradation est due à l'existence d'une très grande variété de mutations au sein des gènes codant non seulement la PAH, mais aussi les enzymes impliquées dans la synthèse et le recyclage de la tétrahydrobioptérine (BH₄). Certaines mutations sont plus incapacitantes que d'autres, et il en découle un éventail de phénotypes métaboliques. Néanmoins les mutations les plus fréquentes touchent le gène de la PAH.

La concentration moyenne en Phe plasmatique libre est de 60 µM chez l'individu sain. Les HPA sont classées en HPA modérée ou phénylcétonurie selon que la concentration plasmatique en Phe libre dépasse 1 mM ou 16,5 mg/dl, ou que la tolérance à l'ingestion de Phe soit supérieure ou inférieure à 500 mg/jour.

1.1.4 Tissus exprimant la PAH

La PAH est l'objet d'une expression ciblée au sein de l'organisme chez les mammifères. On a d'abord pensé que cette expression se limitait au parenchyme hépatique. Il a ensuite été démontré par *Northern Blot*, immunohistochimie et essai enzymatique que si elle est effectivement principalement exprimée par les hépatocytes, la PAH l'est aussi de manière significative par le parenchyme rénal (Lichter-Konecki et al. 1999; Tessari et al. 1999). Globalement, 80% de l'activité phénylalanine hydroxylase est à attribuer au foie pour 20% au rein (Scriver et Kaufman 2008). Les autres tissus de l'organisme humain ne montrent pas de taux d'expression significatif de la PAH.

1.1.5 Métabolisme

Les flux de Phe au sein du corps humain peuvent être séparés en entrées et sorties. Les entrées proviennent principalement de la Phe exogène alimentaire et la Phe endogène intégrée aux protéines. Les sorties consistent en son hydroxylation en Tyr, l'incorporation de la Phe lors de la synthèse protéique, sa transamination et sa décarboxylation. En conditions normales, l'hydroxylation est le mécanisme majeur et est responsable de 75% des sorties de Phe. La synthèse protéique permet la sortie de 25% de la Phe libre plasmatique, tandis que la transamination et la décarboxylation n'ont qu'un effet mineur (Scriver et Kaufman 2008). Les flux de Phe entrants au sein de l'organisme sont régis par un transport actif couplé à un gradient d'ion Na^+ au pôle apical des entérocytes et des cellules des tubules rénaux, et par des transporteurs non dépendants de gradients ioniques aux autres membranes plasmiques (Christensen 1986; Christensen 1987). Pour sortir des cellules, la Phe doit emprunter un transporteur transmembranaire commun à tous les grands acides aminés neutres. Cette famille d'acides aminés comprend la phénylalanine, la tyrosine, le tryptophane, la valine, l'isoleucine, la leucine, la thréonine, la méthionine et l'histidine.

L'hydroxylation de la Phe est l'étape limitante de son catabolisme en H_2O et CO_2 par oxydation (Milstien et Kaufman 1975). Les voies de céto-genèse et gluconéogenèse peuvent utiliser la Phe comme substrat, mais sa prise en charge par ces voies métaboliques nécessite sa conversion préalable en tyrosine (figure 3).

Il existe au niveau du néphron un puissant système de reprise des acides aminés empêchant toute excrétion urinaire de la Phe sous sa forme primitive. Ce système, composé de transporteurs de haute et faible affinité, est capable d'une réabsorption presque totale de la Phe à partir du filtrat glomérulaire et ce même en condition de phénylcétonurie (Christensen 1982; Christensen 1986; Christensen 1987).

Chez les patients PCU la Phe, ne pouvant être ni métabolisée, ni excrétée sous sa forme primitive, s'accumule et sa concentration plasmatique augmente. Elle est alors déviée vers des voies d'excrétion normalement accessoires, principalement la voie de transamination. Cette voie convertit la Phe en phénylpyruvate puis en d'autres métabolites comme le phénylacétate par modification de la chaîne alanine (figure3). Ces dérivés peuvent être excrétés par voie urinaire, et de par leur nature cétonique, sont à l'origine de l'appellation phénylcétonurie. La voie de décarboxylation de la Phe en phényléthylamine reste quant à elle anecdotique, quelque soit le niveau plasmatique de Phe (Scriver et Kaufman 2008).

1.1.6 Régulation de la PAH

La PAH exécute la réaction principale et limitante permettant l'élimination de la Phe. Il n'est donc pas étonnant que cette enzyme soit l'objet d'une régulation de son activité permettant une homéostasie efficace des taux de Phe. La modulation de l'activité de la PAH est accomplie d'une part par son cofacteur, le BH₄, et son substrat, la phénylalanine, et d'autre part par phosphorylation/déphosphorylation. Le BH₄ seul a pour effet de diminuer l'activité de la forme tétramérique de l'enzyme (Davis et al. 1996), et de la rendre réfractaire à une modification par phosphorylation (Scriver et Kaufman 2008). La phénylalanine a un effet activateur sur la PAH, en levant l'inhibition exercée par le cofacteur BH₄ sur la forme tétramérique de l'enzyme (Davis et al. 1997; Scriver et Kaufman 2008), ce qui stabiliserait la protéine dans un état activé et propice à la phosphorylation (Phillips et Kaufman 1984). Le mécanisme de phosphorylation est lui aussi activateur de l'enzyme. La phosphorylation de la PAH est catalysée par une kinase dépendante de l'AMP cyclique (Abita et al. 1976), et sa déphosphorylation dépend de la phosphatase 2A (Ingebritsen et Cohen 1983; Jedlicki et al. 1977; Wretborn et al. 1980) (figure 4).

Il a été démontré chez le rat que le glucagon a pour effet d'augmenter *in vivo* (Donlon et Kaufman 1978) et *in vitro* (Abita et al. 1980) le degré d'activité de la PAH. Cette réponse est rapide et transitoire, et implique la phosphorylation de la PAH (Carr et Pogson 1981; Donlon et Kaufman 1978; Garrison et Wagner 1982). La sécrétion de glucagon par le pancréas est stimulée après un repas riche en protéines, les acides aminés libres stimulant directement cette sécrétion (Guttler et al. 1978; Rocha et al. 1972). Le glucagon active dans le foie l'adénylate cyclase, ce qui a pour effet d'élever le taux d'AMP cyclique et d'activer la kinase AMPc dépendante, ce qui conduit à l'activation de la PAH par phosphorylation. Ainsi l'apport oral d'acides aminés entraîne l'activation d'un mécanisme visant à limiter l'augmentation de la concentration plasmatique en Phe par son catabolisme, mais aussi par la production de glucose via la néoglucogenèse (Scriver et Kaufman 2008).

A contrario, la liaison du BH₄ seul a tendance à stabiliser la PAH dans un état de faible activité. Ce mécanisme est mis en œuvre en période de jeûne quand la concentration en Phe est faible afin de conserver une disponibilité minimale de cet acide aminé (Scriver et Kaufman 2008).

Il est à noter que l'enzyme humaine ne se comporte pas identiquement à celle provenant du rat, qui est souvent utilisée comme modèle. Cette dernière est capable d'une amplitude d'activation beaucoup plus grande que l'humaine. L'enzyme humaine est activée d'un facteur 2,2 par la Phe et d'un facteur 1,5 par la phosphorylation (Kowlessur et al. 1996; Martinez et al. 1995). L'enzyme provenant du rat est

quant à elle activée 8 fois et 4 fois par ces mécanismes, respectivement (Citron et al. 1992). Il apparaît que l'enzyme humaine est en revanche dans un état d'activation basal relativement élevé comparé à celle du rat (Kowlessur et al. 1996), ce qui expliquerait pourquoi chez l'homme la concentration normale plasmatique en Phe est de 58 μM alors que chez le rat elle s'élève à 96 μM (Delvalle et Greengard 1976; Scriver et al. 1985).

1.1.7 Génétique

1.1.7.1 Général

Il fût découvert très tôt, en 1935, que la phénylcétonurie était due à un trait récessif (MIM n°261600). C'est la maladie métabolique d'origine génétique la plus fréquente dans la population caucasienne avec une fréquence de 1/11600 naissances. 98% des mutations associées à une hyperphénylalaninémie prennent place au locus PAH, les 2% restants étant dus à des mutations dans le système de régénération du cofacteur de l'enzyme, le BH4. Le locus PAH est localisé chez l'homme sur le chromosome 12 en position q23.21 et mesure approximativement 100Kb (GenBank n°AF404777) (figure 5). Cette grande plage d'ADN contient 13 exons dont la taille varie de 57 pb à 892 pb, pour une longueur moyenne de 170 pb. L'analyse de l'ADN complémentaire nous montre que l'ARN messager de la PAH est long de 2,4 Kb et code une protéine longue de 452 acides aminés pour 52 kDa (GenBank (NCBI) U49897-1) (Kwok et al. 1985).

1.1.7.2 Evolution

Le gène codant la PAH est très répandu entre les espèces, et ce dès l'apparition des organismes complexes. Il est déjà exprimé chez *C. Elegans* et le génome de la drosophile comporte un locus PAH. Les gènes codant la phénylalanine hydroxylase, la tryptophane hydroxylase (TPH) et la tyrosine hydroxylase (TYH) sont dérivés d'un gène ancestral commun à partir duquel ils ont évolué depuis 75 millions d'années par duplication et divergence (Grenett et al. 1987; Neckameyer et White 1992). La structure de ces trois enzymes est restée similaire, surtout pour la portion C-terminale. Cette dernière est responsable de l'activité hydroxylase et de la liaison au cofacteur BH4, nécessaire à l'activité de chaque enzyme. La portion N-terminale a évolué et détermine la spécificité de liaison au substrat (phénylalanine, tyrosine ou tryptophane).

1.1.7.3 Régulation

Chez l'humain, la partie 5' de l'ADN génomique précédant de 0,5 kb le premier exon contient 5 sites potentiels de liaison à des facteurs de transcription. L'analyse de ces sites a mis en évidence des sites

de liaison pour les facteurs de transcription Sp-1 et Ap-2. Les séquences CCAAT lient probablement des cofacteurs influençant l'efficacité de la transcription, les séquences GRE et CACC régulent l'activité de ce gène par le biais de glucocorticoïdes. Un site partiel de liaison à l'élément de réponse à l'AMP cyclique (CRE) a aussi été découvert dans cette zone (Scriver et Kaufman 2008).

Un site de liaison au facteur nucléaire hépatique 1 (HNF1) est situé 3,5kb en amont du site d'initiation de la transcription. Fait intéressant, l'induction de la transcription par le facteur HNF1 est potentialisée par son cofacteur qui n'est autre que la protéine 4 α -carbinolamine déshydratase, aussi impliquée dans le recyclage du BH4. HNF1 doit être sous forme dimérique pour exercer pleinement son potentiel et la protéine 4 α -carbinolamine déshydratase stabilise ce dimère. Ainsi la même protéine influence la régulation transcriptionnelle du gène codant la PAH et la régulation de l'activité de la protéine elle-même, par le biais de la régénération de son cofacteur essentiel. HNF1 régule de nombreux gènes dans le parenchyme hépatique, rénal et intestinal dont ceux codant l'albumine, l' α_1 -antitrypsine et le fibrinogène. Une étude sur des souris dont le gène HNF1 a été invalidé a démontré qu'en l'absence de ce facteur de transcription le gène codant la PAH était complètement silencieux (Pontoglio et al. 1996).

1.1.7.4 Mutations

Une grande variété d'allèles PAH est présente au sein de la population. Une base de données ayant pour but de les répertorier a été fondée et est consultable à l'adresse www.pahdb.mcgill.ca. Plus de 500 allèles pathogènes ont été répertoriés à ce jour. Ces allèles mutants présentent une substitution dans 63% des cas, 13% ont de petites délétions (<22 pb), 12,8% ont une modification de l'épissage de l'ARN messager, 5,4% ont un codon stop précoce, 3% présentent une large délétion et 1% de petites insertions (Kozak et al. 2006). La majorité de ces allèles pathologiques est rare. En effet il n'existe que 5 allèles pathologiques largement répandus. Néanmoins cette diversité a été utilisée pour analyser l'évolution humaine et les mouvements de population sur plus de 100 000 ans par recoupement de variants génétiques caractéristiques de populations distinctes (Cavalli-Sforza et al. 1993; Cavalli-Sforza et Piazza 1993; Mountain et Cavalli-Sforza 1997).

Une grande variété de mutations peut affecter le gène codant pour la phénylalanine hydroxylase, tant sur son site actif que sur son domaine de tétramérisation, résultant en une diminution de l'activité de l'enzyme. Les enzymes permettant la synthèse et le recyclage du BH4 peuvent aussi être affectées, mais la cause principale de PCU est une déficience d'activité de la PAH. En Europe, environ 50% des cas de PCU sont dus à seulement deux mutations. Celles-ci modifient la partie C-terminale de la protéine et interfèrent avec les domaines catalytiques et de tétramérisation. La mutation IV12nt1g->a engendre

une délétion de l'exon 12 par modification de l'épissage (Marvit et al. 1987). La mutation R408W entraîne le remplacement d'une arginine par un tryptophane au début de l'hélice caractéristique du domaine de tétramérisation. Il en résulte dans les deux cas une enzyme incapable de tétramériser et à activité quasiment nulle. Il a été remarqué que ces variants présentent une grande instabilité et sont très vite dégradés quand ils sont exprimés en modèle *in vitro*, ce qui expliquerait cette faible activité (DiLella et al. 1987; Okano et al. 1991; Waters et al. 2000; Waters et al. 1998).

1.1.7.5 Relation génotype-phénotype

Il est possible de corréler l'activité d'une forme mutante de la PAH déterminée *in vitro* avec le phénotype métabolique d'un patient la portant. On peut ainsi prédire que certaines mutations très invalidantes provoqueront une forte augmentation de la Phe plasmatique (Weiss et Buchanan 2003). Il est cependant à noter que trois quarts des malades ont deux allèles mutants différents au locus de la PAH (Carter et al. 1998; Guldborg et al. 1996). Pour ces individus, il faut prendre en compte l'évaluation de l'activité des deux protéines mutantes pour formuler un pronostic métabolique.

Une corrélation entre le génotype et le retard mental, le symptôme majeur de la PCU, est plus difficile à mettre en évidence. Cependant l'intelligence étant un trait très complexe, cette difficulté n'est pas surprenante. Il a été possible dans bien des cas de corréler l'atteinte au développement cognitif (score QI) avec le taux plasmatique en Phe présenté par le patient (DiSilvestre et al. 1991; Guttler et al. 1993; Ramus et al. 1993; Trefz et al. 1993). Cependant des études comparant des individus présentant un taux plasmatique en Phe comparable, parfois porteurs des mêmes allèles PAH, ont révélé que l'atteinte de l'intelligence pouvait fortement varier (Moats et al. 1999; Moller et al. 1998; Weglage et al. 1998a; Weglage et al. 1998b). Il existe globalement une corrélation entre le génotype, le phénotype métabolique et les résultats d'imagerie cérébrale (Walter et al. 1993). Il est apparu que chez les malades au plus haut QI, le taux de Phe intra cérébral était moindre (Weglage et al. 1998a). Ceci introduit un nouveau facteur pouvant influencer sur le QI de ces patients : le transport de la Phe à travers la barrière hémato-encéphalique. La Phe ne peut passer librement à travers cette barrière, elle a besoin du transporteur LAT1 qui peut présenter une efficacité variable selon l'individu. Ce transporteur est commun à tous les grands acides aminés neutres et est saturable aux concentrations couramment retrouvées chez les patients souffrant de PCU, constituant un goulot d'étranglement pour le passage de ces acides aminés vers le cerveau (Scriver et Kaufman 2008). L'importance de ce transport sur la pathophysiologie de la PCU reste sujet à débat et sera discuté plus loin.

En conclusion, il n'est ainsi pas possible de définir à partir du génotype quelle sera la gravité de l'atteinte de l'intelligence avec une certitude absolue (Scriver et Waters 1999). Cependant la définition du génotype est utile afin de formuler un pronostic dans le cadre d'un conseil génétique ou pour l'établissement d'un traitement (Scriver et Kaufman 2008).

1.1.8 Dépistage

En raison de la forte fréquence de la PCU, les nouveaux nés de nombreux pays développés sont systématiquement testés pour cette affection. Le dépistage s'effectue à partir d'un échantillon sanguin idéalement prélevé 48h après la naissance. Ce délai est nécessaire à l'installation d'une concentration plasmatique en Phe libre significativement supérieure à la normale. Le test de Guthrie fût la première méthode fiable développée (Guthrie et Susi 1963). Aujourd'hui les centres de dépistage s'orientent vers une méthode de mesure de la Phe plasmatique libre par spectrométrie de masse à partir d'un échantillon sanguin séché sur buvard. Cette technique quantitative permet non seulement de détecter les déviations du taux de Phe de manière plus sensible, mais aussi de soumettre le même échantillon sanguin à plusieurs tests de dépistage pour différentes maladies génétiques.

1.1.9 Traitement

La Phe est un acide aminé essentiel à l'être humain, cependant son ingestion est aussi un facteur nécessaire à l'apparition de l'HPA. De cette constatation découle l'idée de soumettre les patients atteints de PCU à un régime alimentaire pauvre en Phe afin d'en diminuer la concentration plasmatique (figure 6). Ce traitement est mis en œuvre depuis le milieu des années 50 (Scriver et Kaufman 2008). Il implique la prise en charge du patient le plus rapidement possible après sa naissance, afin de limiter au maximum son exposition à un taux plasmatique élevé en Phe libre. Cette diète montre de bons résultats si elle est suivie à la lettre, cependant les écarts s'avèrent assez fréquents dans la pratique. Sont à mettre en cause le respect du régime dès les premières semaines de vie et l'énorme autodiscipline nécessaire au patient une fois qu'il a atteint un âge lui conférant une indépendance alimentaire. L'éventail d'aliments naturels autorisés est restreint et le régime est constitué en grande partie de substituts alimentaires synthétisés artificiellement proposant de piètres qualités gustatives. Ceci est à mettre en perspective d'un traitement actuellement recommandé jusqu'à 20 ans, qui selon de nombreuses sources scientifiques devrait être maintenu à vie pour préserver le patient de la survenance de symptômes, surtout ceux associés au comportement (Scriver et Kaufman 2008).

Le traitement actuel est donc techniquement efficace, mais a comme limite la compliance au long cours des patients. Des traitements alternatifs sont en cours d'évaluation. Ils visent à se substituer totalement au traitement classique par diète, ou à augmenter la tolérance journalière en Phe et donc à permettre une certaine diversification de l'alimentation. Ces traitements peuvent globalement être classés en deux axes : celui visant à mettre au point des agents pharmacologiques permettant d'augmenter l'activité d'hydroxylation de la Phe ; et l'axe de la thérapie cellulaire et/ou génique ayant pour but une expression durable d'une enzyme PAH fonctionnelle (voir plus loin).

1.2 Atteintes neurologiques liées à la phénylcétonurie

1.2.1 La myéline

La myéline est un composant essentiel de la substance blanche du système nerveux central (SNC). C'est la structure membranaire la plus abondante du système nerveux chez les vertébrés et elle représente 70% du poids sec du SNC des mammifères. Elle est composée de lipides et de protéines organisés en structure lamellaire enroulée et compactée autour d'un axone (figure 7). Plusieurs tronçons de gaines de myéline se suivent sur un même axone et ces portions sont séparées par un espace appelé nœud de Ranvier au niveau duquel l'axone est à nu. La gaine de myéline est responsable de la conduction nerveuse rapide de type saltatoire caractéristique des vertébrés. De par sa richesse en lipide et sa pauvreté en eau, elle agit en tant qu'isolant électrique afin de limiter les fuites de charges durant la conduction de l'influx. Cette isolation permet une propagation du signal très rapide entre nœuds de Ranvier, d'où le terme saltatoire. Grâce à ce mécanisme, la vitesse de l'influx nerveux est augmentée d'un facteur 20 à diamètre axonal équivalent et peut atteindre 20 m par seconde (figure 8).

Les gaines de myéline sont produites par enroulement d'une projection membranaire provenant de deux types cellulaires hautement spécialisés. Dans le système nerveux périphérique, ces gaines sont formées par les cellules de Schwann, capables de synthétiser une gaine par cellule. Dans le système nerveux central cette structure est réalisée par les oligodendrocytes qui eux peuvent former jusqu'à 50 gaines de myéline par cellule. Cette caractéristique est à mettre en perspective avec la complexité croissante du système nerveux central des vertébrés nécessitant une optimisation de l'encombrement structurel (Baumann et Pham-Dinh 2001).

1.2.2 Myélinisation du SNC

La formation des gaines de myéline nécessite la migration des oligodendrocytes vers les axones à myéliniser. Les oligodendrocytes émettent une projection membranaire qui interagit avec l'axone. Le processus de formation d'une gaine commence par l'enroulement de la projection membranaire autour de l'axone. Une lèvre de myéline passe sous les couches pré-établies pour former la structure spiralée caractéristique de la gaine. L'espace extracellulaire existant entre les membranes plasmiques (ligne (intra)périodique) puis l'espace intracellulaire (ligne dense majeure) font l'objet d'une compaction.

Chez l'humain, le pic de myélinisation du SNC apparaît durant la première année postnatale. Ce processus continue jusqu'à un âge d'approximativement 20 ans dans le cortex et plus particulièrement dans les zones associatives (figure 9). La formation des gaines de myéline est l'objet d'une régulation précise dans le temps et dans l'espace. Cette régulation fait intervenir des mécanismes complexes de signalisation. Une fois formées, les gaines de myéline ne sont normalement pas l'objet de remaniements extensifs.

1.2.3 Composition de la myéline

Les lipides représentent 70% du poids sec de la myéline. Ceux-ci ne sont pas spécifiques de cette structure et peuvent être retrouvés dans d'autres formations membranaires, cependant dans des proportions différentes. La myéline contient du cholestérol, des phospholipides et des glycolipides en des proportions de 4:3:2 respectivement, faisant donc la part belle au cholestérol. Une caractéristique majeure de la myéline est sa richesse en une catégorie de glycolipides, les glycosphingolipides et plus particulièrement en galactosylcéramides (GalC).

Les protéines comptent quant à elles pour 30% du poids sec de la myéline. Celles-ci sont pour la plupart spécifiques de la myéline. Deux familles de protéines représentent 80% de la fraction protéique de la myéline du SNC. La famille MBP (Myelin Basic Protein) est constituée d'isoformes de poids moléculaires différents issues de variants d'épissage alternatif d'un même gène. Les isoformes majeures chez l'humain adulte ont un poids de 18,5 et 17,2 kDa et constituent 95% des protéines MBP. Cette famille de protéines joue un rôle important dans la compaction des couches de la myéline dans le SNC. La lignée murine shiverer présente une large délétion du gène codant la MBP et présente un déficit de compaction de la myéline au niveau de la ligne dense majeure. La famille PLP (ProteoLipid Protein) est présente sous forme de complexes lipide-protéine. Les isoformes majeures sont nommées PLP et DM-20, sont codées par le même gène et diffèrent par épissage alternatif. Leur rôle est de

stabiliser les couches de membrane plasmique après compaction de la myéline. Sans ces deux protéines les gaines de myéline présentent une compaction de la ligne intrapériodique et une stabilité réduite, ainsi que des renflements axonaux suivi d'une dégénérescence axonale.

1.2.4 L'oligodendrocyte

Les précurseurs des oligodendrocytes proviennent des cellules neuroépithéliales des zones ventriculaires et apparaissent tôt durant la vie embryonnaire. La lignée oligodendrocytaire prolifère principalement durant le début de la phase postnatale. Pour le cerveau, cette expansion a lieu principalement dans la zone sous ventriculaire dorso latérale à partir d'une population de progéniteurs. Une grande partie des OPC (oligodendrocyte precursor cell) générés va ensuite migrer à travers le cerveau pour atteindre leur site fonctionnel où ils pourront se différencier en oligodendrocytes matures.

Les phases de prolifération et différenciation ne sont donc pas concomitantes. Le pic de prolifération des OPC précède distinctement leur différenciation (figure 10).

La lignée oligodendrocytaire exprime le marqueur Olig2 à partir du stade OPC. Les OPC expriment spécifiquement le marqueur NG2. Ces cellules prolifèrent *in vitro* en réponse aux facteurs de croissance PDGF. Une fois arrivés à leur site fonctionnel, les OPC s'associent à des fibres nerveuses et commencent le processus de différenciation vers le stade pré-oligodendrocyte. Cette étape est caractérisée par l'expression du marqueur O4 et la perte de prolifération en réponse au PDGF. L'oligodendrocyte devient oligodendrocyte immature avec l'apparition du marqueur GalC. Son évolution vers le stade mature passe par l'expression de composants de la myéline tels que MBP et PLP (Baumann et Pham-Dinh 2001).

1.2.5 Bases de l'investigation

Les principaux symptômes de la phénylcétonurie sont neurologiques, le plus remarquable étant un retard mental prononcé (QI moyen de 35). L'investigation anatomopathologique et clinique du système nerveux central de patients phénylcétonuriques non traités a montré par coloration différentielle des lipides ou par imagerie par résonance magnétique (MRI) que certaines zones de la substance blanche sont lésées (Shefer et al. 2000). Parmi ces zones on retrouve principalement des régions faisant partie du prosencéphale comme le corps calleux, le striatum et la substance blanche sous-corticale (Dyer et al. 1996). Il est à souligner que le retard mental dont souffrent les individus touchés de phénylcétonurie est irréversible. Le rôle du déficit en substance blanche dans cette atteinte mentale reste incertain, des auteurs incriminant plutôt une arborisation dendritique défailante des

neurones corticaux comme étant la cause la plus probable (Huttenlocher 2000). Cependant la caractérisation fine de cette arborisation reste difficile à réaliser.

Le lien exact entre le déficit métabolique et le retard mental reste à découvrir. Dans la PCU, il n'y a pas de métabolites anormaux, seulement des métabolites normaux en concentrations anormales (Scriver et Kaufman 2008). La phénylalanine elle-même est probablement l'acteur principal (Ramus et al. 1993), ses métabolites étant suspectés d'être présents en trop faible quantité pour être toxiques (Sarkissian et al. 2000). Il a été remarqué chez des patients PCU traités qu'après l'induction d'une hyperphénylalaninémie plasmatique supérieure à 1300 μM , les fonctions cérébrales étaient perturbées (Epstein et al. 1989; Krause et al. 1986; Krause et al. 1985). Cependant cette valeur est à prendre en compte en tant que seuil en cas d'exposition transitoire. Des lésions de la substance blanche ont été mises en évidence chez des patients atteints de PCU traités ayant une concentration plasmatique en Phe moyenne inférieure à 600 μM (Bick et al. 1991) et la distribution du QI des patients sous traitement est sous la moyenne malgré une concentration en Phe plasmatique inférieure à 300 μM (Michel et al. 1990).

Ceci est à mettre en perspective avec le traitement consistant en une diète alimentaire. Une augmentation soudaine et élevée de la concentration en Phe plasmatique due à un écart ponctuel au traitement engendrerait des troubles neurologiques transitoires. Une déviation plus faible mais chronique du taux de Phe pourrait avoir comme conséquence une toxicité cérébrale irréversible, ce qui souligne l'importance d'un suivi journalier de la diète.

Trois hypothèses majeures tentent d'expliquer le mécanisme par lequel l'hyperphénylalaninémie cause l'atteinte cérébrale.

1.2.5.1 Déficit en tyrosine

Le déficit complet d'activité de la PAH engendre une incapacité à générer de la tyrosine (Tyr) à partir de phénylalanine (Phe). La tyrosine devient donc un acide aminé essentiel. Dans cette hypothèse, le fœtus et le nouveau né ne peuvent générer assez de Tyr à partir de leur stock de Phe pour leur propre besoin. De plus la mère de par son statut hétérozygote ne peut fournir à son foetus une quantité suffisante de Tyr (Bessman et al. 1978).

Actuellement, de nombreuses observations tendent à réfuter cette théorie. En effet il a été montré qu'un supplément en tyrosine par voie orale, couplé ou non à un traitement classique alimentaire, n'améliore pas les paramètres neurologiques (Batshaw et al. 1981; Pietz et al. 1995; Smith et al. 1998).

Aucun déficit en Tyr n'a été trouvé dans des échantillons de sang de cordon de nouveaux nés atteints de PCU (Scriver et al. 1980), et le taux plasmatique des patients PCU adultes non traités ne présente pas de pénurie en Tyr (Koepp 1977). Cette hypothèse voudrait que la mise sous diète alimentaire pauvre en Phe seule ne prévienne pas les symptômes neurologiques, alors que dans les faits l'efficacité de ce traitement se vérifie largement.

1.2.5.2 Le transport des grands acides aminés neutres

Le passage des grands acides aminés neutres au travers la barrière hémato-encéphalique nécessite l'intervention d'un même transporteur, nommé LAT1. Cette famille d'acides aminés est composée de la phénylalanine, la tyrosine, le tryptophane, la valine, l'isoleucine, la leucine, la thréonine, la méthionine et l'histidine. LAT1 est fortement et spécifiquement exprimé par l'endothélium de la barrière hémato-encéphalique, ainsi son transcrite n'est pas retrouvé dans le foie, le poumon, le rein et le cœur (Boado et al. 1999). Il a été montré *in vivo* qu'il existe une compétition entre les grands acides aminés neutres au niveau du transporteur LAT1 et que cette molécule a une affinité particulièrement élevée pour la Phe (Momma et al. 1987). Dans le contexte de la PCU, une compétition due à un taux plasmatique élevé en Phe s'installe, défavorisant le transport des autres acides aminés (figure 11) (Knudsen et al. 1995; Koepp et al. 1990; Scriver et Kaufman 2008). Il a été estimé qu'un taux en Phe plasmatique entre 200 et 500 μM est suffisant pour l'apparition de ce phénomène (Pardridge 1998).

Il existe aussi d'autres sites de compétition entre la Phe et d'autres acides aminés. Au niveau des membranes des vésicules synaptosomales, la Phe inhibe le transport de la tyrosine (Aragon et al. 1982) et du tryptophane (Herrero et al. 1983). Ce mécanisme pourrait entraîner une diminution de la synthèse des neurotransmetteurs catécholamines et sérotonine à partir respectivement de la L-dopa et le 5-hydroxytryptophane, eux-mêmes issus de l'hydroxylation de la Tyr et du Trp. Une diminution cérébrale en catécholamines et sérotonine a d'ailleurs été vérifiée dans le modèle murin de PCU $\text{Pah}^{\text{enu2}}/\text{J}$ (Puglisi-Allegra et al. 2000).

En lumière de cette compétition, on peut imaginer renverser celle-ci en faveur du patient en augmentant la concentration sanguine des grands acides aminés neutres, à l'exception de la Phe (Andersen et Avins 1976). Cette stratégie montre que si l'on double par complément alimentaire la concentration plasmatique de ces acides aminés, le taux de Phe retrouvé dans le liquide céphalo-rachidien mais aussi dans le plasma baisse (Berry et al. 1982) et une amélioration des tests neurologiques est observée (Jordan et al. 1985). Cette diminution du taux plasmatique en Phe est à

mettre sur le compte d'une absorption diminuée de la Phe au niveau du tractus digestif, une fois encore par compétition (Matalon et al. 2007; Schindeler et al. 2007).

1.2.5.3 Perturbations neurobiologiques

La PCU est depuis très longtemps associée à une diminution de coloration des lipides en certaines zones du système nerveux central (SNC) comme le corps calleux, le striatum et la zone sous corticale (Joseph et Dyer 2003). La composante lipidique majeure du système nerveux est la myéline. Un déficit de synthèse des gaines de myéline dans le SNC est donc étroitement associé à la PCU et ce principalement chez les formes non-traitées de PCU (Scriver et Kaufman 2008). Des études récentes ont cependant démontré grâce à l'imagerie par résonance magnétique que des anomalies de la substance blanche sont bien plus courantes que précédemment suspecté. Il s'est avéré que des patients correctement traités pour la PCU et des personnes souffrant d'hyperphénylalaninémie modérée sont porteuses de telles lésions alors que ces types de personne ne sont théoriquement pas censés développer de lésions cérébrales (Shaw et al. 1991; Thompson et al. 1991; Ullrich et al. 1994). Une corrélation entre le taux plasmatique en Phe et l'ampleur des lésions de la substance blanche a cependant pu être démontrée (Dyer et al. 2000). De même, l'atteinte à l'intelligence associée à la PCU semble liée à l'importance du déficit de myélinisation (Huttenlocher 2000; Rocha et Martel 2009). Aucune étude n'a permis à ce jour de découvrir la cause directe de ce déficit. Différentes hypothèses existent cependant :

- 1) L'utilisation du modèle murin de PCU, la lignée Pah^{enu2}/J, a permis une étude plus fine de la pathologie. Chez ce modèle, il a été quantifié par microscopie électronique que 50% des axones du corps calleux ne sont pas entourés d'une gaine de myéline (Shefer et al. 2000). Dyer a démontré *in vitro* qu'en conséquence à l'exposition à des quantités élevées de Phe les oligodendrocytes adoptent un phénotype non myélinisant et exprimant la GFAP (*glial fibrillary acid protein*) qui est normalement caractéristique de la lignée astrocytaire (Dyer et al. 1996). Il apparaît qu'en de telles conditions l'expression de l'enzyme HMGR serait diminuée dans le prosencéphale (cerveau, thalamus, système limbique) et non dans le rombencéphale (cervelet, pont, bulbe rachidien) (Shefer et al. 2000). Cette enzyme catalyse l'étape limitante de la synthèse du cholestérol. D'autre part il a été découvert que la synthèse protéique dans le SNC de patients PCU était perturbée par l'élévation de la concentration en Phe (Paans et al. 1996; Smith et Kang 2000). Comme la myéline contient de grandes quantités de cholestérol et de protéines, un déficit de production de ces deux composants entrainerait une diminution de la myélinisation.

- 2) Chez les vertébrés, la prolifération et la maturation des oligodendrocytes, cellules synthétisant les gaines de myéline dans le SNC, a lieu après la naissance (Baumann et Pham-Dinh 2001; Miller 2002). La phase de prolifération précède la maturation et a pour but de générer une population de cellules qui migrera et se différenciera par la suite (figure 10). L'élévation du taux plasmatique de Phe est elle aussi post natale, puisqu'elle débute dès l'indépendance métabolique de l'individu. Les premiers jours de vie sont critiques pour le succès d'un traitement de la PCU, quelque soit sa qualité par la suite (Scriver et Kaufman 2008). Cette corrélation entre précocité d'instauration et qualité du résultat du traitement quant aux paramètres cognitifs suggère que la Phe interfère avec le développement de la lignée oligodendrocytaire. Un effet cytotoxique de la Phe et de deux de ses métabolites, le phénylpyruvate (PP) et le phénylacétate (PA), sur la lignée oligodendrocytaire a été suggéré (Kaufman 1989). Cependant une étude plus récente tend à montrer que ces deux métabolites seraient présents en concentration trop faible pour exercer cet effet (Sarkissian et al. 2000). Il a de plus été démontré *in vivo* dans le modèle Pah^{enu2}/J que le nombre d'oligodendrocytes dans le corps calleux ne diffère pas entre animaux adultes double mutants et sauvages (Shefer et al. 2000). Un effet dérégulateur plutôt que cytotoxique serait donc à chercher.

1.3 L'avenir du traitement de la PCU

1.3.1 La problématique du traitement actuel de la PCU

La diète alimentaire constituant le traitement de référence actuel de la PCU a pour but de contrôler l'entrée de Phe dans l'organisme afin de normaliser la concentration plasmatique libre de cet acide aminé. Sur le plan conceptuel cette approche est simple et logique en permettant d'éviter l'agent inducteur de la pathologie. En pratique il est incontestable que cette manière de traiter la PCU permet de limiter voire d'éviter l'effet désastreux de cette maladie sur le système nerveux central. Cependant la diète est un traitement lourd, de faible qualité gustative et nécessite beaucoup de discipline pour être mise en œuvre de manière optimale. Il n'est pas rare que des patients s'éloignent des recommandations. Les effets néfastes de la PCU tendent alors à se manifester. Actuellement, la plupart des centres recommandent de poursuivre le traitement de la naissance jusqu'aux environs de vingt ans. Cependant un lien a pu être mis en évidence entre des troubles d'ordre psychologique et l'arrêt du traitement à l'âge adulte (Scriver et Kaufman 2008). Un problème majeur est aussi la phénylcétonurie maternelle qui provoque systématiquement un effet tératogène fœtal (Harding 2008). Pour éviter cette conséquence, les mères doivent parfaitement maîtriser leur apport alimentaire en Phe avant et pendant toute la durée de leur grossesse. Pour ces raisons, les recommandations thérapeutiques tendent à évoluer vers un traitement par diète à vie.

De ces observations découle une volonté de proposer d'autres moyens de traiter la PCU. Des solutions alternatives sont en cours d'investigation comme la thérapie génique, l'apport d'acides aminés neutres ou l'administration d'ammonium lyase (figure 12) (van Spronsen et Enns 2010). La voie décrite ici sera celle d'une thérapie cellulaire doublée d'une thérapie génique.

1.3.2 La thérapie cellulaire pour les maladies métaboliques hépatiques

Les maladies métaboliques d'origine hépatique atteignent un nouveau né pour 900. Leur traitement est très souvent complexe car fréquemment constitué d'un régime alimentaire spécifique et contraignant. La qualité de vie de l'individu atteint et de sa famille peut être pauvre en raison de sévères restrictions. Le patient peut développer de l'anorexie et souffrir d'isolement social. Même si toutes ces pathologies ne remettent pas en cause le pronostic vital du patient, les effets sur la qualité de vie justifient la candidature pour la transplantation hépatique (Sokal 2006). La greffe orthotopique du foie s'est déjà révélée efficace pour corriger complètement la PCU, même si ce n'était pas l'indication primaire de ce geste (Vajro et al. 1993). La procédure s'avère viable au long terme pour plus de 90% des enfants ayant subi une greffe d'organe pour corriger un phénotype métabolique déficient

(Sokal 2006). Cependant la procédure est lourde et le foie transplanté peut dégénérer jusqu'à la fibrose. Les praticiens sont donc réticents à utiliser une telle méthode dans le cas de maladies non létales. Il existe de plus une pénurie d'organe, si bien que dans le cadre de la greffe hépatique au sens large, 15% des patients décèdent durant l'attente d'un foie compatible (Smets et al. 2008).

C'est dans cette conjoncture que la thérapie cellulaire de maladies métaboliques d'origine hépatique a été envisagée. Cette technique est actuellement utilisée en clinique en transplantation d'hépatocytes allogéniques. Cette méthode montre des résultats probants à moyen terme, le bénéfice métabolique pouvant être observé jusqu'à 26 mois après greffe cellulaire. L'avantage par rapport à la transplantation hépatique orthotopique est d'utiliser moins de matériel biologique (la greffe représente 5 à 10% du poids du foie du receveur) et d'être moins invasive et totalement réversible par levée du traitement immunosuppresseur (Strom et al. 1999). Elle est donc principalement indiquée dans le cas de pathologies hépatiques métaboliques au long cours n'altérant que peu l'organe en lui-même mais ayant des répercussions systémiques. Un traitement immunosuppresseur est cependant nécessaire afin d'éviter le rejet des cellules greffées et le bénéfice au long terme est incertain. Pour ces raisons, d'autres candidats cellulaires sont investigués comme les cellules souches mésenchymateuses (CSM) (Lysy et al. 2008b). Les bénéfices attendus de l'utilisation des CSM est une correction métabolique au long terme et la possibilité de manipuler génétiquement ces cellules afin d'utiliser du matériel provenant du patient lui-même.

Quelque soit le type cellulaire, il semble incontournable de fournir aux cellules administrées un avantage sélectif sur les hépatocytes indigènes du patient pour espérer une repopulation conséquente du foie par les cellules exogènes et leur descendance. L'infusion d'hépatocytes dans un foie sain ne génère qu'approximativement 0,5 à 1% d'implantation (Ponder et al. 1991). Le foie est un organe capable d'un fort potentiel régénératif en cas de lésion. Lors d'une hépatectomie partielle, le fragment de foie restant sera le siège d'une importante prolifération qui à terme permettra bien souvent la régénération totale de l'organe. En sus de l'hépatectomie partielle, l'irradiation ou l'administration d'agents chimiques peuvent provoquer une lésion et bloquer la prolifération des cellules résidentes du foie, ce qui procure un avantage prolifératoire pour les cellules ensuite administrées (Harding 2008). Un exemple est fourni par un modèle de traitement de la tyrosinémie de type 1, causée par une déficience en fumarylacétoacétyl-CoA hydrolase (FAH). Cette pathologie engendre une lésion hépatocytaire importante. En cas de transplantation d'hépatocytes sauvages chez un modèle murin déficient en FAH, 90% du parenchyme hépatique se trouve constitué de cellules FAH-compétentes deux mois après transplantation (Overturf et al. 1996). Ce modèle bénéficie d'un avantage sélectif

durable des cellules administrées sur les cellules résidentes, et montre l'importance de ce paramètre quant à la réussite d'un traitement par thérapie cellulaire d'une affection génétique d'origine hépatique.

1.3.2.1 Les cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches adultes constituent un groupe cellulaire particulier ayant un fort potentiel de renouvellement et capable de multipotence. La multipotence est le pouvoir de se différencier en plusieurs types cellulaires. Elle est à distinguer de la totipotence qui est la capacité qu'ont les cellules souches embryonnaires de pouvoir reconstituer un individu complet. Les cellules souches adultes les plus connues chez l'humain sont de type hématopoïétique et ont pour vocation le renouvellement des cellules sanguines. Cependant des cellules souches existent dans de nombreux types de tissus. Il est possible d'isoler à partir de la moelle osseuse un autre type de cellules souches adultes, les cellules souches mésenchymateuses (CSM). Celles-ci peuvent donner naissance aux composants conjonctifs du squelette comme l'os, le cartilage et le stroma médullaire (Liu et al. 2009). Il a cependant été montré que ces cellules peuvent aussi être isolées à partir de nombreux autres tissus (Chen et al. 2009; Liu et al. 2009; Meirelles Lda et al. 2009) et se différencier en des cellules présentant des caractéristiques du type musculaire, endothélial, neural et hépatocytaire (Jiang et al. 2002; Lysy et al. 2008a; Sgodda et al. 2007). Il a été démontré que les CSM peuvent s'implanter dans le foie et exprimer de manière durable des marqueurs de différenciation hépatique (Aurich et al. 2009; Aurich et al. 2007; Sato et al. 2005; Seo et al. 2005; Sgodda et al. 2007). Les CSM ont la capacité de s'arrêter aux sites de lésion tissulaire (Karp et Leng Teo 2009) et de sécréter des facteurs paracrines trophiques, immunomodulateurs et chémo-attractants afin de favoriser la régénération tissulaire (Meirelles Lda et al. 2009). Les CSM sont cependant à considérer comme une population cellulaire plutôt qu'un type cellulaire. En effet il a été démontré que les isollements de CSM sont constitués de cultures mosaïques contenant différents clones cellulaires aux capacités différenciatoires non équivalentes (Muraglia et al. 2000). De plus, les marqueurs dédiés à la caractérisation des CSM ne sont pas encore complètement définis et actuellement il n'existe aucun marqueur absolument spécifique des CSM. Ces cellules sont donc caractérisées chez l'humain par un profil d'expression qui selon de nombreux auteurs doit être négatif pour CD45, CD11b et CD34, positif pour CD106, Sca-1 et CD90 (Kolf et al. 2007; Liu et al. 2009). Il est de plus suspecté que le milieu de culture utilisé *in vitro* pour l'isolement conditionne l'expression de ces marqueurs (Meirelles Lda et al. 2009). Ce manque de caractérisation est un obstacle à l'identification *in vivo* de la localisation anatomique et du rôle physiologique des CSM.

Différents rapports montrent cependant que les CSM seraient associées *in vivo* aux vaisseaux sanguins et seraient plus particulièrement des péricytes (Bianco et al. 2001; Chen et al. 2009; Crisan et al. 2008; Fleming et al. 1998; Shi et Gronthos 2003). En effet il est possible d'isoler des CSM à partir de nombreux tissus et il existe une corrélation entre la densité de fibroblastes formant des colonies (CFU-F) et celle de la vascularisation du tissu d'origine (da Silva Meirelles et al. 2009). De plus les péricytes partagent des caractéristiques communes avec les CSM comme la capacité de différenciation en adipocytes, chondrocytes et ostéocytes (Arthur et al. 2009).

La capacité des CSM de s'arrêter aux sites de lésion tissulaire et d'y sécréter des facteurs paracrines anti-apoptotiques et trophiques suggèrent que cette catégorie cellulaire joue physiologiquement un rôle de support lors de lésions aiguës. De nombreuses expériences *in vitro* et *in vivo* démontrent l'importance de ce phénomène (Parekkadan et al. 2007; Rehman et al. 2004; Togel et al. 2007). D'autres facteurs sécrétés ont des capacités immunomodulatrices. Cette faculté jouerait aussi un rôle dans la réparation tissulaire suite à une lésion ponctuelle. Au sein du tissu, la conséquence directe d'une lésion est une mort cellulaire locale. Des cellules inflammatoires migrent vers le site et les péricytes adjacents sont activés. Ils sécrètent divers facteurs qui agissent de concert en vue de régénérer la zone. Dans un premier temps, les péricytes expriment diverses molécules pro-inflammatoires chémo-attractantes afin de stimuler la réponse immunitaire au site de lésion. Durant le processus de réparation, le profil d'expression des péricytes change et ces cellules évoluent vers un état proche des CSM. Durant cette phase, les facteurs exprimés auraient un effet principalement inhibiteur de l'immunité afin de prévenir l'apparition de phénomènes auto-immuns (Meirelles Lda et al. 2009).

Compte tenu de ces caractéristiques, les CSM ont connu un véritable essor dans les projets de recherche touchant la médecine régénérative, la thérapie cellulaire et génique.

1.3.3 Le principe de la thérapie génique

La thérapie génique consiste en la modification du patrimoine génétique de cellules somatiques dans un but thérapeutique. La modification du génome cellulaire vise à l'introduction d'un allèle fonctionnel pour compléter ou remplacer la version mutante défective présente naturellement chez l'hôte. Le transfert génétique est réalisé via un vecteur qui est chargé de faire pénétrer la séquence d'ADN thérapeutique dans les cellules hôtes. Ces vecteurs peuvent être de deux types : viraux comme les rétrovirus et adénovirus, ou non viraux comme les polycations, les nanoparticules et les méthodes physiques. Nous décrirons ici la famille des rétrovirus et plus particulièrement la sous-catégorie des lentivirus.

1.3.3.1 Les lentivirus, une sous famille des rétrovirus

Les vecteurs rétroviraux sont largement utilisés en laboratoire car ils ont la capacité d'insérer leur séquence génétique dans le génome d'une cellule cible et d'engendrer l'expression durable d'un transgène. Ces applications touchent aussi bien l'expérimentation purement *in vitro* que l'*in vivo* avec pour exemple la thérapie génique. Les rétrovirus ont la particularité de véhiculer leur séquence génétique sous forme d'ARN. Lors de l'infection d'une cellule par un rétrovirus, cet ARN doit être rétrotranscrit en ADN pour finalement être inséré stablement au sein du bagage génétique de la cellule hôte. Cette séquence génétique insérée porte le nom de provirus. A l'état sauvage, ce provirus contient toute l'information nécessaire à la synthèse de nouvelles particules virales afin de continuer le cycle infectieux. Après infection d'une première cellule, celle-ci synthétisera d'autres particules virales en utilisant l'information contenue dans le provirus et ainsi de suite (figure13).

Les lentivirus sont une sous famille des rétrovirus, dont le membre le plus étudié est le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) causant le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Les lentivirus ont la particularité de pouvoir infecter des cellules quiescentes, ce qui en fait un sous groupe de choix pour l'élaboration de vecteurs en thérapie génique (Pluta et Kacprzak 2009).

Les vecteurs viraux utilisés en thérapie génique sont des versions profondément modifiées des virus sauvages afin de garantir la biosécurité et de permettre le transport de transgènes. L'information contenue dans le provirus naturel a été profondément modifiée par la suppression de séquences codant des protéines auxiliaires et accessoires associées à la cytotoxicité virale (Vif, Vpr, Vpu, Nef, Tat) et par sa segmentation sur plusieurs plasmides distincts. Ces opérations ont pour but de maîtriser le cycle de réplication virale et de créer de l'espace au sein du provirus en vue d'y insérer l'information que le vecteur devra véhiculer (figure 13). Les protéines de surface naturelles de HIV, GP120 et GP41, sont très souvent remplacées par la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculaire (VSVG) afin d'accroître le tropisme viral (Pluta et Kacprzak 2009). Au moment de la production des particules virales recombinantes, les différents plasmides sont rassemblés au sein des cellules productrices. A cette conjoncture précise, toute l'information contenue dans le provirus naturel est présente dans les cellules productrices, quoique physiquement fragmentée en différents blocs. La synthèse de particules virales peut commencer. Lors de l'encapsidation du matériel génétique, seule la séquence identifiée comme provirale par le signal Psi est incluse. Ce provirus modifié contient le matériel génétique à véhiculer, les gènes thérapeutiques dans le cas de la thérapie génique. Les particules générées sont dites défectives car elles sont incapables d'initier un cycle infectieux. Au contact de la cellule hôte, le virus défectif pourra transférer son matériel génétique mais comme celui-ci ne contient pas

l'information nécessaire à la synthèse de nouvelles particules, le cycle s'arrête (figure 14). Il existe cependant un risque qu'une recombinaison entre séquences virales fragmentées sur les différents plasmides s'opère lors de la production du vecteur pour régénérer des particules compétentes pour la réplication. Il est à noter que ce phénomène n'a encore jamais été rapporté pour les vecteur lentiviraux (Pauwels et al. 2009).

Un autre effet secondaire connu des vecteurs rétroviraux est le risque de cancérogenèse par mutation insertionnelle. Les rétrovirus intègrent préférentiellement leur génome dans des zones où l'ADN est transcriptionnellement actif, perturbant potentiellement l'expression de (proto-)oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeur par dérégulation de leur expression ou par perte d'hétérozygotie. Un exemple est l'activation insertionnelle du gène LMO2, un proto-oncogène. Il a été démontré que cette activation a contribué à la leucémie développée par cinq patients de deux études cliniques indépendantes de traitement par thérapie génique de la déficience sévère de l'immunité liée à l'X (Hacein-Bey-Abina et al. 2008; Hacein-Bey-Abina et al. 2003; Howe et al. 2008). Cet effet est dû à une transactivation accrue du gène LMO2 par l'enhancer contenu dans les LTR du gamma-rétrovirus utilisé pour ces deux études cliniques. Les sites d'insertion du génome proviral des rétrovirus et lentivirus ont été comparés. Les résultats montrent que les rétrovirus classiques représentent une menace de mutation insertionnelle plus grande que la sous famille des lentivirus. En effet les rétrovirus ont une propension élevée à s'intégrer dans des régions du génome riches en proto-oncogènes et gènes contrôlant la croissance cellulaire (Cattoglio et al. 2007). Le problème de mutation insertionnelle par les rétrovirus est au centre des débats et des versions de vecteurs lentiviraux de type auto-inactivant (SIN ou Self Inactivating Vector) ont été développées. Elles présentent des séquences LTR amputées des éléments *enhancer* et promoteur afin de minimiser de 90% leur effet transactivateur. Il faut dès lors intégrer un promoteur interne à la construction pour piloter l'expression de la cassette transgénique. Même si ce promoteur interne peut lui aussi influencer l'expression de gènes aux alentours du site d'insertion du provirus, il a été démontré que les promoteurs cellulaires représentent une menace moindre comparés aux promoteurs rétroviraux (Modlich et al. 2006; Montini et al. 2006; Zychlinski et al. 2008). Il est cependant possible d'entourer la cassette d'expression par des séquences chromatinienne isolantes afin de minimiser l'impact résiduel d'un promoteur interne. Ces éléments isolants provenant du locus de la β -globine de poulet (séquence CHS4) sont capables de diminuer les interférences transcriptionnelles de la cassette d'expression vers l'extérieur et vice versa (Aker et al. 2007; Chung et al. 1993). Il a été démontré que l'utilisation de telles séquences permet une expression

prolongée du transgène (Arumugam et al. 2007) et une expression plus ciblée dans le cadre de l'utilisation de promoteurs tissus-spécifiques (Pluta et al. 2005; Vieyra et Goodell 2007).

1.3.4 Thérapie génique de la PCU

Les premiers essais de modèles de thérapie génique de la PCU ont utilisé un vecteur adénoviral pour transférer l'ADNc humain dans le parenchyme hépatique d'un modèle murin de PCU (Cristiano et al. 1993; Fang et al. 1994). Les résultats furent concluants mais transitoires. D'autres essais utilisant des vecteurs rétroviraux et adénoviraux montrèrent une faible capacité de transduction *in vivo* pour les uns et un transfert génétique efficace mais un bénéfice transitoire pour les autres. Cet effet transitoire retrouvé avec les vecteurs adénoviraux est dû au caractère épigénétique du matériel génétique transféré ainsi qu'à la puissante réponse immunitaire de l'hôte à l'égard de ce type de virus, tendant à éliminer les cellules transduites. En raison de cette même réponse immunitaire, toute administration subséquente de vecteur adénoviral est inefficace, voir dangereuse (Eisensmith et Woo 1996).

L'utilisation de vecteurs recombinants adéno-associés (rAAV), permet d'exploiter leur tropisme organe-dépendant tout en réduisant l'ampleur de la réaction immunitaire (Thony 2010). Les rAAV de sérotype 5 et 8 sont particulièrement efficaces pour délivrer des transgènes dans le foie, comme le prouvent plusieurs études de correction de la PCU par ce type de vecteur (Ding et al. 2006; Harding et al. 2006). La correction métabolique se montre effective à moyen voire à long terme chez le modèle murin de PCU (Thony 2010). Cependant, 6 mois à un an après administration du vecteur, le niveau de Phe plasmatique libre a augmenté chez les animaux traités. Cette augmentation est corrélée avec une diminution du nombre de génomes viraux et de l'expression de la PAH dans le foie (Harding 2008). Les rAAV ont une très faible capacité d'intégrer stablement leur matériel génétique dans le génome cellulaire et il a été montré que la réponse immunitaire de l'hôte peut être responsable de l'élimination des cellules transduites (High et al. 2004). Toute nouvelle administration de vecteur est de plus impossible en raison des anticorps neutralisants à l'encontre du rAAV développés par l'hôte.

Une équipe a pu obtenir une correction non permanente du phénotype du modèle murin de PCU par instauration d'activité PAH dans le muscle strié via rAAV (Ding et al. 2008). Comme la grande majorité des tissus, le muscle strié n'exprime pas les enzymes impliquées dans le cycle de régénération du cofacteur de la PAH, le BH4. Il a donc fallu générer l'expression des enzymes nécessaires au recyclage du BH4. La raison d'investiguer le transfert génétique par rAAV dans le muscle strié est son accessibilité et la stabilité de l'expression de cassettes d'expression épigénétiques au cours du temps en raison de la longue durée de vie des cellules composant le tissu musculaire. La méthode pourrait être viable s'il

était possible d'administrer à intervalle régulier une nouvelle dose de rAAV. Cela est cependant impossible en raison de la réponse immunitaire de l'hôte.

Les résultats les plus prometteurs ont été produits par transfection hydrodynamique d'un plasmide contenant l'ADNc de la PAH et celui du système d'intégration du bactériophage phiBT1. Ce système permet l'intégration de manière site-spécifique de la séquence codant la PAH dans le génome d'hépatocytes d'animaux PCU. La relativement faible efficacité de complémentation génétique a été contrebalancée par la possibilité de réaliser jusqu'à 10 administrations de plasmide par semaine et de corriger le phénotype PCU (Chen et al. 2007; Chen et Woo 2005; Chen et Woo 2007). Les investigateurs ont pu observer une correction métabolique au long terme. Cette approche est fort prometteuse mais non transférable à l'humain pour l'instant en raison de la méthodologie de transfert hydrodynamique qui est inapplicable à l'homme (Chen et Woo 2005). Il a de plus été découvert que phiC31, une autre intégrase de bactériophage, génère des translocations inter-chromosomiques chez la souris (Held et al. 2005).

Les paramètres d'immunogénicité et d'intégration du provirus semblent cruciaux pour mener à bien une correction génétique durable. Dans cette optique, les vecteurs lentiviraux sont des instruments de choix. Les vecteurs lentiviraux peuvent transduire des hépatocytes *in vitro* (Nguyen et al. 2002; Seppen et al. 2002), et *in vivo* (Nguyen et al. 2005). Cependant leur administration *in vivo* dans la circulation sanguine permet surtout de transduire des cellules de Kupffer quand la protéine de surface choisie est la VSVG (Pfeifer et al. 2001; van Til et al. 2005). Des efforts sont réalisés afin de préciser le tropisme des vecteurs aux hépatocytes via pseudotypage avec d'autres protéines de surface (Markusic et al. 2009). La transduction *ex vivo* d'hépatocytes avant leur réimplantation permet d'obtenir de bons taux de transduction hépatocytaires tout en minimisant l'exposition d'autres types cellulaires au vecteur (Birraux et al. 2010; Nguyen et al. 2006). Il reste que la culture d'hépatocytes est une étape délicate, et la durée attendue du bénéfice limitée si l'on reprend les données obtenues via les essais de transplantation orthotopique chez l'humain (cf supra).

2 But du travail

Cette thèse de doctorat a pour thème la phénylcétonurie (PCU) selon deux versants. L'un vise à caractériser l'effet de la PCU sur la synthèse de gaines de myéline ; l'autre est constitué d'une recherche à vocation appliquée ayant pour but la mise au point d'un protocole de thérapie génique *ex vivo* de la PCU en partenariat avec les Universités de Louvain et Bruxelles.

2.1 Etude de la myélinisation

La conséquence la plus flagrante de la PCU est une atteinte mentale profonde, avec comme trait neurobiologique un déficit de synthèse des gaines de myéline (Williams et al. 2008). Ce trait n'est que partiellement expliqué et le rôle exact de la Phe dans la pathophysiologie de la PCU n'est pas encore déterminé dans la littérature (van Spronsen et al. 2009). Le but du versant neurobiologique de cette thèse de doctorat est d'analyser la lignée oligodendrocytaire afin de détecter de possibles variations de cette lignée pouvant mener à un déficit de synthèse de gaines de myéline.

Dans ce but, nous avons investigué la lignée oligodendrocytaire *in vivo* et *in vitro* via des tests morphologiques et fonctionnels. In fine, un test de myélinisation en co-cultures primaires *in vitro*, réalisée dans le laboratoire du Dr. Lubetzki, a permis de récapituler toutes les étapes de la synthèse des gaines de myéline.

Ces expériences nous ont permis de tester le plus directement possible l'effet de la Phe et de ses métabolites sur la synthèse des gaines de myéline et ainsi de répondre à une des hypothèses concernant le déficit cognitif des patients PCU.

Les résultats de cette étude ont été publiés (Schoemans et al. 2010).

2.2 Thérapie génique de la PCU

Le traitement actuel de la PCU est théoriquement satisfaisant mais dans les faits de nombreux patients s'en écartent en raison de son exigence. Parmi les voies envisagées, la thérapie génique est la seule à proposer au patient une normalisation de son métabolisme sans médication continue (van Spronsen et Enns 2010). Le versant thérapie génique de cette thèse de doctorat propose un traitement de la PCU par autogreffe de cellules génétiquement modifiées, dans le but de restaurer un degré thérapeutique d'hydroxylation de la Phe. Ce projet est une évolution de la greffe cellulaire orthotopique déjà pratiquée pour certaines maladies hépatique. Ce type de traitement se montre efficace à moyen terme quand les cellules greffées sont des hépatocytes (Smets et al. 2008). Nous avons tenté d'en améliorer la durée en utilisant des CSM isolées à partir de moelle osseuse. Notre but était de tirer parti de la technologie des vecteurs lentiviraux pour transduire hépatocytes et CSM afin de procéder à un modèle de greffe autologue, c'est-à-dire du transfert de cellules syngéniques entre sujets de la lignée murine BTBR Pah^{enu2/J}, un modèle de PCU.

Cette thérapie de la PCU a pour but l'évaluation du procédé en vue d'ensuite élargir son application à d'autres maladies métaboliques d'origine hépatique.

Une partie des résultats de ce projet est l'objet d'une publication (Josse et al. 2010).

3 Résultats

3.1 Neurobiologie de la PCU

3.1.1 Investigations *in vivo*

Les mécanismes sous tendant le déficit neurologique chez l'individu phénylcétonurique non traité sont encore peu compris. De nombreuses hypothèses ont été formulées mais peu d'entre elles ont été confirmées dans des modèles animaux reflétant correctement le climat métabolique de la PCU. En effet, une grande partie de l'expérimentation *in vivo* impliquait précédemment des animaux rendus phénylcétonuriques par l'injection de Phe à intervalles réguliers. Cette manière de procéder ne peut mimer adéquatement le métabolisme phénylcétonurique car la Phe est délivrée sous forme d'importants bolus à intervalle régulier ; une situation radicalement différente de l'importante et constante hyperphénylalaninémie du phénylcétonurique. L'apparition du modèle transgénique murin BTBR Pah^{enu2/J} permet de nos jours une étude plus fine de cette pathologie. Ces souris présentent une mutation au site actif de la protéine PAH qui annule toute activité enzymatique d'hydroxylation de la Phe en Tyr (substitution en position 263 de l'acide aminé Phe pour une Ser). Cette situation est retrouvée chez la majeure partie des patients phénylcétonuriques, ce qui permet de reproduire très fidèlement le déficit métabolique inhérent à la PCU.

Nous avons investigué l'effet de la PCU sur la migration des OPC, la viabilité de la lignée oligodendrogliale et sa capacité de différenciation. Pour ce faire, nous avons mesuré chez ce modèle murin deux paramètres pouvant désigner les oligodendrocytes comme responsables du défaut de myélinisation de certaines zones du système nerveux central caractéristiques de la PCU. Nous avons étudié d'abord la prolifération des progéniteurs de ces cellules, les OPC (*Oligodendrocyte Proliferating Cells*) dans la zone sous ventriculaire du ventricule dorso latéral (ZSVDL), siège d'une prolifération intense de ces cellules en période néonatale. Les progéniteurs générés dans la ZSVDL migrent ensuite vers leur site fonctionnel pour se différencier et exercer leur fonction. Le deuxième paramètre mesuré a été la densité tissulaire en oligodendrocytes différenciés au sein du corps calleux qui est une zone faisant partie de la substance blanche particulièrement atteinte par le déficit de myélinisation chez le phénylcétonurique.

3.1.1.1 Prolifération des OPC

Cette étude est réalisée sur des animaux BTBR Pah^{enu2/J} âgés de 8 jours. C'est en effet à cet âge que les OPC prolifèrent de manière maximale chez la souris afin de générer la majeure partie de la population oligodendrocytaire du cerveau (cf figure 10). Ce mécanisme est commun à tous les mammifères et donc transposable à l'homme. Cette investigation vise à quantifier le nombre d'OPC proliférant dans la ZSVDL en comparant animaux sauvages et animaux atteints de PCU. L'étude au pic de prolifération permet d'obtenir la meilleure sensibilité.

Pour ce faire nous avons exposé pendant 24h les animaux au BrdU, un agent analogue de la thymidine s'intégrant à l'ADN durant la phase S de la réplication cellulaire. Passé ce délai les cerveaux ont été disséqués et marqués par immunohistochimie pour révéler les cellules proliférantes (BrdU+) et les cellules appartenant à la lignée oligodendrocytaire (Olig2+) au sein de la ZSVDL. Les coupes histologiques ont été analysées par microscopie à fluorescence confocale en mode Z-stack afin de pouvoir clairement distinguer chaque cellule marquée et les dénombrer. Cette investigation nous a permis de démontrer que la PCU n'altère pas la proportion d'OPC proliférante dans la ZSVDL et que par extension la taille de la population d'OPC migrants ne diffère pas (figure R 1).

3.1.1.2 Densité oligodendrocytaire au sein du corps calleux

Le corps calleux est une zone du système nerveux central regroupant de nombreuses interconnexions entre les hémisphères du cerveau. Ces connexions se veulent rapides ; dès lors une grande majorité des axones présents dans cette structure anatomique sont entourés d'une gaine de myéline. Chez les sujets PCU, le corps calleux présente moins de gaines de myéline que chez l'individu sain (figure R 2). Une étude histologique sur le modèle murin BTBR Pah^{enu2/J} a montré que seuls 50 % des axones du corps calleux sont myélinisés chez les animaux atteints de PCU (Shefer et al. 2000). Nous avons donc choisi d'investiguer la densité en oligodendrocytes matures du corps calleux afin d'évaluer si ce déficit de synthèse de myéline pouvait être imputé à un contingent oligodendrocytaire diminué, quelle qu'en soit la cause.

Nous avons étudié ce paramètre chez le modèle murin BTBR Pah^{enu2/J}. Des sujets adultes âgés de 60 jours ont été choisis pour cette investigation, afin de refléter un état où le processus de myélinisation est dans une phase de maintenance. Des coupes coronales d'animaux PCU et sains passant par le corps calleux ont été immunomarquées avec CC-1 et contre les antigènes Olig2. Olig2 est caractéristique de toute la lignée oligodendrogliale, alors que CC-1 marque les oligodendrocytes matures et certains astrocytes. Ces coupes ont ensuite été analysées à l'aide d'un microscope à fluorescence confocal en

mode Z-stack. La combinaison des deux marquages a permis le dénombrement de la population oligodendrocytaire ayant atteint la maturité. Le volume de l'échantillon analysé a pu être mesuré grâce au fonctionnement en Z-stack du microscope confocal. Nous avons pu déterminer de la sorte la densité en oligodendrocytes des corps calleux provenant des animaux sauvages et mutants. Cette étude n'a pas révélé de différence entre les deux populations, ce qui démontre que le déficit de synthèse des gaines de myéline au sein du corps calleux chez les animaux atteints de PCU n'est pas dû à une diminution du nombre d'oligodendrocytes matures présents sur le site (figure R 2). Ainsi, il est peu probable qu'un déficit migratoire des OPC ait lieu ou que la viabilité des oligodendrocytes soit altérée. En ce qui concerne l'analyse de la maturation de ces cellules, un marquage CC-1 est un premier pas. Cependant une étude plus fine est nécessaire afin de pouvoir se prononcer sur leur degré de maturation. La complexité structurelle des oligodendrocytes et des gaines qu'ils synthétisent dans leur milieu naturel ne facilite cependant pas leur caractérisation ; ce pourquoi nous avons poursuivi nos investigations par un modèle *in vitro*.

3.1.2 Investigations *in vitro*

Si les modèles animaux présentent l'avantage de refléter très fidèlement une pathologie, leur complexité empêche parfois de distinguer clairement quels sont les mécanismes menant à une atteinte pourtant bien définie. C'est le cas de l'étude de l'hypomyélinisation engendré par la PCU. Pour expliquer ce déficit, de nombreuses hypothèses ont été formulées. Cependant jusqu'à présent aucune d'entre elles n'a pu être validée comme étant la cause majeure en raison de la multitude de phénomènes parallèles en présence.

Nous avons poursuivi notre exploration de l'influence de la PCU sur la lignée oligodendrocytaire en étudiant la maturation de ces cellules et leur capacité de synthèse de gaines de myéline. Nous avons choisi d'explorer ces fonctions *in vitro* afin de disposer d'un système simple et de nous placer dans des conditions maîtrisées. Dans la littérature, trois molécules ont été souvent suspectées de jouer un rôle direct dans le déficit de myélinisation lié à la PCU. La Phe elle-même bien entendu, mais aussi deux de ses métabolites, le phénylpyruvate (PP) et le phénylacétate (PA). Nous avons choisi de tester ces trois molécules *in vitro*.

Pour étudier la fonctionnalité des oligodendrocytes, nous avons mesuré leur capacité à synthétiser des gaines de myéline quand ils sont exposés à l'un de ces trois composés. Ces gaines constituant le produit final de ce type cellulaire, leur quantification permettra de réellement refléter l'impact exclusif d'une molécule sur la fonction des oligodendrocytes. En effet, si l'une des trois substances testées

influence à une quelconque étape la différenciation ou le métabolisme cellulaire de cette lignée, le rendement de synthèse de gaines sera modifié.

3.1.2.1 Test de viabilité

Notre étude *in vivo* montre que la PCU n'engendre pas de toxicité sur la lignée oligodendrogliale. Cependant, une fois ces cellules sorties de leur milieu et placées en culture, elles peuvent s'en trouver fragilisées. Ainsi, préalablement à l'étude de la fonction oligodendrocytaire proprement dite, nous avons voulu évaluer *in vitro* la viabilité d'oligodendrocytes primaires soumis à différentes concentrations de Phe, PP et PA.

Pour ce test de viabilité, nous avons utilisé une population cellulaire enrichie en oligodendrocytes provenant du rat. En effet, la technique d'isolement est bien établie pour cette espèce, ce qui permet un rendement constant. La composition de la population cellulaire isolée fut évaluée lors de chaque expérimentation par marquages oligodendrocytaire (Olig2), neuronal (SMI31 et 32), astrocytaire (GFAP) et microglial (OX42), 48h après isolement cellulaire. De manière constante, la fraction oligodendrocytaire a représenté 70% de la population totale, avec une majorité d'astrocytes contaminants (figure R 3).

Lors de ces tests de viabilité, nous avons soumis durant 6 jours la population enrichie en oligodendrocytes à des concentrations en Phe, PP et PA proches de celles retrouvées dans le cadre de la PCU (1,6 mM ; 2,2 μ M ; 7,4 μ M, respectivement), mais aussi à des valeurs largement supérieures à ce que l'on peut retrouver pathologiquement (5 mM ; 22 μ M ; 74 μ M). Cette expérimentation a montré que quelque soit leur concentration, les trois substances n'engendraient aucune baisse significative de la viabilité des cellules exposées (figure R 3).

3.1.2.2 Tests fonctionnels

Nous avons évalué l'effet de la Phe, PP et PA sur la différenciation et le rendement fonctionnel d'oligodendrocytes, grâce à l'utilisation d'un test *in vitro* que nous appellerons « culture myélinisante ». Ce type d'expérimentation permet d'étudier le développement de gaines de myélines en simulant le milieu du système nerveux central. Pour ce faire, des cortex embryonnaires murins sont disséqués et dissociés en une suspension cellulaire homogène. Cette suspension contient tous les intervenants du parenchyme cérébral : neurones, astrocytes, oligodendrocytes et microglie. Ces cellules primaires sont ensuite semées de manière constante sur un support de culture dans un milieu privilégiant la croissance et le développement des oligodendrocytes. Au terme de la culture, il est possible de révéler par immunomarquage les gaines de myéline formées et les dénombrer afin d'évaluer le degré de

performance des oligodendrocytes quant à la synthèse de ces gaines. Cette étape de dénombrement a été facilitée par la structure proche des deux dimensions de la culture cellulaire. Elle a été réalisée par comptage direct à l'œil, mais aussi en utilisant une méthode bioinformatique.

Nous nous sommes également intéressés à la transactivation du promoteur du gène de la protéine basique de la myéline (MBP – *Myelin Basic Protein*), qui permet de définir un index de maturation des oligodendrocytes présents dans les cultures. Chaque culture myélinisante a été réalisée à partir d'embryons de la lignée murine transgénique 1900bp-Myelin Basic Protein lacZ qui contient une cassette où le gène LacZ, codant la protéine β -galactosidase, est sous le contrôle du promoteur de la MBP. Dans ce système, quand les facteurs transactivateurs se lient au promoteur naturel de la MBP, ils se lient aussi à la copie de ce promoteur introduite par la cassette transgénique. En conséquence MBP et β -galactosidase sont produites de manière parallèle. La MBP est un composant majeur de la myéline. Dans l'oligodendrocyte, son promoteur est activé durant la différenciation dès le stade pré-myélinisant, étape précédant le stade de différenciation terminale en oligodendrocyte formant des gaines de myéline. La mesure de l'activité β -galactosidase au sein des cultures myélinisantes permet de dresser un index de maturation des oligodendrocytes présents en se fiant à une donnée directement quantitative.

Les cultures ont été maintenues pendant les 25 jours nécessaires à la différenciation cellulaire et l'établissement d'une quantité satisfaisante de gaines de myéline. Les échantillons ont été traités par ajout au milieu soit de Phe à 5 mM, soit de PP à 74 μ M, soit de PA à 22 μ M (concentrations finales), soit de PBS pour la condition contrôle et ce dès la mise en culture des cellules primaires (jour 0). En regard des résultats constants de viabilité, nous avons choisi d'appliquer des conditions supra-pathologiques aux cultures afin de se placer dans les conditions les plus défavorables.

Les résultats de l'étude de l'activité β -galactosidase au sein des échantillons n'a révélé aucune modification significative entre les différentes conditions de traitement, hormis une légère augmentation en cas de traitement au PA (figure R 4). Il semble donc que l'induction du promoteur de la MBP ne soit pas modifiée, ce qui plaide pour une maturation similaire des oligodendrocytes quelque soit le traitement.

Nous avons ensuite analysé la formation des gaines de myéline au sein des cultures. Cette analyse passe par un marquage anti-PLP (proteolipid protein), une autre protéine majeure de la myéline, permettant de révéler le tracé des gaines. Additionnellement, des marquages anti-neurofilaments SMI31/32 et par Hoetsch ont été appliqués afin d'identifier respectivement les projections neuronales

et les noyaux en présence. Les cultures ont ensuite été analysées par microscopie à fluorescence en aveugle quant aux conditions de traitement des échantillons. Dans un premier temps les gaines ont été comptées sur l'entièreté de la surface de l'échantillon. Ce nombre fut ensuite divisé par le nombre moyen de gaines présentes dans les échantillons contrôle de la même expérience. Ce rapport permet une normalisation du résultat, une étape incontournable pour pouvoir comparer des résultats provenant d'expériences indépendantes. En effet, le rendement inter-expériences peut être différent sans pour autant affecter la reproductibilité entre les échantillons d'une même expérience. Les résultats normalisés finaux sont présentés sous forme de score rassemblant les données de trois expériences indépendantes identiques, elles-mêmes constituées de cinq échantillons par condition. Cette analyse a révélé qu'il n'y a avait pas moins de gaines synthétisées quand les cultures étaient traitées par la Phe, le PP ou le PA (figure R 4).

Cependant la quantification par l'œil humain ne permet pas d'explorer objectivement certains paramètres comme la longueur des gaines, et reste critiquable quant à l'aspect quantitatif de leur dénombrement. Pour ces raisons, nous avons entamé une collaboration via la plateforme bioinformatique du GIGA afin de mesurer la longueur et le nombre des gaines par une méthode bioinformatique. Pour pouvoir appliquer efficacement une méthode aussi systématique qu'une analyse assistée par ordinateur, il faut fournir des collections d'images de cultures de qualité et dont les conditions d'acquisition sont parfaitement reproductibles. Pour atteindre ce niveau d'exigence, nous avons utilisé un microscope à fluorescence spécialement conçu pour l'analyse informatique des images générées et capable de photographier des surfaces de manière automatique et systématique sans dégrader le signal délivré par les fluorochromes, grâce à une exposition minimale de l'échantillon à la lumière excitatrice.

Nous avons photographié à l'aide de ce procédé l'entièreté de la surface des échantillons issus de deux expériences indépendantes de culture myélinisante comptant cinq répliquats par condition. Nos collaborateurs ont ensuite appliqué aux 17000 champs de microscopie générés leur procédé de reconnaissance d'objets pour l'analyse du nombre et de la longueur moyenne des gaines de myéline par échantillon. Succinctement, le programme d'analyse est capable de reconnaître des formes caractéristiques pré-établies, en fonction de données transmises par un utilisateur expérimenté (Wu et al. 2010) (figure R 5). Cette méthode bioinformatique a permis la comptabilisation du nombre de gaines mais aussi la définition de la taille moyenne de celles-ci, un paramètre jusqu'alors inaccessible. Les résultats de cette analyse bioinformatique n'ont montré aucune différence entre les conditions traitées et contrôle, tant pour le nombre de gaines synthétisées que pour la longueur de celles-ci,

confortant les données obtenues par comptage classique optique (figure R 6). Nous avons soumis au test de corrélation linéaire de Pearson les données fournies par la méthode optique et la méthode informatique. Il s'est avéré que ce score s'élevait à 0,9 quand les données collectées ont été comparées culture par culture selon les deux méthodes.

3.2 Thérapie génique de la PCU.

Dans un but de clarification, les résultats de cette partie seront présentés selon le type de vecteur cellulaire choisi pour exprimer le transgène PAH. Les résultats représentent une partie du travail fourni par le Docteur Claire Josse et moi-même dans le cadre de ce projet. Cette recherche s'inscrit dans un projet pluridisciplinaire financé par la Région Wallonne. Le laboratoire d'Hépatologie Pédiatrique du Professeur Sokal de l'Université Catholique de Louvain et le laboratoire de Pédiatrie – Unité Métabolique du Professeur Goyens de l'Université de Bruxelles ont activement collaboré avec notre laboratoire sur ce projet.

3.2.1 Hépatocytes.

Les hépatocytes sont des cellules naturelles résidentes du foie. Ce type cellulaire est l'unité fonctionnelle de cet organe et est donc par essence le vecteur cellulaire que nous avons envisagé en premier.

Il est possible d'isoler des hépatocytes primaires de souris à partir d'un foie complet par digestion enzymatique de la matrice extracellulaire. Nous avons réalisé cette étape par perfusion de l'organe via la circulation sanguine avec une solution contenant de la collagénase. Cette technique permet une récolte d'hépatocytes à haut rendement grâce à une intervention minimale de dissociation mécanique. Nous avons utilisé exclusivement des souris provenant du modèle murin de PCU, la lignée murine BTBR Pah^{enu2}/J, pour la récolte d'hépatocytes primaires.

Pour transduire ces cellules, c'est-à-dire les modifier génétiquement via un vecteur viral, nous avons choisi la technologie des vecteurs de type lentiviral. Nous avons produit dans un premier temps une construction transportant une copie fonctionnelle de l'ADN complémentaire (ADNc) murin de la PAH (figure R 7). Dans cette construction la transcription de l'ADNc est dépendante du promoteur du cytomégalovirus (CMV). Une séquence « Internal Ribosome Entry Site » (IRES) suivie d'une copie de l'« enhanced Green Fluorescent Protein » (eGFP) ont été positionnées à la suite de l'ADNc de la PAH. La séquence IRES a pour but de permettre l'expression de la protéine eGFP alors que son code se trouve sur le même transcrit que la PAH. La protéine eGFP a vocation de marqueur en nous permettant de distinguer facilement en microscopie à lumière bleue quelles cellules ont été effectivement transduites. PAH et eGFP se trouvant sur le même transcrit, il y a une relation quant au niveau d'expression des deux protéines.

Nous avons soumis des hépatocytes primaires provenant de notre modèle murin de phénylcétonurie à une charge lentivirale élevée. Les cellules ont ensuite été analysées en microscopie à fluorescence sous lumière bleue afin de détecter les cellules exprimant l'eGFP. Il nous a été possible de détecter des cellules fluorescentes, cependant celles-ci ne présentaient pas une morphologie hépatocytaire mais plutôt fibroblastique (figure R 8). Ces cellules fibroblastiques ont été de toute évidence isolées en même temps que les hépatocytes.

Le promoteur du CMV peut se révéler inactif dans certaines circonstances, dont un environnement murin. Nous avons dès lors placé notre construction sous dépendance d'un autre promoteur, celui de l'« Elongation Factor-1 α » (EF-1 α) (Chung et al. 2002) (figure R 7). Nous avons répété l'expérience de transduction d'hépatocytes primaires par ce vecteur lentiviral. Une nouvelle fois aucune expression de gène rapporteur eGFP, ni d'activité PAH n'a pu être mise en évidence (figure R 8).

Donc, des promoteurs ubiquistes comme celui du CMV ou de la protéine EF-1 α n'ont pas été capables de conduire chez l'hépatocyte une expression détectable des transgènes. Nous avons décidé d'utiliser des promoteurs dessinés pour conduire une expression spécifiquement hépatocytaire afin d'augmenter la probabilité de succès. Quatre promoteurs que nous listerons Promoteur Foie Spécifique (PFS) de 1 à 4 ont été clonés dans la construction lentivirale (figure R 9). Ces promoteurs sont reconnus comme conduisant une expression forte et spécifique *in vitro* et *in vivo* en milieu murin (Kramer et al. 2003). Nous avons soumis des hépatocytes primaires à ces nouveaux vecteurs, selon le même mode opératoire que précédemment. Ces résultats se révélèrent cependant une fois de plus négatifs quant à l'expression de la PAH (figure R 9).

Deux possibilités s'offrent à nous pour expliquer ces résultats négatifs. Les hépatocytes peuvent être résistants à la transduction (Nguyen et al. 2002), ou cette transduction a bien lieu mais il y a un blocage au niveau de l'expression du transgène.

Afin de distinguer les deux options, nous avons analysé l'ADN génomique d'hépatocytes après contact avec un vecteur lentiviral, par PCR quantitatives amplifiant la séquence « Long Terminal Repeat » (LTR) présente dans nos constructions virales et le gène codant la GAPDH (figure R 10).

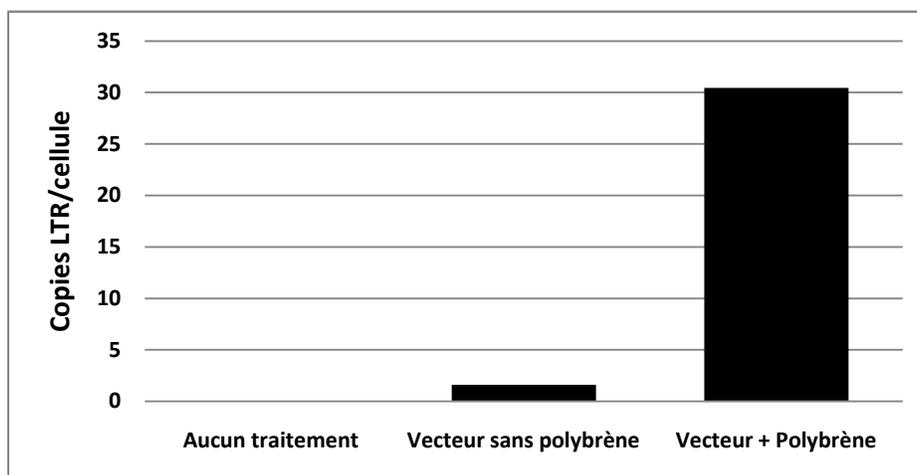


Figure R 10 : Mesure par PCR quantitative du nombre de copies par cellule de la séquence virale LTR dans l'ADN génomique d'hépatocytes primaires murins. Les cellules ont été transduites avec une charge virale équivalente à 2000 ng de particules p24/ml de surnageant de culture. Le polybrène est utilisé dans une des conditions pour augmenter le taux de transduction. Les hépatocytes ont été mis en contact avec le virus immédiatement après avoir été isolés (en suspension). La normalisation est réalisée par quantification du nombre de copies de la GAPDH murine.

L'amplification du LTR permet de quantifier le nombre de provirus retrouvés dans l'ADN génomique mais aussi potentiellement dans les plasmides de production contaminants. L'amplification du gène codant la GAPDH sert de contrôle interne et permet de quantifier par cellule le nombre de provirus intégrés. Afin de discriminer un signal provenant d'une contamination plasmidienne d'une réelle intégration du provirus dans l'ADN génomique cellulaire, nous avons comparé le degré d'amplification retrouvé dans l'ADN génomique d'hépatocytes murins selon trois conditions : hépatocytes sans vecteur viral ; hépatocytes avec vecteur viral mais sans agent permettant la transduction (polybrène) ; hépatocytes avec vecteur viral et polybrène. Le résultat de cette analyse a montré qu'en dépit d'une contamination plasmidienne de l'ADN génomique hépatocytaire, il ne fait nul doute que le vecteur lentiviral est à même d'intégrer son provirus dans le génome de l'hépatocyte. Un défaut d'expression du transgène est donc la cause de l'inefficacité de nos vecteurs. Cependant nous avons testé de nombreuses alternatives quant aux promoteurs. La faible viabilité *in vitro* des hépatocytes primaires peut expliquer en soi le défaut d'expression de nos transgènes. En effet si le métabolisme cellulaire est suffisamment compromis, l'expression protéique peut se révéler inopérante.

En résumé, nous n'avons pas pu transduire efficacement d'hépatocytes primaires murins. Ce type cellulaire nécessite des soins tout particuliers afin d'être maintenus en vie *in vitro*, ce qui complexifie la procédure expérimentale de notre protocole de thérapie génique. De plus les hépatocytes sont des

cellules terminalement différenciées, ce qui limiterait la durée de l'effet curatif après implantation chez l'organisme receveur.

Tous ces éléments pris en compte, il semble que les hépatocytes ne soient pas les meilleurs candidats pour être le véhicule de l'expression d'un transgène en thérapie génique.

3.2.2 Cellules souches mésenchymateuses.

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) présentent de nombreuses caractéristiques avantageuses en comparaison avec les hépatocytes. Leur capacité à proliférer *in vitro* et *in vivo*, à se différencier *in vitro* en cellules proches d'hépatocytes (Aurich et al. 2009) et à s'implanter dans les tissus lésés (Meirelles Lda et al. 2009), en font un vecteur cellulaire de choix pour notre protocole de thérapie génique.

Les résultats impliquant les CSM seront subdivisés selon l'espèce de provenance : murine ou humaine, en regard des divergences constatées.

3.2.2.1 Cellules souches mésenchymateuses murines

Nous avons isolé des CSM à partir de moelle osseuse provenant du modèle murin de PCU, la lignée BTBR PAH^{enu2}/J. Ces cellules proviennent d'un sujet mâle de génotype homozygote sauvage. Les CSM ont été isolées parmi les cellules de moelle osseuse par culture dans un milieu spécifique favorisant la croissance sélective des CSM et par passages successifs de l'échantillon médullaire. Nous avons caractérisé les cellules cultivées à intervalle régulier par marquage FACS anti-SCA1 (+) CD106 (+), CD11b (-), CD45 (-), CD34 (-). Il a fallu 10 passages pour obtenir un degré de pureté égal à 95%. Ces cellules se sont aussi montrées capables de se différencier en ostéocytes, adipocytes et chondrocytes (figure R 11). Ces tests consistent en une induction de la différenciation par culture dans un milieu orientant les CSM vers l'un ou l'autre type cellulaire, puis dosage du calcium intracellulaire pour les ostéocytes, coloration des lipides pour les adipocytes et coloration de la matrice cartilagineuse pour les chondrocytes.

Nous avons testé nos vecteur lentiviraux sur cet isolat de CSM. Même si de par leur origine sauvage ces cellules expriment une version fonctionnelle de la PAH, il n'en reste pas moins très probable qu'il faille artificiellement augmenter leur degré d'expression de l'enzyme PAH pour corriger le métabolisme déficient d'un individu PCU. Il a par exemple été estimé qu'une restauration de 10% à 20% de l'activité PAH serait indispensable pour corriger le déficit métabolique (Ding et al. 2004). De ces tests de transduction par vecteur lentiviral, il apparaît que le promoteur CMV ne permet pas l'expression des

transgènes. Cela est en revanche possible quand le promoteur EF-1 α est utilisé (figure R 12). Cette observation est un exemple d'inefficacité du promoteur CMV quand il est placé dans un environnement murin. Nous avons donc choisi le promoteur EF-1 α pour toute expérimentation ultérieure.

La phase d'isolement et de transduction des CSM murines franchie, nous devons mettre au point et maîtriser les étapes spécifiques au versant thérapie cellulaire composant notre projet de thérapie génique de la PCU.

Une lésion maîtrisée du parenchyme hépatique préalable à l'infusion de CSM semble incontournable si l'on espère un remplacement significatif de la masse cellulaire de l'organe par la descendance des cellules transfusées. Dans cette optique, nous avons envisagé un protocole de lésion utilisant l'alcool allylique, une substance toxique pour le foie (Lee et al. 1996) (figure R 12).

Nous avons choisi la rate comme site d'entrée des CSM modifiées. Cet organe offre les avantages d'être facilement accessible par voie chirurgicale, d'avoir une structure tissulaire bien définie et assez élastique, mais avant tout de présenter une circulation veineuse directement connectée à la veine porte. Après avoir mis au point la chirurgie nécessaire à l'injection des CSM par voie splénique, nous avons voulu mettre en œuvre les étapes de thérapie cellulaire. Cet essai avait vocation de répétition afin de déceler les écueils potentiels. Au moment des faits, nous ne disposions que du vecteur lentiviral à promoteur CMV qui est inefficace pour induire l'expression de transgènes chez les CSM murines. Les CSM administrées lors de cette expérience n'ont donc pas été transduites. Nous avons lésé le foie d'animaux BTBR Pah^{enu2}/J double mutants âgés de 8 à 12 semaines par administration d'alcool allylique. Des CSM mâles de génotype sauvage (cf ci-dessus) ont été injectées par voie splénique à raison de 2×10^6 cellules 48 heures après la dernière injection d'alcool allylique. Nous avons ensuite relevé le taux de Phe sanguine de chaque individu au cours des quatre mois suivants. Il n'y eu pas de modification du métabolisme de la Phe chez les souris traitées (figure R 13). Ce résultat était cependant probable car dans notre cas les cellules administrées avaient un taux d'expression de la PAH normal et le taux classique de repeuplement du foie par des CSM est de l'ordre de 1% (Aurich et al. 2007). La correction métabolique extrapolée était dès lors de 1%, bien en deçà des 10% pressentis comme seuil d'efficacité. Cependant cette expérience nous a permis de mettre en évidence deux facteurs déterminants quant à la survie de nos animaux à court terme. Le premier point était que l'induction de lésion hépatique à l'alcool allylique telle que documentée (Lee et al. 1996) était potentiellement trop forte chez la souche murine BTBR Pah^{enu2}/J et qu'il fallait la remettre au point. Le deuxième facteur était

la quantité de cellules injectées. Une proportion non négligeable des animaux traités ont souffert de troubles respiratoires dans les instants qui suivirent l'injection des CSM, plaidant pour une embolisation pulmonaire des cellules. La quantité de 2×10^6 cellules à injecter a été mise au point par notre partenaire UCL pour des expériences d'infusion hépatocytaire. Les hépatocytes sont des cellules sphériques très volumineuses et nous pensions pouvoir transposer ce nombre sans risque aux CSM, qui ont un aspect fibroblastique et sont plus petites. Nous avons déjà pris le plus grand soin à ce que les cellules forment le moins d'agrégat possible avant injection. La quantité de cellules injectées devra donc être revue à la baisse. L'observation majeure de cette expérience ne fût révélée qu'en fin de parcours, lors de la dissection des animaux ayant reçu des CSM. Un de ces six animaux présentait une tumeur localisée au niveau de la rate. Nous avons analysé le caryotype des CSM ayant été administrées et il s'est révélé que ces cellules étaient tétraploïdes. Les CSM murines que nous avons isolées étaient donc transformées. La transformation de CSM murines a déjà été documentée (Miura et al. 2006; Tolar et al. 2007), quoique peu de publications en font état en regard du grand nombre d'articles utilisant ce type de cellules à des fins diverses.

Nous avons donc remis au point le protocole de lésion hépatique tout en envisageant un second traitement plus long à mettre en œuvre, mais potentiellement plus prometteur. Celui-ci s'étale sur deux phases et emploie successivement de la rétorsine, une drogue bloquant la prolifération hépatocytaire, suivi d'un traitement au CCl_4 , un composé hépatotoxique (Guo et al. 2002). Nous nous sommes basés sur les données publiées pour adapter ces protocoles à la souche murine BTBR Pah^{enu2}/J chez des individus double mutants qui sont notoirement plus chétifs. Les doses administrées ont été ajustées afin de générer le meilleur rapport dose/lésion. Nous avons suivi les taux sériques de TGP, TGO et LDH de chaque individu test au cours des traitements. Nous avons également procédé à une analyse histologique des foies des animaux traités afin d'explorer le degré de nécrose de leur parenchyme hépatique.

Le protocole à base d'alcool allylique s'est révélé assez peu reproductible. Même si nous avons pu déterminer que la dose optimale à utiliser était de 45 mg/kg par voie intra péritonéale, son effet reste très variable d'un animal à l'autre (figure R 13).

Le deuxième protocole est sensiblement plus long et complexe à mettre en œuvre, mais montre une plus grande stabilité interindividuelle. La dose adéquate de rétorsine est de 40 mg/kg et celle de CCl_4 de 0,3 ml/kg, en injection par voie intra péritonéale (figure R 13). En conséquence, nous avons choisi pour la suite de l'expérimentation ce protocole de lésion hépatique.

La quantité de CSM à injecter fût ensuite redéterminée par mises en situation successives. Une dose de 400000 cellules s'est révélée sans risque.

La transformation des CSM murines est un obstacle majeur à la poursuite de notre projet de thérapie génique. En effet il est impossible de déduire d'une expérimentation réalisée avec des cellules transformées quelque information quant au pouvoir d'implantation, de prolifération et de différenciation des CSM normales. Nous avons d'abord tenté d'isoler de manière classique d'autres CSM à partir d'animaux BTBR Pah^{enu2}/J de différents génotypes, mais les cellules obtenues présentaient invariablement un caryotype aberrant. La méthode de purification par passages successifs des cellules isolées à partir de moelle des fémurs et tibias ne semble pas être optimale dans le cas des cellules murines. En effet, contrairement aux cellules humaines où deux à trois passages suffisent pour obtenir une population homogène de CSM, les cellules murines nécessitent 10 à 13 passages, c'est à dire environ trois mois de culture *in vitro*. Ce temps trop long favorise la transformation des CSM en cellules cancéreuses. Pour écourter l'étape de culture *in vitro* et tenter d'éviter la transformation, nous avons éliminé les cellules présentant des marqueurs hématopoïétiques des isolements médullaires. En effet ces cellules sont considérées comme contaminantes dans ce type d'expérience. Cette étape a été réalisée après le premier passage *in vitro*. Nous avons marqué les cellules à éliminer avec des anticorps couplés à de la biotine. Nous avons ensuite sélectionné négativement ces cellules marquées en les fixant à des billes magnétiques recouvertes de streptavidine. Les billes sont ensuite retenues par un aimant ce qui permet de physiquement enlever de la culture les cellules à caractère hématopoïétique, grâce à l'interaction spécifique streptavidine-biotine. Nous avons testé deux cocktails d'anticorps. Le premier est : CD34, CD45 et CD11b et le second est un kit commercial (MAC's): CD5, CD45R, CD11b, anti-Gr-1, 7-4 et Ter-119. Nous avons observé que les cultures ayant subi le processus de sélection négative voyaient leur rythme de croissance diminuer voire s'arrêter, et ce surtout si nous opérons cette sélection avant le premier passage. Un ralentissement de croissance signifie un allongement de l'étape de sélection *in vitro*, que nous voulions écourter. Afin de contrer cet effet, nous avons modifié la composition du milieu de culture. Nous avons testé l'ajout d'HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) pour stimuler la division cellulaire (Schrepfer et al. 2007), de LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) rapporté comme nécessaire pour l'émergence des cellules progénitrices multipotentes adultes (MAPC) dont font partie les CSM (Jiang et al. 2002), ainsi que de manière moins spécifique le remplacement du sérum bovin par du sérum murin ou équin. Nous avons procédé à des isolements à partir de différentes souches murines : BTBR Pah^{enu2}/J de tout génotype, BTBR de souche sauvage (T^{+/j}) et C57bl6.

Pour toute condition, nous avons analysé le caryotype des cellules. Cette méthode a montré que quelque soit la condition de sélection négative, de culture ou la souche murine de provenance, le caryotype des cellules était anormal et le plus souvent tétraploïde. Nous avons caractérisé un grand nombre d'isolements par un typage FACS anti-CD45 (-), CD34 (-), CD11b (-), SCA-1 (+), CD106 (+), CD90.2 (+) ainsi que par leur capacité à se différencier en adipocyte, ostéocyte et chondrocyte (figure R 14).

Cette transformation systématique des CSM murines que nous avons isolées a constitué une barrière pour l'utilisation de ce type cellulaire dans notre projet de thérapie génique de la PCU. Dans l'incapacité de franchir cet obstacle, nous avons réorienté nos recherches vers les CSM d'origines humaines.

3.2.2.2 Cellules souches mésenchymateuses humaines

Le laboratoire du Professeur Beguin nous fit don d'un échantillon de CSM d'origine humaine. Ces cellules furent sélectionnées à partir de moelle osseuse par passage *in vitro* tout comme nos CSM murines. Nous avons exploré le caryotype de ces cellules et trouvé celui-ci normal.

Nos vecteurs lentiviraux à base de promoteur CMV et EF-1 α se sont révélés tous deux capables de transduire efficacement les CSM humaines (figure R 15).

L'obstacle à l'utilisation de cellules d'origine humaine comme véhicule d'un transgène chez un organisme murin est l'immunité de l'hôte. Si nous tentions d'administrer des cellules humaines à notre modèle murin de PCU, une forte réaction immunitaire inter-espèce serait attendue. Il nous a donc fallu modifier la capacité de réponse immunitaire de l'organisme receveur. Au-delà de ce point, une telle méthodologie a pour avantage d'évaluer la capacité de CSM humaines à participer à la régénération d'un foie lésé. Ainsi ce modèle est en fait plus proche de l'application finale de ce projet de thérapie génique que le modèle utilisant des cellules murines en organisme murin. L'idéal aurait été de pouvoir supprimer totalement les capacités immunitaires de la souche BTBR Pah^{enu2}/J, cependant cela n'était possible sans se lancer dans une procédure de croisement de cette lignée avec une souche murine immunodéficiente de type NOD/SCID, par exemple. Cette méthode longue et complexe ne nous a pas paru la plus indiquée. Nous avons préféré utiliser un protocole d'immunosuppression en deux phases, efficace pour la prise de greffe hépatocytaire humaine chez le rat (Wu et al. 2006). Le protocole utilise une combinaison de rapamycine, tacrolimus et mycophénolate mofétil (MMF). Les drogues ont été utilisées chez le rat à des concentrations proches de celles recommandées chez l'homme. Nous avons mis au point les doses d'immunosupresseurs à administrer chez la lignée murine BTBR Pah^{enu2}/J pour

obtenir des concentrations sanguines en immunosuppresseurs du même ordre que chez le rat et l'homme (figure R 16). Nous avons également vérifié si l'administration des immunosuppresseurs provoquait des dommages hépatiques en dosant les taux plasmatiques de TGO et TGP. Ces dosages ont montré que ces marqueurs de lésion hépatique n'étaient pas significativement augmentés.

Nous avons ensuite combiné le protocole de lésion hépatique déjà mis au point précédemment avec le protocole d'immunosuppression pour transfuser des CSM humaines dans le modèle murin de PCU. L'objectif était de valider le protocole avec des paramètres simples avant de réaliser la thérapie cellulaire et génique proprement dite. Nous voulions vérifier la survie des animaux et mesurer l'implantation à court terme des CSM humaines transfusées dans un tel contexte. Nous avons travaillé avec des souris BTBR Pah^{enu2}/J hétérozygotes et des CSM humaines transduites avec un vecteur lentiviral où l'expression des ADNc codant la PAH et l'eGFP étaient sous contrôle du promoteur CMV. Nous avons utilisé 14 animaux répartis en 5 groupes de manière à mettre en évidence l'importance des différents traitements (figure R 16).

En termes de survie, nous avons perdu un animal du groupe 2 avant l'infusion de cellules, et deux autres animaux du même groupe sont décédés d'hémorragie pulmonaire la veille et le jour même de l'euthanasie finale. La dissection et l'observation macroscopique des animaux révèlent une nécrose capsulaire sévère du foie de tous les animaux qui ont subi une lésion hépatique (groupe 2 et 3), et tous ces animaux montrent des traces de sang dans les poumons de manière plus ou moins importante. Nous avons attribué ce phénomène aux dommages hépatiques provoqués par le CCl₄. La métabolisation de ce composé par les cytochromes P450 hépatiques engendre une espèce radicalaire cytotoxique. Ceci mène à des dommages principalement hépatiques mais aussi pulmonaires (Mizuguchi et al. 2006). Les lésions du foie entraînent une baisse de la synthèse de facteurs de la coagulation, tandis que les dommages pulmonaires entraînent des lésions du réseau vasculaire. Sur les 7 animaux qui ont reçu le CCl₄, quatre présentaient des poumons extrêmement endommagés. Les animaux des groupes 1, 4 et 5 présentaient un foie et des poumons normaux. Si le traitement au CCl₄ permet d'obtenir une lésion hépatique de manière reproductible, le paramètre de lésion pulmonaire est aussi à prendre en compte dans le cadre d'une expérimentation nécessitant un suivi au plus long terme.

Les concentrations en immunosuppresseurs retrouvés dans le sang des souris au moment de l'euthanasie correspondaient à celles attendues.

Nous avons tenté d'estimer le taux d'implantation des cellules humaines dans les foies murins par PCR quantitative amplifiant les gènes de l'albumine humaine et de l'actine murine. Nous avons réalisé des dilutions croissantes de CSM humaines dans une lignée de kératinocytes murins pour créer une droite étalon. Nous avons ensuite extrait l'ADN génomique de ces mélanges et de foies de souris transfusées pour comparer par PCR quantitative l'amplification du gène de l'albumine humaine et de l'actine murine. Il s'avère qu'au mieux nous retrouvons une cellule humaine pour 10.000 cellules murines (0,01% d'implantation). Cette valeur correspond au seuil de sensibilité de la technique, nous ne pouvons donc conclure à une implantation.

En parallèle, nous avons tenté de retrouver des CSM humaines chez les animaux transfusés par des techniques d'immunohistochimie. Nous avons réalisé des coupes cryopréservées de foie des animaux et nous avons procédé à des immunomarquages anti-mitochondries humaines, protéine nucléaire humaine KI-67 et protéine GFP. Quelle que soit la méthode utilisée, nous n'avons pas pu mettre de cellules humaines en évidence dans le foie des souris transfusées 21 jours après manipulation.

L'absence de CSM humaines dans le foie des souris peut être due à une non implantation de ces cellules dans le parenchyme hépatique, ou à une mort cellulaire. Cette mort peut être principalement due à l'immunité de l'hôte. Nous avons voulu vérifier par un test fonctionnel que l'immunodépression induite chez les animaux était suffisante pour éviter le rejet de cellules humaines. Pour ce faire nous avons utilisé un modèle de xénogreffe humaine chez la lignée de souris immunodéficientes NOD/SCID et la lignée murine BTBR Pah^{enu2}/J. Les animaux NOD/SCID ont constitué le groupe contrôle positif. Les animaux BTBR ont été répartis en trois groupes : aucun traitement (contrôle négatif), rapamycine + tacrolimus, MMF + tacrolimus (figure R 17). Ce test consiste en l'injection sous cutanée bilatérale de cellules tumorales humaines de la lignée MDA-MB-231 exprimant stablement le gène rapporteur de la luciférase. Cette technique permet de déterminer dès six semaines après injection l'ampleur de la prise de greffe par mesure de la bioluminescence provenant de la masse tumorale.

Les animaux ont été examinés huit semaines après injection. Nous avons pu observer une occurrence d'implantation élevée chez le groupe contrôle positif (NOD/SCID), et aucune chez le groupe contrôle négatif (BTBR sans immunosuppression). Il n'y a eu aucune implantation tumorale détectable chez les animaux appartenant aux deux groupes ayant reçu un traitement immunosuppresseur. Ce test fonctionnel a révélé que les modalités de l'immunosuppression n'étaient pas suffisantes pour permettre la prise d'une xénogreffe humaine sous-cutanée (figure R 18). Les animaux ont été euthanasiés et la concentration plasmatique en immunosuppresseurs mesurée. Il s'est avéré que chez

le groupe rapamycine + tacrolimus, la concentration cible en rapamycine était toujours atteinte (moyenne 23,2µg/L +- 17,2) alors que celle en tacrolimus était trop faible dans la majorité des cas (moyenne 2,8µg/L +-3,4 ; un animal > 5µg/L). Dans le groupe MMF + tacrolimus, la concentration en MMF était trop faible (moyenne 1,4µg/L +-0,4) et la concentration en tacrolimus aussi dans la majorité des cas (moyenne 4,7µg/L +-2 ; un animal >5µg/L). Les concentrations en drogues varient fortement d'un individu à l'autre mais les concentrations des deux molécules constituant chaque traitement varient de manière parallèle chez un même individu. En effet le coefficient de corrélation entre la concentration en rapamycine et tacrolimus est de 0,8 et pour le MMF et le tacrolimus de 1. Les drogues étant dans chaque condition diluées dans l'eau de boisson, il semble que le volume d'ingestion journalier en eau ait diminué chez certains sujets. Ce phénomène est connu mais difficile à apprécier quand les animaux sont rassemblés en cages communes comme ce fut le cas dans notre expérience.

Ce test ne nous permet pas d'affirmer catégoriquement que le défaut d'implantation des CSM humaines observé lors de l'expérience précédente était dû à l'inefficacité du traitement immunosuppresseur. Cependant le taux plasmatique des drogues ont pu varier en fonction de l'ingestion d'eau de boisson par les animaux au cours de l'expérience. Ces taux étant des paramètres techniquement non explorables sur animal vivant, nous ne pouvons avoir accès à leurs possibles fluctuations. Nous pouvons conclure que les modalités du protocole d'immunosuppression devront être révisées en vue d'une nouvelle infusion de CSM humaines chez la lignée murine BTBR Pah^{enu2/J}. Il faudra relever le volume de liquide ingéré individuellement tous les deux à trois jours voire changer la voie d'administration des drogues pour garantir une atteinte stable des valeurs cibles en drogues immunosuppressives sur le long terme. Nous pourrions ensuite explorer plus loin la capacité des CSM à repeupler un foie lésé.

4 Discussion et perspectives

4.1 Déficit neurologique et PCU

Les patients atteints de phénylcétonurie montrent une hypomyélinisation de leur système nerveux central et ce déficit participe à leur retard mental. Le processus de myélinisation est mis en place durant la période néo-natale, ce qui explique pourquoi un traitement rigoureux dès les premiers jours de vie est crucial pour l'obtention d'un bénéfice maximum. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer l'origine de cette hypomyélinisation mais aucune d'entre elles n'a été démontrée expérimentalement comme étant la cause directe de l'anomalie. Comme certaines de ces hypothèses suggèrent un rôle toxique de la Phe et de ses métabolites sur les oligodendrocytes, nous avons évalué, *in vitro* et *in vivo*, les effets de la Phe, du PP et du PA sur la survie, le développement et la fonction des oligodendrocytes.

Nos résultats montrent que même si le modèle murin de PCU présente une hypomyélinisation du corps calleux, le nombre d'oligodendrocytes présents dans cette structure est normal, confirmant une étude préalable (Shefer et al. 2000). De plus nous n'avons pas détecté de toxicité directe sur des oligodendrocytes primaires cultivés en présence de hautes doses de Phe, PP et PA. Ces données indiquent que le déficit de myélinisation associé à la PCU n'est pas dû à un effet néfaste direct de ces composés sur le développement ou la survie des oligodendrocytes, comme cela avait pourtant été suggéré par plusieurs auteurs (Huttenlocher 2000; Kaufman 1989).

Dès lors, des mécanismes alternatifs pourraient être impliqués. Il a été précédemment rapporté que la synthèse de cholestérol était inhibée par la Phe et que les oligodendrocytes évoluent vers un type non myélinisant caractérisé par une expression de la GFAP quand ils sont exposés *in vitro* à la Phe (Dyer et al. 1996; Shefer et al. 2000). D'un autre côté, il a aussi été démontré qu'exposer des cultures corticales à des taux élevés de Phe ne modifiait pas le rapport entre glie et neurones (Horster et al. 2006). Nous avons utilisé une approche globale pour quantifier *in vitro* l'impact de la Phe, du PP et du PA sur le processus de myélinisation. Le modèle de co-cultures myélinisantes nous a permis de mesurer le produit final, les gaines de myéline, et donc d'évaluer la performance globale du processus incluant la différenciation des oligodendrocytes, les interactions oligodendrocyte-axone, la synthèse et l'enroulement des gaines. Dans ces conditions expérimentales, il est possible d'estimer l'impact d'une seule substance sur le processus de myélinisation. De plus, dans les cultures dérivées d'animaux de la

lignée murine transgénique 1900bp-Myelin Basic Protein lacZ, une bonne corrélation a été démontrée entre le taux d'expression de la β -galactosidase et le nombre d'oligodendrocytes terminalement différenciés (Stankoff et al. 2002). Dans ces conditions, nous avons montré que de hautes concentrations de Phe, de PP et de PA n'ont aucun impact sur la synthèse des gaines de myéline, même à des concentrations supra-pathologiques. Silberberg avait précédemment investigué l'effet de Phe, PP et PA sur la survie et la myélinisation dans le cervelet (Silberberg 1967), cependant son expérimentation était différente et limitée à des observations en microscopie à lumière blanche. Nos résultats ne sont donc pas directement comparables avec des études *in vitro* précédentes étant donné qu'à notre connaissance, c'est la première fois qu'une technique aussi intégrée a été utilisée pour étudier la physiopathologie de la PCU.

Dès lors, comme de hautes concentrations de Phe, PP ou PA n'altèrent pas la synthèse de myéline par les oligodendrocytes, un effet délétère direct de la Phe sur le processus de myélinisation est peu probable. Une relation indirecte entre le taux élevé de Phe et l'hypomyélinisation devrait donc être considérée.

L'hyperphénylalaninémie génère une compétition entre la Phe et les autres acides aminés neutres au niveau du transporteur LAT1 présent à la barrière hémato-encéphalique. Il en résulte un flux réduit des autres acides aminés neutres vers le cerveau (Smith et Kang 2000; Surtees et Blau 2000). Une diminution de la synthèse protéique cérébrale a d'ailleurs été observée chez des patients PCU (Hoeksma et al. 2009). Un ralentissement de la synthèse protéique pourrait porter atteinte à la myélogénèse et à la maintenance de la myéline (Surtees et Blau 2000). Sur base de cette hypothèse, des suppléments en acides aminés neutres, excepté en Phe, ont été administrés à des patients PCU afin de modifier la compétition au transporteur LAT1 et donc de réduire la concentration cérébrale en Phe tout en augmentant l'import des autres acides aminés neutres à travers la barrière hémato-encéphalique. Un tel traitement a réduit le taux plasmatique de Phe libre, probablement en raison d'une compétition pour des transporteurs intestinaux et a montré un bénéfice clinique chez des patients incapables de suivre leur diète alimentaire (Matalon et al. 2007; Schindeler et al. 2007). L'effet de ce traitement sur le taux de Phe intracérébral doit encore être précisé (Rocha et Martel 2009). Si une telle hypothèse était confirmée expérimentalement, le transporteur LAT1 sera considéré comme une cible pour de nouveaux agents thérapeutiques.

En conclusion, le travail accompli dans cette partie de thèse a mis en évidence par un essai *in vitro* regroupant toutes les étapes de la myélinisation que l'effet de la Phe sur le métabolisme

oligodendrocytaire n'est probablement pas direct. De plus, la prolifération et la survie des oligodendrocytes ne sont pas affectées en modèles *in vivo* et *in vitro*. Ces résultats ont été obtenus dans des modèles animaux, ils ne sont donc peut-être pas transposables à la biologie humaine, cependant ces informations constituent une contribution tangible pour la compréhension du rôle direct de la Phe et de ses dérivés dans la pathophysiologie de la PCU.

Des arguments récents sont en faveur d'un effet indirect. Il a été observé que des individus souffrant d'un déficit d'activité PAH et montrant un taux plasmatique de Phe libre qualifiable de PCU ne souffraient d'aucun retard mental. La concentration en Phe de leur liquide céphalo-rachidien ne présentait qu'une légère élévation du taux de Phe. Cette protection de leur système nerveux central est attribuée à un polymorphisme du transporteur LAT1, mais une telle observation doit encore être confirmée dans une cohorte indépendante (Moller et al. 2005). Il conviendra de se demander si l'absence d'élévation du taux de Phe intracérébrale chez ces individus est le facteur protecteur ou si cette protection s'exerce par modification de la compétition entre grands acides aminés neutres au transporteur LAT1. Des perspectives thérapeutiques nouvelles pourraient découler de ces travaux.

4.2 Thérapie génique de la PCU

La PCU est traitée depuis les années 50 par diète alimentaire réduisant l'apport en Phe. Le but n'est donc pas de corriger la fonction déficiente chez le patient, mais d'éviter la source des effets néfastes. Ce traitement est efficace puisqu'il permet d'éviter le retard mental profond causé naturellement par la PCU. Cependant la diète alimentaire est très contraignante et pauvre d'un point de vue social et gustatif, tout en étant maintenant recommandée à vie (van Spronsen et Enns 2010). De nombreux patients dévient de la ligne de conduite qui leur est imposée et ce défaut d'observance peut mener à l'échec du traitement. Une voie curative définitive est la greffe hépatique orthotopique. Cependant cette solution est quelque peu extrême en raison du caractère non létal de la PCU et du traitement immunosuppresseur. De plus, cette méthode n'est pas envisageable en indication primaire de par la rareté croissante des organes transplantables. Afin de réduire le besoin en matériel biologique, la transplantation hépatocytaire orthotopique a été envisagée. Cette technique a révélé un bénéfice clinique à moyen terme, mais ne peut encore être conseillée pour le traitement de la PCU en raison du caractère allogénique des cellules greffées.

Durant cette thèse, nous avons envisagé un modèle d'autogreffe cellulaire d'hépatocytes ou de cellules souches mésenchymateuses génétiquement modifiées visant à introduire une activité PAH thérapeutique chez le patient PCU. Pour mener à bien le transfert génétique, nous avons choisi un

vecteur lentiviral de type auto-inactivant de deuxième génération pseudotypé avec la protéine de surface VSVG. Les vecteurs adénoviraux et adéno-associés ont un large tropisme pour les cellules du foie, cependant leur matériel génétique épisomal ne permet pas une expression durable de transgènes et la réaction immunitaire qu'ils génèrent met en péril la survie des cellules transduites. Les lentivirus proposent une intégration stable de leur matériel génétique lors de la transduction et même si leur tropisme à l'égard de cellules hépatiques est moindre, la transduction ex-vivo de l'auto-greffe permet de pallier cet effet par augmentation des doses de vecteur.

Nos expériences ont montré qu'il n'était pas trivial d'isoler des hépatocytes primaires et de les maintenir en vie selon des conditions de culture standard. L'intégration du provirus lentiviral fut possible, cependant nous n'avons pu obtenir d'expression des transgènes malgré de nombreuses variations du promoteur de la cassette d'expression. Nous pensons que dans des conditions de culture classiques, le métabolisme des hépatocytes est trop dégradé pour permettre une expression protéique détectable. La viabilité *in vitro* des hépatocytes semble limitée à quelques heures et leur maintien efficace passe par l'emploi de systèmes de culture en bioréacteur ou sur une matrice tridimensionnelle (Miranda et al. 2010). En raison de ces difficultés et du potentiel curatif transitoire constaté cliniquement après greffe orthotopique d'hépatocytes, nous avons concentré nos recherches sur les cellules souches mésenchymateuses.

Les cellules souches mésenchymateuses ont un fort potentiel de prolifération et de différenciation, y compris hépatocytaire. Il a de plus été démontré que ces cellules jouent activement un rôle dans le processus de réparation tissulaire via la sécrétion de facteurs paracrines. Nous avons été en mesure d'isoler des CSM murines, de les transduire efficacement et l'expression des transgènes insérés a pu être vérifiée. Des CSM humaines ont aussi pu être transduites. Nous avons ensuite mis au point pour le modèle murin de PCU un protocole de lésion hépatique maîtrisée afin de générer un climat propice à l'implantation et au développement des CSM (Harding 2008; Laconi et Laconi 2002; Lysy et al. 2008a). Ce protocole propose une inhibition de la prolifération des cellules du foie suivie d'une lésion chimique hépatique. Il est apparu après inoculation de CSM murines que ces cellules avaient subi une transformation et étaient capables de former des masses tumorales *in vivo*. Nous avons poursuivi notre effort pour isoler des CSM murines non transformées. Cependant tous les isollements cellulaires ont montré un caryotype hyperploïde, qui est une caractéristique des cellules tumorales (Feldser et al. 2003; Josse et al. 2010; Tusell et al. 2008).

Le caryotype des CSM humaines s'est par contre révélé stable, ce pourquoi nous les avons choisies pour la suite du projet de thérapie génique *ex vivo*. Nous avons mis au point un protocole d'immunosuppression pour le modèle murin de PCU et combiné celui-ci avec la méthode de lésion hépatique en vue de procéder à la xénogreffe. Des CSM transduites surexprimant la PAH ont été greffées par voie splénique, les animaux furent sacrifiés 21 jours plus tard. Aucune cellule provenant de la greffe n'a pu être retrouvée dans le parenchyme hépatique par méthodes PCR et immunohistochimiques. Ces cellules ont soit été rejetées par l'hôte, soit elles n'ont pu s'implanter et ont été éliminées. Une expérience de validation du protocole d'immunosuppression a mis en évidence la possibilité que la voie d'administration orale des drogues immunosuppressives ne présente pas suffisamment de garanties.

Ce projet de thérapie génique de la PCU par transduction *ex vivo* est ambitieux : il est constitué d'une phase de thérapie cellulaire en autogreffe doublé d'une thérapie génique. De par sa complexité, nous avons procédé à de nombreuses mises au point. Le projet n'est en l'état pas terminé ; cependant le travail fourni constitue une base technique sur laquelle s'appuyer pour le futur.

Les CSM ont un avenir prometteur en médecine régénérative. Cependant certaines étapes nous paraissent incontournables avant la complète concrétisation de leur potentiel. Une meilleure caractérisation de cette population cellulaire en fonction du site d'isolement aidera à les utiliser plus efficacement et améliorer la reproductibilité des résultats. Il est démontré que des CSM isolées à partir de moelle osseuse n'ont pas le même potentiel de différenciation que des cellules isolées de tissus adipeux (Meirelles Lda et al. 2009). Dans une même population de CSM, il existe une minorité de clones cellulaires capables de se différencier en adipocytes, chondrocytes et ostéocytes (Farrington-Rock et al. 2004). Ceci souligne l'hétérogénéité à laquelle tout chercheur utilisant des CSM est confronté.

Les progrès de la thérapie génique sont conditionnés par les avancées techniques dans le domaine des vecteurs d'expression. Un vecteur idéal en thérapie génique devrait proposer un rendement de transduction élevé, être robuste physiquement pour un maniement aisé et une bonne reproductibilité, transférer stablement son matériel génétique à la cellule hôte sans présenter de risque de mutation insertionnelle et ne pas susciter de réaction immunitaire. A l'heure actuelle aucun vecteur ne propose toutes ces caractéristiques, il faut donc décider lesquelles sont prioritaires. Nous avons choisi les vecteurs lentiviraux car ceux-ci permettent une intégration stable de leur provirus, sont facilement stockables sous forme concentrée, génèrent peu de réaction immunitaire notamment à l'encontre des

cellules transduites. Cependant les rétrovirus ont montré un risque de mutation insertionnelle dans deux études cliniques (Hacein-Bey-Abina et al. 2008; Hacein-Bey-Abina et al. 2003; Howe et al. 2008). Même si la sous-famille des lentivirus semble plus sûre de ce point de vue (Pauwels et al. 2009), notamment grâce à l'adjonction d'éléments accessoires comme des séquences chromatiniennes isolantes et la modification auto-inactivante des LTR, le risque n'est pas pour l'instant totalement écarté.

En conclusion, nous avons progressé dans la mise au point d'un modèle de traitement alternatif à la PCU ayant comme atout une correction au long terme du déficit métabolique. La PCU n'est pas un cas isolé et d'autres pathologies génétiques d'origine hépatique comme le syndrome de Crigler-Najjar, l'hyperoxalurie de type 1, l'hémophilie pourraient bénéficier des progrès menés pour la PCU. Durant nos investigations, nous avons contribué à une meilleure connaissance de la stabilité *in vitro* des CSM d'origine murine. Notre rapport d'aberrations caryotypiques systématiques chez ces cellules revêt une importance toute particulière en raison de la large utilisation des CSM murines dans les essais expérimentaux en thérapie cellulaire. Il est hasardeux de recueillir des données d'implantation, de prolifération et de potentiel de différenciation à partir de cellules potentiellement transformées. Nous recommandons à chaque laboratoire étudiant les CSM murines d'explorer leur caryotype et décider en conséquence de l'utilisation possible des cellules.

Nous pensons dès lors que la poursuite de l'expérimentation en thérapie génique des pathologies hépatiques passe par l'isolement et la caractérisation de CSM humaines qu'il faudra pré-différencier ou de cellules précurseurs de cellules hépatiques. Ces cellules devraient être transduites *ex vivo* par exemple avec un vecteur lentiviral. Une lésion hépatique chimique telle qu'utilisée dans notre modèle est irréalisable en thérapie humaine, d'autres traitements comme la résection d'un lobe du foie ou la radiothérapie peuvent cependant être envisagés selon la gravité de la pathologie à traiter. Si aucun traitement préparatoire du foie n'est possible, une activité métabolique devra être obtenue via infusion régulière de cellules exprimant stablement et fortement le transgène de manière à enrichir progressivement l'organe en cellules métaboliquement actives.

5 Matériel et méthodes

5.1 Modèles expérimentaux

5.1.1 Lignées animales

La lignée de rats **Wistar** provient de Charles River (France). La lignée murine **BTBR T^{tf}/j** des laboratoires Jackson (USA), les lignées **C57bl6** et **NOD/SCID** de l'Animalerie Centrale GIGA (Belgique).

La lignée murine **BTBR Pah^{enu2}/J** provient des laboratoires Jackson (USA). Cette lignée a été développée à partir de la lignée murine BTBR T^{tf}/j en soumettant celle-ci à un agent génotoxique, l'éthylNitrosurée. La lignée BTBR Pah^{enu2}/J résultante est un modèle de PCU présentant une mutation au site actif de la PAH substituant en position 263 l'acide aminé Phe pour une Ser. La protéine mutée ne montre aucune activité PAH. La colonie a été nourrie classiquement à l'animalerie SPF du GIGA. Dans ces conditions d'hébergement, les animaux homozygotes pour la version mutante du gène codant la Pah (Pah^{-/-}) développent un phénotype similaire à la PCU. Ces animaux voient leur taux sanguin en Phe augmenter en moyenne à 1200 mM, ils présentent un déficit de pigmentation de la fourrure et un poids inférieur à la normale. Les animaux hétérozygotes ne présentent pas de signes de la PCU, situation comparable à la pathologie humaine.

Des sujets mâles homozygotes **1900bp-MBP lacZ** ont été croisés avec des femelles non transgéniques OF-1 (Oncis France Strain 1, Charles River) afin de générer une progéniture hétérozygote. La lignée murine 1900bp-MBP lacZ a été documentée par Stankoff en 2002 (Stankoff et al. 2002). Brièvement, le transgène 1900bp-MBP lacZ permet de quantifier indirectement le degré d'activation du promoteur de la Myelin Basic Protein (MBP) par le biais d'une analyse de l'expression de la protéine β -galactosidase, le produit du gène LacZ. Les lignées 1900bp-MBP lacZ et OF-1 ont été hébergées à l'animalerie de l'unité INSERM U711.

Toute expérimentation animale a été approuvée par le comité d'éthique local (numéros d'agréments : ULg : n°864 ; Cr-lcm : 75-646).

5.1.1.1 Génotypage

La caractérisation génétique de la lignée BTBR Pah^{enu2}/J a été faite par la couleur de la fourrure pour les animaux double mutants (Pah^{-/-}), et par analyse de leur génome pour le discernement des animaux sauvages des hétérozygotes. Pour cette analyse, nous avons procédé à une extraction d'ADN à partir

d'un fragment de tissus provenant de la queue de l'animal en utilisant le kit High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Belgique). La zone du génome présentant potentiellement la mutation enu2, l'exon 7 du gène codant la PAH, a été amplifiée par PCR. Le fragment d'ADN amplifié a ensuite été exposé à l'enzyme de restriction BsmA1 (New England Biolabs Inc., R-U). La mutation enu2 fait apparaître un site de restriction pour cette enzyme, ainsi celle-ci ne clivera le produit PCR qu'à condition que l'animal présente la mutation. Nous avons ensuite séparé les produits PCR sur gel de poly-acrylamide non dénaturant afin de distinguer la taille des fragments générés. La procédure détaillée a été publiée (McDonald et Charlton 1997).

5.1.2 Lignées cellulaires

La lignée HEK-293 est dérivée de cellules embryonnaires de rein humain immortalisées par adénovirus de type 5. La lignée 293 FT est un variant de la lignée 293 exprimant stablement la protéine T du virus SV40 (Invitrogen, Belgique). La lignée HUH-7 est dérivée d'un hépatocarcinome humain (JCRB, Japan). La lignée B16-F10 est dérivée d'un mélanome murin (ATCC via LGC Standards S.à.r.l., France). La lignée MDA-MB-231-luc est dérivée d'un adénocarcinome mammaire. Cette lignée exprime stablement la luciférase (Caliper Life Sciences NV/SA, Belgique).

5.2 Traitements en modèle *in vivo*

5.2.1 Protocoles de lésion hépatique

Toutes les quantités ont été mises au point pour des animaux âgés de 6 à 8 semaines de la lignée murine BTBR Pahenu2/J de génotype homozygote mutant (-/-). La voie d'administration est invariablement intrapéritonéale et le volume injecté ne dépasse jamais 150 µl. Nous avons évalué l'impact du traitement par dosages des marqueurs de lésion hépatique TGO, TGP, LDH et en évaluant le degré de nécrose du parenchyme hépatique. Les dosages ont été réalisés sur échantillon sanguin par le service de Chimie Médicale du CHU Sart Tilman. L'analyse des taux sériques en TGO et TGP a été réalisée par méthode de spectrophotométrie cinétique, des LDH par cinétique enzymatique, l'évaluation de la nécrose par observation de coupes de foie cryoprélevées colorées à l'hématoxyline-éosine (Sigma Aldrich, Belgique) par le Dr P. Delvenne (CHU Sart-Tilman, Anatomie pathologique).

Pour le protocole utilisant l'alcool allylique, ce composé (Sigma Aldrich, Belgique) a été dilué dans du sérum physiologique stérile (NaCl 9‰) de manière à atteindre la dose injectée de 45 mg/kg. Le protocole consiste en deux injections séparées d'une semaine d'intervalle.

Le protocole rétroisine/CCl₄ est structuré comme suit : 4 semaines avant injection des CSM les animaux reçoivent une première dose de 40 mg/kg de rétroisine (Sigma Aldrich, Belgique) diluée dans du sérum physiologique stérile complété par 20% de cyclodextrine (Sigma Aldrich, Belgique). Deux semaines plus tard la même opération est répétée. A 2, 4 et 5 semaines post injection des CSM, une dose de CCl₄ (Sigma Aldrich, Belgique) de 0,3 ml/kg est délivrée. Ce composé est dilué dans de l'huile minérale stérile (Sigma Aldrich, Belgique).

5.2.2 Injection intrasplénique CSM

Les animaux BTBR Pah^{enu2}/J sont anesthésiés par injection sous cutanée de Diazépam (Valium ; Roche, Belgique) à 0,83 mg/kg, suivi d'une injection intrapéritonéale de 100 mg/kg kétamine (Xyl-M ; VMD, Belgique), 12,5 mg/kg de xylazine (Imalgène ; Merial, Belgique). Durant l'anesthésie, une ouverture est pratiquée au travers des plans cutanés et musculaires surplombant la rate de l'animal. Les cellules sont injectées en 2 minutes dans la pointe de la rate via une seringue munie d'une aiguille de 30G. Le volume total de la suspension cellulaire est de 200 µl, les 400000 CSM sont dilués dans du milieu de culture DMEM (Lonza, Belgique). Au retrait de l'aiguille, la pointe de la rate est refermée par un lien de fil de suture résorbable. Les plans musculaires et cutanés sont suturés. Les animaux sont ensuite réveillés par injection d'atipamezole hydrochloride (Antisedan® ; Pfizer, Belgique) à 1 mg/kg et placés sous lampe chauffante jusqu'au réveil complet. Pendant la phase de réveil et durant les deux jours suivant l'injection, une dose de buprénorphine (Temgénic Inj. ; Schering-Plough, Belgique) de 0,1 mg/kg par voie sous cutanée est administrée.

5.2.3 Protocole d'immunosuppression

Le protocole d'immunosuppression s'opère en deux phases. La première s'étend du jour précédant l'injection des CSM jusqu'au 14^{ème} jour post injection, la deuxième de ce 14^{ème} jour jusqu'à la mort du sujet. La voie d'administration est invariablement *per os* via l'eau de boisson en projetant que le volume de boisson d'une souris est de 150 µl par jour.. Durant la première phase les animaux reçoivent une dose journalière de 0,8 mg/kg de rapamycine (Rapamune ; Wyeth, Belgique) et de 4 mg/kg de tacrolimus (Prograft ; Astellas Pharma, Belgique). Durant la deuxième phase l'administration de tacrolimus est maintenue mais à une dose de 6 mg/kg, et la rapamycine est remplacée par le mycophénolate mofétif (MMF) (Cellcept ; Roche, Belgique) à une dose journalière de 400 mg/kg. Les dosages de ces drogues sur échantillons sanguins ont été réalisés par le service de Chimie Médicale du CHU Sart-Tilman. Les dosages sériques du tacrolimus et rapamycine ont été opérés par FPIA (*fluorescence polarization assay*), celui du MMF par: HPLC/DAD (*high performance liquid chromatography with diode array*).

5.2.4 Test du protocole d'immunosuppression

Les animaux BTBR Pah^{enu2}/J sont séparés en deux groupes suivant le traitement immunosuppresseur (I.S.) appliqué, auxquels sont ajoutés un groupe contrôle négatif (BTBR Pah^{enu2}/J sans I.S.) et contrôle positif (souche murine NOD/SCID). Chaque animal reçoit une injection sous cutanée dans chaque flanc de 10⁶ cellules MDA-MB-231-luc en suspension dans 200 µl de Matrigel (BD Biosciences, Belgique). Nous avons évalué 8 semaines après injection des cellules l'ampleur de la greffe grâce au système d'imagerie *in vivo* Xenogen (Caliper Life Sciences, Belgique). Pour ce faire chaque animal a reçu par voie intrapéritonéale une dose de 3 mg de luciférase diluée dans du sérum physiologique stérile (D-luciférase firefly ; Caliper Life Sciences, Belgique). Les analyses au Xenogen ont commencé 12 minutes après injection.

5.2.5 Exposition au BrdU

Afin de marquer les cellules proliférantes du système nerveux central, nous avons administré par voie intrapéritonéale à des animaux BTBR Pah^{enu2}/J âgés de 8 jours deux doses de 100 µg/g de BrdU (Sigma Aldrich, Belgique) à 12 heures d'intervalle. Les individus ont ensuite été euthanasiés 24 heures après la première injection pour analyse.

5.3 Isolements de cellules primaires et cultures

5.3.1 Isolement d'une population cellulaire enrichie en oligodendrocytes

Cette procédure a été décrite par Barbin selon une méthode modifiée de McCarthy et De Vellis (Barbin et al. 2004; McCarthy et de Vellis 1980).

Les cerveaux de 12 rats Wistar âgés d'un jour ont été disséqués et plongés dans du PBS-glucose 6 g/L refroidi sur glace. Le cervelet, les méninges, les bulbes olfactifs ont été enlevés. Les hémisphères cérébraux ont ensuite été grossièrement dissociés au scalpel dans du milieu DMEM glutamax (Invitrogen, Belgique) et dissociés enzymatiquement par incubation des tissus à 37°C pendant 1H avec de la papaïne à 37 U/ml (Worthington, USA). Les tissus fragilisés sont dissociés à la micropipette 1ml, les fragments restants sont éliminés et les cellules sont lavées en plusieurs étapes. Les cellules ont été semées dans 8 T-flasks 75 cm² enduits de poly-L-lysine (40 µg/ml ; Sigma Aldrich, Belgique) avec du milieu de culture DMEM glutamax 10% sérum foetal de veau, pénicilline (100 U/ml) et streptomycine (100 µg/ml) (Invitrogen, Belgique).

Le milieu de culture a été changé deux fois par semaine. Après 10 jours de culture, un tapis composé principalement d'astrocytes s'est formé à la surface du plastique, sur lequel ont poussé des

oligodendrocytes peu différenciés ainsi que de la microglie. Afin de détacher la majorité de cette microglie, les flacons de cultures ont été agités à 150 tpm à température ambiante pendant 1H30. Le milieu de culture a ensuite été immédiatement changé pour empêcher la microglie de ré-adhérer et les flacons remis à l'incubateur pour deux heures minimum. Ceux-ci ont ensuite été sortis, leur bouchon scellé avec du parafilm et agités à 37°C à 260 tpm pendant 16H. Le surnageant a été collecté et transféré pour 20 minutes dans des boîtes de pétri stériles pour bactériologie. Après cette étape visant à éliminer la microglie restante, la seule à adhérer rapidement à un plastique brut, le surnageant a été récolté. Les cellules contenues ont été semées dans du milieu Bottenstein et Sato (Bottenstein et al. 1979) sur du matériel pour culture cellulaire enduit de poly-L-lysine.

Pour déterminer la composition de la population cellulaire obtenue, les cellules ont été semées à une densité de 50000 par lame couvre-objet de 14 mm de diamètre enduite de poly-L-lysine, disposée au fond de plaques 24 puits. La composition a été déterminée après 48H de culture par immunomarquage des différents types cellulaires classiquement retrouvés dans le système nerveux central. Des marquages anti-Olig2 (oligodendrocytes), GFAP (astrocytes), SMI31+32 (neurones), OX42 (microglie) couplés à un marquage nucléaire au DAPI nous ont permis de déterminer la proportion de ces types cellulaires dans le produit d'isolement.

5.3.2 Cultures myélinisantes

Cette technique a été précédemment décrite (Lubetzki et al. 1993; Stankoff et al. 2002). Pour ce type d'expérience, une mère de lignée OF-1 (lignée sauvage) est croisée avec un mâle homozygote de la lignée 1900bp-MBP lacZ et les embryons générés sont prélevés à 15 jours de vie *in utero*. Les hémisphères embryonnaires sont disséqués et dissociés enzymatiquement par une incubation à 37°C pendant 20 min dans du milieu de culture sans sérum de veau fœtal contenant de la trypsine à une concentration de 5 mg/L (Invitrogen, Belgique). La réaction est arrêtée par ajout de sérum de veau fœtal à une dilution finale 1:50 (Invitrogen, Belgique). Les tissus sont dissociés une seconde fois par passage au travers d'un filtre de mailles 63 µm. Les cellules sont alors semées à une densité de 50000 cellules par goutte de 20 µL de milieu DMEM 10% SVF (Invitrogen, Belgique) sur plaques 24 puits pour culture cellulaire. Pour les essais nécessitant un marquage immunocytochimique, les cellules ont été semées sur lames couvre-objet en verre de 14 mm de diamètre, déposées au fond des puits. Quel que soit son type, la surface de culture a toujours été enduite de poly-L-lysine. Les cultures ont été laissées à l'incubateur pendant 45 min. Après ce laps de temps les puits ont été noyés par du milieu Bottenstein et Sato (Bottenstein et al. 1979) supplémenté par 0,5% de SVF, 10 ng/ml de PDGF-AA recombinant (Upstate Biotechnology, France), 100 U/ml pénicilline, 100 µg/ml streptomycine

(Invitrogen, Belgique) additionné du composé à tester : Phe à 5 mM, PP à 74 μ M ou PA à 22 μ M (sauf pour les contrôles). Le milieu de culture a été changé deux fois par semaine et l'exposition aux molécules test a été ininterrompue. Le SVF et le PDGF ont été retirés du milieu après une semaine de culture. Les cultures ont été stoppées à 25 jours de culture, ce qui correspond au pic de myélinisation dans ce type de culture (Charles et al. 2000; Demerens et al. 1999; Stankoff et al. 2002).

5.3.3 Isolement d'hépatocytes primaires murins

Anesthésier l'animal, ouvrir l'abdomen selon la ligne médiane. Poser un cathéter dans la veine cave inférieure, perfuser à 30 ml/min via ce cathéter une solution HBSS sans Ca^{2+} et Mg^{2+} (Invitrogen, Belgique) avec pénicilline 100 U/streptomycine 100 μ g par ml (Invitrogen, Belgique), HEPES 10 mM (Invitrogen, Belgique), EGTA 0,5 mM (Invitrogen, Belgique) à 37°C. Couper la vaine porte, continuer la perfusion 4 à 5 min pour enlever le sang du foie. Perfuser ensuite environ 10 minutes à une vitesse de 15 ml/min avec une solution HBSS avec Ca^{2+} et Mg^{2+} (Invitrogen, Belgique) avec pénicilline 100 U/streptomycine 100 μ g par ml (Invitrogen, Belgique), HEPES 10 mM (Invitrogen, Belgique), Libérase CL Purified enzyme Blend 0,4 mg/ml (Roche Diagnostics, Belgique) et inhibiteur de trypsine 0,03 mg/ml (Sigma Aldrich, Belgique) à 37°C. Quand la capsule du foie se craquelle, disséquer l'organe et le transférer dans une boîte de pétri contenant 30 ml de milieu Williams (Invitrogen, Belgique). Dissocier mécaniquement le foie, filtrer le surnageant et les petits morceaux sur un tamis pour suspension cellulaire 100 μ m (VWR, Belgique). Conserver la suspension cellulaire sur glace. Semer les cellules sur surface recouverte de collagène de type I (BD BioCoat™ Collagen I ; VWR, Belgique) et les cultiver dans du milieu Williams avec 10% SVF (Thermo Fisher Scientific, Belgique), pénicilline 100 U/streptomycine 100 μ g par ml (Invitrogen, Belgique), 170 UI/L Insuline (Lilly, Belgique), 25 μ g/L Epidermal Growth Factor (PeproTech EC Ltd., R-U), 0,5 mg/L Dexaméthasone (Organon, Belgique).

5.3.4 Isolement de CSM murines

La moelle osseuse a été collectée à partir de fémurs et tibias comme précédemment décrit (17 Claire 2010). La purification des CSM a été réalisée par adhérence et passages jusqu'à l'élimination des cellules hématopoïétiques, paramètre analysé par cytométrie en flux. Une étape d'immunodéplétion a été appliquée à certains isolements. Nous avons fait varier la densité cellulaire pendant la culture de 2000 à 15000 cellules/cm².

Sélection négative : les CSM ont été incubées au passage 2 avec des anticorps anti-CD34 murin biotinylés (Serotec, R-U), CD45 et CD11b (BD Pharmingen, Belgique). Des microbilles recouvertes de

streptavidine ont été ajoutées et la suspension cellulaire chargée sur une colonne de séparation MS (Miltenyi Biotech, Pays-Bas).

La composition du milieu utilisé pour chaque isolement est renseignée dans le tableau en figure R 14. Tous les réactifs proviennent de chez Lonza (Belgique) si aucune provenance n'est stipulée. Les milieux ont été supplémentés par ajout de pénicilline 100 U/streptomycine 100 µg par ml (Invitrogen, Belgique), L-glutamine 2 mM (Invitrogen, Belgique) sauf pour le kit Mouse Mesencult Mesenchymal Stem Cell medium (Stem Cell Technologies, France). Autres composés : SVF et sérum équin (Thermo Fisher Scientific, Belgique), Sérum murin (Abcam, R-U), 20 ng/mL Hepatocyte Growth Factor (HGF) et 20 ng/mL Epithelial Growth Factor (EGF) (Peprotech, R-U), 20 ng/mL Leukemia Inhibitory Factor (LIF) (souris ; Sigma Aldrich, Belgique).

5.3.4.1 Cytométrie en flux

4 x 10⁵ CSM ont été incubées avec des anticorps primaires dirigés contre les épitopes murins CD45, CD106, CD34, CD11b, Ly6A/E (Sca-1) ou CD90.2 (Thy1.2). Les anticorps anti-CD11b et CD45 étaient marqués à la phycoérythrine, l'anticorps CD90.2 au FITC. Les anticorps anti-CD106, CD34 et Sca-1 ont été détectés par adjonction d'anticorps secondaires marqués à l'allophycocyanine. Les contrôles négatifs ont été produits par omission de l'anticorps primaire ou avec l'isotype contrôle correspondant. Tous les anticorps proviennent de chez BD Pharmingen excepté l'anti-CD90.2 provenant de eBioSciences (ImmunoSource, Belgique). Les analyses ont été réalisées sur une machine BD FACSCalibur (BD Biosciences, Belgique).

5.3.4.2 Différenciation des CSM

Les milieux de différenciation *Differentiation Media Bulletkit-Osteogenic/Adipogenic* (Lonza, Belgique) ont été utilisés pour réaliser les tests de différenciation ostéocytaire et adipocytaire. Un dosage du dépôt de Ca²⁺ (kit Calcium Stanbio Total Liquicolor ; Medigal, Belgique) et une coloration des lipides à l'aide du colorant Oil Red O (Sigma Aldrich, Belgique) ont permis d'analyser la différenciation ostéocytaire et adipocytaire, respectivement. La différenciation chondrocytaire a été réalisée par culture en culot de 5 x 10⁵ CSM dans un tube polypropylène pendant 21 jours en présence de milieu inducteur de différenciation chondrogénique composé de DMEM avec 100 µg/ml pyruvate (GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Belgique), 500 ng/ml BMP-6, 10 ng/ml TGFβ (Peprotec, London, R -U), dexaméthasone 10⁻⁷ M, 50 µg/ml ascorbate 2-phosphate, 40 µg/ml proline et ITS + 1 premix (Sigma-Aldrich Bornem, Belgique). Les contrôles négatifs de différenciation chondrocytaire ont été réalisés selon le même procédé excepté pour le milieu de culture (DMEM 10% SVF ; GIBCO, Thermo Fisher

Scientific, Belgique). Les amas de CSM ont été fixés au paraformaldéhyde 4% (VWR, Belgique), inclus dans la paraffine et colorés au bleu de Toluidine (Sigma Aldrich, Belgique).

5.4 Vecteur lentiviral

5.4.1 Description

Le vecteur lentiviral original est la construction Lentilox 3.7 qui nous été donnée par L. Van Parijs. Ce vecteur est désormais distribué via l'ATCC (LGC Standards S.à.r.l., France). Nous avons vidé la cassette d'expression, inséré un polylinker et reconstruit celle-ci selon nos besoins. Le promoteur EF1-alpha a été cloné dans sa version minimale. Les promoteurs PFS sont des dons de l'équipe de J. Prieto (Kramer-Prieto 2003). L'ADNc murin de la PAH a été cloné par nos soins à partir d'un extrait d'ARNm rétrotranscrit et amplifié. La séquence IRES provient du virus ECMV (*encephalomyocarditis virus*). Les séquences CMV et eGFP proviennent du vecteur Lentilox 3.7 original.

5.4.2 Production des vecteurs lentiviraux

Toutes les quantités présentées sont mises à l'échelle de un T-Flasks de 175 cm². **Jour 1** : Diviser en 3 des cellules 293 FT de confluence 80%. Milieu de culture DMEM (Invitrogen, Belgique), SVF 10% (Thermo Fisher Scientific, Belgique), pénicilline 100 U/streptomycine 100 µg par ml, L-glutamine 2 mM (Invitrogen, Belgique). **Jour 2** : Changer le milieu avec une version sans sérum du milieu de culture précité. Les cellules devraient être à 50-70% de confluence. Commencer la transfection 4 heures plus tard. Dégeler et homogénéiser les plasmides VSVG, R8.91 et le vecteur. Toutes les solutions doivent être à température ambiante. Préparer un tube Falcon 50 ml contenant 1 ml de tampon salin HEPES (2x concentré ; Sigma Aldrich, Belgique). Mélanger dans un flacon séparé 20 µg du plasmide R8.91, 20 µg du plasmide vecteur, 10 µg du plasmide VSGV, 250 µl CaCl₂ 1 M (Sigma Aldrich, Belgique), ajuster à volume final de 1 ml avec de d'eau. Homogénéiser. Déposer au goutte à goutte le mélange sur le tampon HEPES en agitant le tube. Répandre le mélange sur les cellules 293FT d'un T175. Incuber pendant 24 h. **Jour 3** : changer le milieu. **Jour 4** : Récupérer doucement le milieu de culture dans des tubes Falcon 15 ml, centrifuger 7 min à 2000 tpm (rotor de type swinging bucket préférable). Récolter le surnageant, ajouter 4 µl de DNase (Roche Diagnostics, Belgique) et 20 µl MgCl₂ 1 M pour 20 ml de surnageant. Incuber 15-20 min à 37°C. Filtrer le surnageant par un filtre 45 µm (Sartorius Technologies N.V., Belgique). Transférer le surnageant dans un tube conique pour ultracentrifugation (Analisis, Belgique). Placer les tubes dans le rotor de type SW 27 (Beckman, France), centrifuger 1h30 à 22000 tpm. D'un seul geste, éliminer le surnageant et placer les tubes à l'envers sur du papier absorbant. Essuyer le surnageant résiduel à l'intérieur des tubes sans toucher le culot. Verser 70 µl de PBS sur les

culots, recouvrir de Parafilm (VWR, Belgique) et garder à 4°C durant toute la nuit. **Jour 5** : Resuspendre et collecter les culots dans un tube 1,5 ml. Centrifuger le tube 30 sec à 8000 tpm. Récolter le surnageant et répéter l'opération jusqu'à l'obtention d'un liquide translucide. Faire des aliquotes de 50 µl et les stocker à -70°C.

5.4.3 Titration p24

Utilisation du kit ELISA Innostest™ HIV Antigen mAB (Innogenetics N.V., Belgique) selon les recommandations. Dilutions sériées de 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} pour constituer la droite étalon dans le cas de vecteurs concentrés par ultracentrifugation.

5.4.4 Transduction par vecteur lentiviral

Changer le milieu des cellules à transduire (avec ou sans sérum). Y ajouter la dose désirée de vecteur ainsi que 5 mg/ml de Polybrène (Hexadiméthrine Bromide ; Sigma Aldrich, Belgique). Pour des cellules adhérentes, laisser le vecteur 24H sur les cellules cibles puis changer le milieu. Suivant le type cellulaire, une deuxième dose de vecteur peut être ajoutée. Pour des cellules en suspension, centrifuger les cellules dès l'addition du vecteur à 400 g pendant 40 minutes. Retirer le surnageant et semer classiquement les cellules.

Doses de vecteur utilisées en fonction du type cellulaire : **HEK 293** : 500 ng p24 ; **CSM** murines et humaines : 1200 ng p24 en deux doses ; **hépatocytes** murins : 2000 ng p24 en deux doses si adhérents, 2000 ng p24 une dose si en suspension. Lors de chaque expérience visant à transduire des cellules primaires, des cellules HEK 293 ou HUH-7 ont été transduites parallèlement avec une dose p24 identique afin de vérifier l'efficacité du vecteur.

5.5 Histologie

5.5.1 Traitement des échantillons

Pour toute analyse histologique explorant le système nerveux central, les animaux ont été perfusés par voie intracardiaque avec du sérum physiologique et ensuite avec du PBS 0,1 M (phosphate buffered saline) contenant 4% de paraformaldéhyde (PFA) permettant de fixer les tissus. Les cerveaux ont été disséqués et soumis à une étape de post-fixation dans un bain de PBS 0,1 M-PFA 4% durant 24 heures puis ont été plongés durant 24 heures dans une solution 0,1 M PBS - 20% sucrose permettant de préparer le tissu à la congélation et à la coupe. Finalement les cerveaux ont été congelés dans un bain de 2-méthylbutane refroidit grâce à de la carboglace et transférés pour conservation à -80°C. Les cerveaux ont été coupés au cryostat à une épaisseur de 50 µm et conservés à court terme à -20°C dans

du 0,1 M PBS - 20% sucrose, 1% de polyvinylpyrrolidone et 30% d'éthylène glycol. Tous les réactifs mentionnés proviennent de Sigma Aldrich (Belgique).

Les autres analyses histologiques ont été réalisées par dissection de l'organe, inclusions dans l'O.C.T Compound Tissue-Tek (Sakura Finetek, Belgique) et conservation à -80°C jusqu'à coupe au cryostat à 4 µm ou 50 µm d'épaisseur.

5.5.2 Immunohistochimie

Avant le marquage BrdU, les coupes ont subi un traitement de révélation de l'antigène consistant en une incubation de 20 min à température ambiante dans de l'HCl 2 N suivi d'une neutralisation pendant 10 min dans un tampon borate pH 8,5 et lavage au PBS. Pour les autres marquages, les sections de tissu ont été incubées dans la solution Antigen Retrieval Solution (Dako Belgique nv/sa, Belgique) pendant 10 minutes à 90°C, ensuite refroidies passivement à température ambiante et lavées avec du PBS. Les sites aspécifiques de liaison ont été bloqués par incubation des coupes histologiques dans du PBS - 0,3% triton X100 - 0,25% gélatine pendant 2H à température ambiante. Les marquages proprement dit ont été réalisés par exposition des échantillons de tissus aux anticorps dirigés contre le BrdU (ImmunoSource, Belgique; 1:500), Olig2 (Millipore, Belgique; 1:250), CC-1 (Calbiochem, R-U; 1:250), anti-mitochondries humaines (Millipore, Belgique ; 1 :250), KI-67 humain (clone MIB-1 ; Dako, Belgique ; 1 :100), GFP (Abcam, Belgique ; 1 :200) dilués dans du PBS - 0,3% triton X100 - 0,25% gélatine à 4°C pendant 16H. Les coupes ont ensuite été lavées et incubées pendant 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire approprié dilué 1:500 dans du PBS - 0,3% triton X100 - 0,25% gélatine (Invitrogen, Belgique), suivit du montage des coupes sur lame dans le milieu de montage Prolong® Gold antifade avec DAPI (Invitrogen, Belgique).

5.5.3 Immunocytochimie

Ces cellules ont été cultivées sur lame couvre objet de verre ronde de 14 mm de diamètre. Les échantillons ont été lavés de leur milieu de culture puis traités pendant 10 min avec une solution de PBS (*phosphate buffered saline*) contenant 4% de paraformaldéhyde (PFA ; Sigma Aldrich, Belgique) pour fixation et ensuite de nouveau lavés. Les sites de fixation aspécifiques ont été bloqués par incubation à température ambiante pendant 30 min dans du milieu de culture DMEM (Invitrogen, Belgique) contenant 20% de sérum de chèvre (Millipore, Belgique). Les marquages ont ensuite été réalisés par incubation des cultures avec les anticorps primaires dirigés contre Olig2 (Millipore, Belgique; 1:200), SMI31 et SMI32 (Covance, USA; 1:500), O4 ((Sommer et Schachner 1981) ; 1:4), GFAP (Abcam, Belgique), OX42 (Abcam, Belgique) ou PLP (clone AA3 (Yamamura et al. 1991) ; 1:5) dilués

dans du PBS 0,1M-0,2% triton X100. Le marquage a été révélé par l'incubation des échantillons 30 min à température ambiante avec les anticorps secondaires adéquats dilués dans PBS 0,1M-0,2% triton X100 (Invitrogen, Belgique). Les noyaux cellulaires ont été marqués avec Hoetsch (Sigma Aldrich, Belgique) et les lames couvre objet portant les cultures ont été montés dans du milieu protecteur Fluoromount G (SouthernBiotech, USA).

5.5.4 Prolifération des progéniteurs d'oligodendrocytes (OPC)

La prolifération des OPC a été évaluée chez des animaux BTBR Pah^{enu2}/J double mutants et hétérozygotes à 8 jours de vie. Du BrdU leur a été administré afin de marquer les cellules en prolifération. Le BrdU est un analogue de la thymidine, il peut s'y substituer lors de la phase S de la réplication cellulaire. Les cerveaux de ces animaux ont été découpés au cryostat selon le plan coronal avec une épaisseur de 50 µm par tranches. Des sections traversant de manière semblable la zone sous ventriculaire dorso latérale (ZSV) ont été marquées contre BrdU et Olig2 en immunofluorescence. La partie de la coupe reprenant cette zone a été analysée à l'aide d'un microscope confocal à grossissement 40X en mode Z-stack avec un pas de 1 µm (MRC1024; Bio-Rad, Belgique). Les assemblages d'images générés ont ensuite permis de comptabiliser le nombre de cellules doublement positives pour Olig2 et BrdU (oligodendrocytes proliférants) au sein de la ZSV. Quatre animaux de chaque génotype ont été analysés pour ce paramètre, à raison de deux coupes par animal. Pour chaque coupe, chacune des deux ZSV présentes ont été analysées, montant à quatre Z-stacks par animal et 16 Z-stacks par génotype. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules proliférantes (double positives) par rapport à la population cellulaire Olig2 positive.

5.5.5 Densité oligodendrocytaire

La densité oligodendrocytaire a été évaluée au sein du corps calleux d'animaux BTBR Pah^{enu2}/J de génotype double mutant et sauvage âgés de 60 jours. A partir du cerveau de ces animaux, des coupes histologiques de 50 µm d'épaisseur ont été réalisées selon le plan coronal à l'aide d'un cryostat. Pour chaque animal, deux coupes sériées passant par le corps calleux ont été sélectionnées et des marquages en immunofluorescence CC-1 et contre l'antigène Olig2. Les sections de tissus ont ensuite été analysées par microscopie confocale à grossissement 40X en mode Z-stack avec un pas de 1,3 µm, pour une profondeur de champ totale de 9,1 µm (Fluoview FV1000; Olympus, Allemagne). Sur chaque coupe, trois champs ont été capturés : un champ au centre du corps calleux et deux champs sur les parties latérales du corps calleux, à gauche et à droite. Les cellules doublement positives dans la partie des champs correspondant au corps calleux ont été comptabilisées et divisées par le volume en µm³ représenté par la surface sur le plan X et Y retenue comme faisant partie du corps calleux, multiplié par

la profondeur de champs de 9,1 μm . Les résultats ont été exprimés en densité moyenne par génotype. Quatre animaux de chaque génotype ont été analysés à raison de six stacks par animal.

5.6 Essais

5.6.1 Test de viabilité

Principe : Le MTT de couleur jaune est réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale pour être transformé en formazan qui est lui de couleur violette. Seules les cellules vivantes peuvent exécuter cette transformation.

Pour ce type d'expérience, la population enrichie en oligodendrocytes a été semée dans des plaques 24 puits enduites de poly-L-lysine à une densité de 100000 cellules par puits dans du milieu BS. Phe, PP et PA ont été ajoutés au milieu de culture pour atteindre les concentrations cibles (1,6/5 mM pour la Phe, 2,2/22 μM pour le PP et 7,4/74 μM pour le PA). Après 6 jours d'exposition nous avons ajouté au milieu du MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium ; Sigma Aldrich, Belgique) à 0,5 mg/ml et laissé incuber pendant deux heures. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS et lysées par ajout de 150 μL de DMSO (diméthylsulfoxyde) par puits, qui permet une solubilisation des cristaux de formazan générés. L'ampleur de la conversion du MTT en formazan a été évalué par mesure de l'absorbance à 570 nm du surnageant obtenu. Chaque expérience a présenté des répliques triples et les résultats finaux présentent la moyenne de trois expériences.

5.6.2 Evaluation de l'activité β -galactosidase

Les cultures myélinisantes âgées de 25 jours *in vitro* ont été lavées trois fois avec du PBS 0,1 M. Pour évaluer l'activité β -galactosidase présente dans ces cultures, nous avons employé le Galacto-light system kit (Applied Biosystems, USA). Brièvement, les cultures ont été lysées, les débris ont été écartés par centrifugation et le surnageant a été stocké à -80°C . Lors du test, 30 μL d'extrait ont été mélangés à 70 μL de tampon de réaction, transférés dans une plaque 96 puits en plastique opaque pour incubation à température ambiante pendant 1H dans l'obscurité. Après ce délai, un luminomètre muni d'un microinjecteur (Victor² 1420; Perkin Elmer, Belgique) a été utilisé pour ajouter 100 μL d'accélérateur de réaction, agiter et lire 5 secondes plus tard la lumière émise, pour chaque puits. Les résultats de cette lecture, en coups/seconde, ont été pondérés par la quantité de protéines en μg présente dans l'extrait. Ceci présente une première normalisation palliant à l'éventuelle variance dans la taille des cultures myélinisantes au sein d'une même expérience. Chaque expérimentation a compris un minimum de 5 répliques par condition. Afin de pouvoir comparer des résultats issus de cultures

myélinisantes distinctes ayant des rendements globalement différents, nous avons divisé les résultats des conditions traitées par la moyenne des résultats des conditions contrôles de la même expérience. Le résultat est un rapport quantifiant la variation de l'activité β -galactosidase pour une condition de traitement par rapport à la condition contrôle appariée à ce traitement. Notre but étant de mesurer l'impact des molécules test sur la myélinisation, aucune information n'est perdue. Les rapports issus de trois expériences indépendantes ont ensuite pu être combinés pour former les résultats finaux exprimés en moyenne de ces rapports.

5.6.3 Quantification *in vitro* de la myélogénèse

Les cultures myélinisantes utilisées pour ce type d'expérience ont été cultivées sur lame couvre objet de verre permettant une manipulation aisée lors des immunomarquages. Ces cultures ont été marquées en immunofluorescence contre les antigènes PLP et SMI31/32 (cf. supra). Le marquage PLP a été analysé par microscopie à fluorescence à grossissement 40x. Les segments de gaine de myéline ont été comptés sur toute la surface de chaque culture myélinisante. Pour chaque expérience, 4 à 6 cultures identiques par condition ont été analysées. Afin de pouvoir comparer des résultats provenant de cultures myélinisantes distinctes ayant des rendements globalement différents, nous avons divisé la moyenne des résultats des conditions traitées par la moyenne des résultats des conditions contrôles de la même expérience. Le résultat est un rapport quantifiant la variation de la synthèse de gaines de myéline pour une condition de traitement par rapport à la condition contrôle appariée à ce traitement. Notre but étant de mesurer l'impact des molécules test sur la myélinisation, aucune information n'est perdue. Les rapports issus de trois expériences indépendantes ont ensuite pu être combinés pour former les résultats finaux exprimés en moyenne de ces rapports.

Les mêmes échantillons ont été analysés par voie bioinformatique. Nous avons employé un microscope à fluorescence permettant l'acquisition automatisée de surfaces (Cell[^]R; Olympus, Hamburg, Allemagne) pour photographier l'étendue des cultures. Les images générées ont été analysées grâce à un algorithme d'extractions de gaines basé sur les phases. L'algorithme d'extraction a inclus deux étapes, la génération de lignes directrices et le traçage des gaines. Cette étape de traitement bioinformatique a été l'objet d'une collaboration avec les Docteurs Wu Chaohong et Hong Pengyu, de l'institut Michtom School of Computer Science, Volen Center for Complex Systems, Room 261, Brandeis University Waltham, Massachusetts 02454, USA. Plus d'informations sur la méthodologie employée pourra être trouvée dans leur publication (Wu et al. 2010).

5.6.4 Western blotting anti PAH

Des extraits cellulaires totaux ont été préparés par incubation pendant 40 min sur glace dans un tampon de lyse RIPA (*radioimmune precipitation assay buffer*, 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 1% Triton X-100, 1% sodium déoxycholate, 0,1% SDS, 5 mM iodoacétamide, 2 mM phénylméthylsulfonyl fluoride) et agitation toutes les 5 min. Les échantillons sont ensuite centrifugés 20 min à 14000 tpm à 4°C, le surnageant est ensuite conservé à -20°C. La concentration protéique est déterminée via le kit Micro BCA protein (Thermo Fisher Scientific, Belgique). Pour chaque échantillon l'équivalent de 5 µg de protéines a été séparé sur gel SDS-PAGE 12% puis transférées sur une membrane PVDF (Millipore, USA). La position de la PAH a été révélée par incubation avec un anticorps spécifique (BD, Belgique ; 1 :1000) puis d'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (Dako, Belgique ; 1 :4000) et ensuite via le kit ECL system (Thermo Fisher Scientific, Belgique).

5.6.5 Quantification de l'activité PAH

Des extraits protéique totaux sont préparés par incubation dans un tampon de lyse pendant 40 min sur glace (0,2 M KCl, 0,05 M K₂HPO₄ pH7, 3 mM DTT, 0,7% triton X100, 1% sodium déoxycholate, 0,1% SDS, 5 mM iodoacétamide, 2 mM phénylméthylsulfonyl fluoride) et agitation toutes les 5 min. Les échantillons sont centrifugés à 14000 tpm pendant 20 min à 4°C, le surnageant est conservé à -80°C. La concentration protéique est déterminée via le kit Micro BCA protein (Thermo Fisher Scientific, Belgique). L'activité PAH des extraits ont été déterminés par incubation de l'équivalent de 30 µg de protéines dans un tampon de réaction (0,2 M KCl, 0,04 M K₂HPO₄ pH7, 0,2 mM L-Phe, 10 µg catalase, 4 mM DTT, 100 µM BH₄, 0,1 µCi ¹⁴C(U)-L-Phe (GE Healthcare, Belgique)) et incubation pendant 1h30 à 37°C. La réaction est stoppée par dénaturation, les échantillons sont évaporés sur buvard puis re-suspendus dans de l'éthanol 65% et séparés par chromatographique sur couche mince. Le signal est révélé par autoradiographie via un écran Storage Phosphor et lecture sur Typhoon 9400 (GE Healthcare, Belgique). Méthode décrite par Christensen en 2000 (Christensen et al. 2000).

5.6.6 PCR quantitative et extraction d'ADN génomique

L'ADN génomique des échantillons a été réalisé via le kit High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Belgique) selon les recommandations du fabricant.

PCR quantitatives réalisées sur l'appareil ABI Taqman 7000 en utilisant le kit SYBR Green PCR Mastermix (Applied Biosystems, Belgique).

Liste des amorces utilisées (de 5' à 3') :

LTR : GGAGCTAGAACGATTCGCAGTTA, GGTTGTAGCTGTCCCAGTATTTGTC

GAPDH : GGTGAAGGTCGGTGTCAACGGATT, GATGCCAAAGTTGTCATGGATGACC

Albumine humaine : CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT, TGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTT

Beta-actine : CCTGTGGCATCCATGAAACTAC, CACTGTGTTGGCATAGAGGTCTT

5.7 Réactifs

La L-phénylalanine (Phe) et le sodium phénylpyruvate (PP) ont été achetés chez Sigma Aldrich (Belgique), le sodium-4-phénylacétate (PA) chez SERATEC France). Lors des tests *in vitro* relatifs à la myélinisation, Phe, PP et PA ont été utilisés à des concentrations retrouvées chez les patients atteints de PCU (1,6 mM, 2,2 μ M et 7,4 μ M respectivement) ainsi qu'à des quantités largement supérieures (5 mM, 22 μ M et 74 μ M respectivement).

5.8 Analyse statistique des résultats

Les résultats de la prolifération des OPC et de la densité en oligodendrocytes *in vivo*, de la viabilité des oligodendrocytes, de l'activité β -galactosidase et du nombre/longueur des gaines de myéline *in vitro* ont fait l'objet d'une analyse statistique de type t de Student. Une p-value de 0,05 a été choisie comme seuil de significativité. Ces résultats sont exprimés en moyenne +/- l'écart-type. La corrélation entre les méthodes humaine et bioinformatique ont été estimées en utilisant le coefficient de corrélation linéaire de Pearson.

6 Références

6.1 Liens

Dutta & Goodsell :

http://www.pdb.org/pdb/static.do?p=education_discussion/molecule_of_the_month/pdb61_1.html

Nataf :

<http://histoblog.viabloga.com/texts/le-tissu-nerveux--cours-n-3--2008->

6.2 Références bibliographiques

- Abita JP, Chamras H, Rosselin G, Rey F (1980) Hormonal control of phenylalanine hydroxylase activity in isolated rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 92(3): 912-918.
- Abita JP, Milstien S, Chang N, Kaufman S (1976) In vitro activation of rat liver phenylalanine hydroxylase by phosphorylation. *J Biol Chem* 251(17): 5310-5314.
- Aker M, Tubb J, Groth AC et al (2007) Extended core sequences from the cHS4 insulator are necessary for protecting retroviral vectors from silencing position effects. *Hum Gene Ther* 18(4): 333-343.
- Andersen AE, Avins L (1976) Lowering brain phenylalanine levels by giving other large neutral amino acids. A new experimental therapeutic approach to phenylketonuria. *Arch Neurol* 33(10): 684-686.
- Aragon MC, Gimenez C, Valdivieso F (1982) Inhibition by L-phenylalanine of tyrosine transport by synaptosomal plasma membrane vesicles: implications in the pathogenesis of phenylketonuria. *J Neurochem* 39(4): 1185-1187.
- Arthur A, Zannettino A, Gronthos S (2009) The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair. *J Cell Physiol* 218(2): 237-245.
- Arumugam PI, Scholes J, Perelman N, Xia P, Yee JK, Malik P (2007) Improved human beta-globin expression from self-inactivating lentiviral vectors carrying the chicken hypersensitive site-4 (cHS4) insulator element. *Mol Ther* 15(10): 1863-1871.
- Aurich H, Sgodda M, Kaltwasser P et al (2009) Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut* 58(4): 570-581.
- Aurich I, Mueller LP, Aurich H et al (2007) Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut* 56(3): 405-415.
- Barbin G, Aigrot MS, Charles P et al (2004) Axonal cell-adhesion molecule L1 in CNS myelination. *Neuron Glia Biol* 1(1): 65-72.
- Bassan A, Blomberg MR, Siegbahn PE (2003) Mechanism of dioxygen cleavage in tetrahydrobiopterin-dependent amino acid hydroxylases. *Chemistry* 9(1): 106-115.
- Batshaw ML, Valle D, Bessman SP (1981) Unsuccessful treatment of phenylketonuria with tyrosine. *J Pediatr* 99(1): 159-160.
- Baumann N, Pham-Dinh D (2001) Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 81(2): 871-927.
- Berry HK, Bofinger MK, Hunt MM, Phillips PJ, Guilfoile MB (1982) Reduction of cerebrospinal fluid phenylalanine after oral administration of valine, isoleucine, and leucine. *Pediatr Res* 16(9): 751-755.

- Bessman SP, Williamson ML, Koch R (1978) Diet, genetics, and mental retardation interaction between phenylketonuric heterozygous mother and fetus to produce nonspecific diminution of IQ: evidence in support of the justification hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(3): 1562-1566.
- Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG (2001) Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19(3): 180-192.
- Bick U, Fahrenndorf G, Ludolph AC, Vassallo P, Weglage J, Ullrich K (1991) Disturbed myelination in patients with treated hyperphenylalaninaemia: evaluation with magnetic resonance imaging. *Eur J Pediatr* 150(3): 185-189.
- Birraux J, Wildhaber BE, Jond C, Belli DC, Menzel O (2010) Ex vivo hepatocyte gene therapy: increased biosafety protocol for transduction in suspension with lentiviral vectors and immediate transplantation (SLIT). *Transplantation* 89(1): 127-129.
- Boado RJ, Li JY, Nagaya M, Zhang C, Pardridge WM (1999) Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(21): 12079-12084.
- Bottenstein J, Hayashi I, Hutchings S et al (1979) The growth of cells in serum-free hormone-supplemented media. *Methods Enzymol* 58: 94-109.
- Carr FP, Pogson CI (1981) Phenylalanine metabolism in isolated rat liver cells. Effects of glucagon and diabetes. *Biochem J* 198(3): 655-660.
- Carter KC, Byck S, Waters PJ et al (1998) Mutation at the phenylalanine hydroxylase gene (PAH) and its use to document population genetic variation: the Quebec experience. *Eur J Hum Genet* 6(1): 61-70.
- Cattoglio C, Facchini G, Sartori D et al (2007) Hot spots of retroviral integration in human CD34+ hematopoietic cells. *Blood* 110(6): 1770-1778.
- Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, Piazza A (1993) Demic expansions and human evolution. *Science* 259(5095): 639-646.
- Cavalli-Sforza LL, Piazza A (1993) Human genomic diversity in Europe: a summary of recent research and prospects for the future. *Eur J Hum Genet* 1(1): 3-18.
- Charles P, Hernandez MP, Stankoff B et al (2000) Negative regulation of central nervous system myelination by polysialylated-neural cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(13): 7585-7590.
- Chen CW, Montelatici E, Crisan M et al (2009) Perivascular multi-lineage progenitor cells in human organs: regenerative units, cytokine sources or both? *Cytokine Growth Factor Rev* 20(5-6): 429-434.
- Chen L, Thung SN, Woo SL (2007) Metabolic basis of sexual dimorphism in PKU mice after genome-targeted PAH gene therapy. *Mol Ther* 15(6): 1079-1085.
- Chen L, Woo SL (2005) Complete and persistent phenotypic correction of phenylketonuria in mice by site-specific genome integration of murine phenylalanine hydroxylase cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(43): 15581-15586.
- Chen L, Woo SL (2007) Correction in female PKU mice by repeated administration of mPAH cDNA using phiBT1 integration system. *Mol Ther* 15(10): 1789-1795.
- Christensen HN (1982) Interorgan amino acid nutrition. *Physiol Rev* 62(4 Pt 1): 1193-1233.
- Christensen HN (1986) Where do the depleted plasma amino acids go in phenylketonuria? *Biochem J* 236(3): 929-930.
- Christensen HN (1987) Hypothesis: where the depleted plasma amino acids go in phenylketonuria, and why. *Perspect Biol Med* 30(2): 186-196.
- Christensen R, Kolvraa S, Blaese RM, Jensen TG (2000) Development of a skin-based metabolic sink for phenylalanine by overexpression of phenylalanine hydroxylase and GTP cyclohydrolase in primary human keratinocytes. *Gene Ther* 7(23): 1971-1978.

- Chung JH, Whiteley M, Felsenfeld G (1993) A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell* 74(3): 505-514.
- Chung S, Andersson T, Sonntag KC, Bjorklund L, Isacson O, Kim KS (2002) Analysis of different promoter systems for efficient transgene expression in mouse embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 20(2): 139-145.
- Citron BA, Davis MD, Kaufman S (1992) Purification and biochemical characterization of recombinant rat liver phenylalanine hydroxylase produced in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 3(2): 93-100.
- Crisan M, Yap S, Casteilla L et al (2008) A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 3(3): 301-313.
- Cristiano RJ, Smith LC, Woo SL (1993) Hepatic gene therapy: adenovirus enhancement of receptor-mediated gene delivery and expression in primary hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(6): 2122-2126.
- da Silva Meirelles L, Sand TT, Harman RJ, Lennon DP, Caplan AI (2009) MSC frequency correlates with blood vessel density in equine adipose tissue. *Tissue Eng Part A* 15(2): 221-229.
- Davis MD, Parniak MA, Kaufman S, Kempner E (1996) Structure-function relationships of phenylalanine hydroxylase revealed by radiation target analysis. *Arch Biochem Biophys* 325(2): 235-241.
- Davis MD, Parniak MA, Kaufman S, Kempner E (1997) The role of phenylalanine in structure-function relationships of phenylalanine hydroxylase revealed by radiation target analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(2): 491-495.
- Delvalle JA, Greengard O (1976) The regulation of phenylalanine hydroxylase in rat tissues in vivo. The maintenance of high plasma phenylalanine concentrations in suckling rats: a model for phenylketonuria. *Biochem J* 154(3): 613-618.
- Demerens C, Stankoff B, Zalc B, Lubetzki C (1999) Eliprodil stimulates CNS myelination: new prospects for multiple sclerosis? *Neurology* 52(2): 346-350.
- DiLella AG, Marvit J, Brayton K, Woo SL (1987) An amino-acid substitution involved in phenylketonuria is in linkage disequilibrium with DNA haplotype 2. *Nature* 327(6120): 333-336.
- Ding Z, Georgiev P, Thony B (2006) Administration-route and gender-independent long-term therapeutic correction of phenylketonuria (PKU) in a mouse model by recombinant adeno-associated virus 8 pseudotyped vector-mediated gene transfer. *Gene Ther* 13(7): 587-593.
- Ding Z, Harding CO, Rebuffat A, Elzaouk L, Wolff JA, Thony B (2008) Correction of murine PKU following AAV-mediated intramuscular expression of a complete phenylalanine hydroxylating system. *Mol Ther* 16(4): 673-681.
- Ding Z, Harding CO, Thony B (2004) State-of-the-art 2003 on PKU gene therapy. *Mol Genet Metab* 81(1): 3-8.
- DiSilvestre D, Koch R, Groffen J (1991) Different clinical manifestations of hyperphenylalaninemia in three siblings with identical phenylalanine hydroxylase genes. *Am J Hum Genet* 48(5): 1014-1016.
- Donlon J, Kaufman S (1978) Glucagon stimulation of rat hepatic phenylalanine hydroxylase through phosphorylation in vivo. *J Biol Chem* 253(19): 6657-6659.
- Dyer CA, Kendler A, Jean-Guillaume D et al (2000) GFAP-positive and myelin marker-positive glia in normal and pathologic environments. *J Neurosci Res* 60(3): 412-426.
- Dyer CA, Kendler A, Philibotte T, Gardiner P, Cruz J, Levy HL (1996) Evidence for central nervous system glial cell plasticity in phenylketonuria. *J Neuropathol Exp Neurol* 55(7): 795-814.
- Eisensmith RC, Woo SL (1996) Gene therapy for phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 155 Suppl 1: S16-19.
- Epstein CM, Trotter JF, Averbook A, Freeman S, Kutner MH, Elsas LJ (1989) EEG mean frequencies are sensitive indices of phenylalanine effects on normal brain. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 72(2): 133-139.

- Erlandsen H, Fusetti F, Martinez A, Hough E, Flatmark T, Stevens RC (1997) Crystal structure of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase reveals the structural basis for phenylketonuria. *Nat Struct Biol* 4(12): 995-1000.
- Erlandsen H, Stevens RC (1999) The structural basis of phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 68(2): 103-125.
- Fang B, Eisensmith RC, Li XH et al (1994) Gene therapy for phenylketonuria: phenotypic correction in a genetically deficient mouse model by adenovirus-mediated hepatic gene transfer. *Gene Ther* 1(4): 247-254.
- Farrington-Rock C, Crofts NJ, Doherty MJ, Ashton BA, Griffin-Jones C, Canfield AE (2004) Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation* 110(15): 2226-2232.
- Feldser DM, Hackett JA, Greider CW (2003) Telomere dysfunction and the initiation of genome instability. *Nat Rev Cancer* 3(8): 623-627.
- Fleming JE, Jr., Haynesworth SE, Cassiede P, Baber MA, Caplan AI (1998) Monoclonal antibody against adult marrow-derived mesenchymal stem cells recognizes developing vasculature in embryonic human skin. *Dev Dyn* 212(1): 119-132.
- Garrison JC, Wagner JD (1982) Glucagon and the Ca²⁺-linked hormones angiotensin II, norepinephrine, and vasopressin stimulate the phosphorylation of distinct substrates in intact hepatocytes. *J Biol Chem* 257(21): 13135-13143.
- Grenett HE, Ledley FD, Reed LL, Woo SL (1987) Full-length cDNA for rabbit tryptophan hydroxylase: functional domains and evolution of aromatic amino acid hydroxylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(16): 5530-5534.
- Guldberg P, Levy HL, Hanley WB et al (1996) Phenylalanine hydroxylase gene mutations in the United States: report from the Maternal PKU Collaborative Study. *Am J Hum Genet* 59(1): 84-94.
- Guo D, Fu T, Nelson JA, Superina RA, Soriano HE (2002) Liver repopulation after cell transplantation in mice treated with retrorsine and carbon tetrachloride. *Transplantation* 73(11): 1818-1824.
- Guthrie R, Susi A (1963) A Simple Phenylalanine Method for Detecting Phenylketonuria in Large Populations of Newborn Infants. *Pediatrics* 32: 338-343.
- Guttler F, Guldberg P, Henriksen KF, Mikkelsen I, Olsen B, Lou H (1993) Molecular basis for the phenotypical diversity of phenylketonuria and related hyperphenylalaninaemias. *J Inherit Metab Dis* 16(3): 602-604.
- Guttler F, Kuhl C, Pedersen L, Paby P (1978) Effects of oral phenylalanine load on plasma glucagon, insulin, amino acid and glucose concentrations in man. *Scand J Clin Lab Invest* 38(3): 255-260.
- Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP et al (2008) Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* 118(9): 3132-3142.
- Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M et al (2003) LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302(5644): 415-419.
- Harding C (2008) Progress toward cell-directed therapy for phenylketonuria. *Clin Genet* 74(2): 97-104.
- Harding CO, Gillingham MB, Hamman K et al (2006) Complete correction of hyperphenylalaninemia following liver-directed, recombinant AAV2/8 vector-mediated gene therapy in murine phenylketonuria. *Gene Ther* 13(5): 457-462.
- Held PK, Olivares EC, Aguilar CP, Finegold M, Calos MP, Grompe M (2005) In vivo correction of murine hereditary tyrosinemia type I by phiC31 integrase-mediated gene delivery. *Mol Ther* 11(3): 399-408.
- Herrero E, Aragon MC, Gimenez C, Valdivieso F (1983) Inhibition by L-phenylalanine of tryptophan transport by synaptosomal plasma membrane vesicles: implications in the pathogenesis of phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 6(1): 32-35.
- High K, Manno C, Sabatino D et al (2004) Immune responses to AAV and to Factor IX in a phase I study of AAV-mediated, liver-directed gene transfer for hemophilia B. *Molecular Therapy* 9: S383-S384.

- Hoeksma M, Reijngoud DJ, Pruim J, de Valk HW, Paans AM, van Spronsen FJ (2009) Phenylketonuria: High plasma phenylalanine decreases cerebral protein synthesis. *Mol Genet Metab* 96(4): 177-182.
- Horster F, Schwab MA, Sauer SW et al (2006) Phenylalanine reduces synaptic density in mixed cortical cultures from mice. *Pediatr Res* 59(4 Pt 1): 544-548.
- Howe SJ, Mansour MR, Schwarzwaelder K et al (2008) Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest* 118(9): 3143-3150.
- Huttenlocher PR (2000) The neuropathology of phenylketonuria: human and animal studies. *Eur J Pediatr* 159(Suppl 2): S102-106.
- Ingebritsen TS, Cohen P (1983) Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science* 221(4608): 331-338.
- Jedlicki E, Kaufman S, Milstien S (1977) Partial purification and characterization of rat liver phenylalanine hydroxylase phosphatase. *J Biol Chem* 252(21): 7711-7714.
- Jervis GA (1953) Phenylpyruvic oligophrenia deficiency of phenylalanine-oxidizing system. *Proc Soc Exp Biol Med* 82(3): 514-515.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL et al (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418(6893): 41-49.
- Jordan MK, Brunner RL, Hunt MM, Berry HK (1985) Preliminary support for the oral administration of valine, isoleucine and leucine for phenylketonuria. *Dev Med Child Neurol* 27(1): 33-39.
- Joseph B, Dyer CA (2003) Relationship between myelin production and dopamine synthesis in the PKU mouse brain. *J Neurochem* 86(3): 615-626.
- Josse C, Schoemans R, Niessen NA et al (2010) Systematic chromosomal aberrations found in murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* in press.
- Karp JM, Leng Teo GS (2009) Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell* 4(3): 206-216.
- Kaufman S (1989) An evaluation of the possible neurotoxicity of metabolites of phenylalanine. *J Pediatr* 114(5): 895-900.
- Knudsen GM, Hasselbalch S, Toft PB, Christensen E, Paulson OB, Lou H (1995) Blood-brain barrier transport of amino acids in healthy controls and in patients with phenylketonuria. *J Inher Metab Dis* 18(6): 653-664.
- Koepp P (1977) [Phenylalanine metabolites in the urine after oral phenylalanine loading. Significance for the discrimination between classical phenylketonuria and variations of hyperphenylalaninemia (heterozygotes and homozygotes)]. *Fortschr Med* 95(10): 627-631.
- Koepp RA, Mangner T, Betz AL et al (1990) Use of [¹¹C]aminocyclohexanecarboxylate for the measurement of amino acid uptake and distribution volume in human brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 10(5): 727-739.
- Kolf CM, Cho E, Tuan RS (2007) Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* 9(1): 204.
- Kowlessur D, Citron BA, Kaufman S (1996) Recombinant human phenylalanine hydroxylase: novel regulatory and structural properties. *Arch Biochem Biophys* 333(1): 85-95.
- Kozak L, Hrabincova E, Kintz J et al (2006) Identification and characterization of large deletions in the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene by MLPA: evidence for both homologous and non-homologous mechanisms of rearrangement. *Mol Genet Metab* 89(4): 300-309.
- Kramer MG, Barajas M, Razquin N et al (2003) In vitro and in vivo comparative study of chimeric liver-specific promoters. *Mol Ther* 7(3): 375-385.
- Krause W, Epstein C, Averbook A, Dembure P, Elsas L (1986) Phenylalanine alters the mean power frequency of electroencephalograms and plasma L-dopa in treated patients with phenylketonuria. *Pediatr Res* 20(11): 1112-1116.

- Krause W, Halminski M, McDonald L et al (1985) Biochemical and neuropsychological effects of elevated plasma phenylalanine in patients with treated phenylketonuria. A model for the study of phenylalanine and brain function in man. *J Clin Invest* 75(1): 40-48.
- Kwok SC, Ledley FD, DiLella AG, Robson KJ, Woo SL (1985) Nucleotide sequence of a full-length complementary DNA clone and amino acid sequence of human phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry* 24(3): 556-561.
- Laconi E, Laconi S (2002) Principles of hepatocyte repopulation. *Semin Cell Dev Biol* 13(6): 433-438.
- Lee JH, Ilic Z, Sell S (1996) Cell kinetics of repair after allyl alcohol-induced liver necrosis in mice. *Int J Exp Pathol* 77(2): 63-72.
- Lichter-Konecki U, Hipke CM, Konecki DS (1999) Human phenylalanine hydroxylase gene expression in kidney and other nonhepatic tissues. *Mol Genet Metab* 67(4): 308-316.
- Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC (2009) Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 106(6): 984-991.
- Lubetzki C, Demerens C, Anglade P et al (1993) Even in culture, oligodendrocytes myelinate solely axons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(14): 6820-6824.
- Lysy PA, Campard D, Smets F, Najimi M, Sokal EM (2008a) Stem cells for liver tissue repair: current knowledge and perspectives. *World J Gastroenterol* 14(6): 864-875.
- Lysy PA, Najimi M, Stephenne X, Bourgois A, Smets F, Sokal EM (2008b) Liver cell transplantation for Crigler-Najjar syndrome type I: update and perspectives. *World J Gastroenterol* 14(22): 3464-3470.
- Markusic DM, van Til NP, Hiralall JK, Elferink RP, Seppen J (2009) Reduction of liver macrophage transduction by pseudotyping lentiviral vectors with a fusion envelope from *Autographa californica* GP64 and Sendai virus F2 domain. *BMC Biotechnol* 9: 85.
- Martinez A, Knappskog PM, Olafsdottir S et al (1995) Expression of recombinant human phenylalanine hydroxylase as fusion protein in *Escherichia coli* circumvents proteolytic degradation by host cell proteases. Isolation and characterization of the wild-type enzyme. *Biochem J* 306 (Pt 2): 589-597.
- Marvit J, DiLella AG, Brayton K, Ledley FD, Robson KJ, Woo SL (1987) GT to AT transition at a splice donor site causes skipping of the preceding exon in phenylketonuria. *Nucleic Acids Res* 15(14): 5613-5628.
- Matalon R, Michals-Matalon K, Bhatia G et al (2007) Double blind placebo control trial of large neutral amino acids in treatment of PKU: effect on blood phenylalanine. *J Inher Metab Dis* 30(2): 153-158.
- McCarthy KD, de Vellis J (1980) Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 85(3): 890-902.
- McDonald JD, Charlton CK (1997) Characterization of mutations at the mouse phenylalanine hydroxylase locus. *Genomics* 39(3): 402-405.
- Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI (2009) Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 20(5-6): 419-427.
- Michel U, Schmidt E, Batzler U (1990) Results of psychological testing of patients aged 3-6 years. *Eur J Pediatr* 149 Suppl 1: S34-38.
- Miller RH (2002) Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. *Prog Neurobiol* 67(6): 451-467.
- Milstien S, Kaufman S (1975) Studies on the phenylalanine hydroxylase system in vivo. An in vivo assay based on the liberation of deuterium or tritium into the body water from ring-labeled L-phenylalanine. *J Biol Chem* 250(12): 4782-4785.
- Miranda JP, Rodrigues A, Tostoes RM et al (2010) Extending Hepatocyte Functionality for Drug-Testing Applications Using High-Viscosity Alginate-Encapsulated Three-Dimensional Cultures in Bioreactors. *Tissue Eng Part C Methods* in press.

- Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM et al (2006) Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells* 24(4): 1095-1103.
- Mizuguchi S, Takemura S, Minamiyama Y et al (2006) S-allyl cysteine attenuated CCl₄-induced oxidative stress and pulmonary fibrosis in rats. *Biofactors* 26(1): 81-92.
- Moats RA, Scadeng M, Nelson MD (1999) MR imaging and spectroscopy in PKU. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* 5(2): 132-135.
- Modlich U, Bohne J, Schmidt M et al (2006) Cell-culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity. *Blood* 108(8): 2545-2553.
- Moller HE, Weglage J, Wiedermann D, Ullrich K (1998) Blood-brain barrier phenylalanine transport and individual vulnerability in phenylketonuria. *J Cereb Blood Flow Metab* 18(11): 1184-1191.
- Moller LB, Paulsen M, Koch R, Moats R, Guldborg P, Guttler F (2005) Inter-individual variation in brain phenylalanine concentration in patients with PKU is not caused by genetic variation in the 4F2hc/LAT1 complex. *Mol Genet Metab* 86 Suppl 1: S119-123.
- Momma S, Aoyagi M, Rapoport SI, Smith QR (1987) Phenylalanine transport across the blood-brain barrier as studied with the in situ brain perfusion technique. *J Neurochem* 48(4): 1291-1300.
- Montini E, Cesana D, Schmidt M et al (2006) Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat Biotechnol* 24(6): 687-696.
- Mountain JL, Cavalli-Sforza LL (1997) Multilocus genotypes, a tree of individuals, and human evolutionary history. *Am J Hum Genet* 61(3): 705-718.
- Muraglia A, Cancedda R, Quarto R (2000) Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 113 (Pt 7): 1161-1166.
- Neckameyer WS, White K (1992) A single locus encodes both phenylalanine hydroxylase and tryptophan hydroxylase activities in *Drosophila*. *J Biol Chem* 267(6): 4199-4206.
- Nguyen TH, Bellodi-Privato M, Aubert D et al (2005) Therapeutic lentivirus-mediated neonatal in vivo gene therapy in hyperbilirubinemic Gunn rats. *Mol Ther* 12(5): 852-859.
- Nguyen TH, Birraux J, Wildhaber B et al (2006) Ex vivo lentivirus transduction and immediate transplantation of uncultured hepatocytes for treating hyperbilirubinemic Gunn rat. *Transplantation* 82(6): 794-803.
- Nguyen TH, Oberholzer J, Birraux J, Majno P, Morel P, Trono D (2002) Highly efficient lentiviral vector-mediated transduction of nondividing, fully reimplantable primary hepatocytes. *Mol Ther* 6(2): 199-209.
- Okano Y, Eisensmith RC, Guttler F et al (1991) Molecular basis of phenotypic heterogeneity in phenylketonuria. *N Engl J Med* 324(18): 1232-1238.
- Overturf K, Al-Dhalimy M, Tanguay R et al (1996) Hepatocytes corrected by gene therapy are selected in vivo in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. *Nat Genet* 12(3): 266-273.
- Paans AM, Pruim J, Smit GP, Visser G, Willemsen AT, Ullrich K (1996) Neurotransmitter positron emission tomographic-studies in adults with phenylketonuria, a pilot study. *Eur J Pediatr* 155 Suppl 1: S78-81.
- Pardridge WM (1998) Blood-brain barrier carrier-mediated transport and brain metabolism of amino acids. *Neurochem Res* 23(5): 635-644.
- Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K et al (2007) Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One* 2(9): e941.
- Pauwels K, Gijssbers R, Toelen J et al (2009) State-of-the-art lentiviral vectors for research use: risk assessment and biosafety recommendations. *Curr Gene Ther* 9(6): 459-474.
- Peterlin BM, Trono D (2003) Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol* 3(2): 97-107.

- Pfeifer A, Kessler T, Yang M et al (2001) Transduction of liver cells by lentiviral vectors: analysis in living animals by fluorescence imaging. *Mol Ther* 3(3): 319-322.
- Phillips RS, Kaufman S (1984) Ligand effects on the phosphorylation state of hepatic phenylalanine hydroxylase. *J Biol Chem* 259(4): 2474-2479.
- Pietz J, Landwehr R, Kutscha A, Schmidt H, de Sonnevile L, Trefz FK (1995) Effect of high-dose tyrosine supplementation on brain function in adults with phenylketonuria. *J Pediatr* 127(6): 936-943.
- Pluta K, Kacprzak MM (2009) Use of HIV as a gene transfer vector. *Acta Biochim Pol* 56(4): 531-595.
- Pluta K, Luce MJ, Bao L, Agha-Mohammadi S, Reiser J (2005) Tight control of transgene expression by lentivirus vectors containing second-generation tetracycline-responsive promoters. *J Gene Med* 7(6): 803-817.
- Ponder KP, Gupta S, Leland F et al (1991) Mouse hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intrasplenic transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(4): 1217-1221.
- Pontoglio M, Barra J, Hadchouel M et al (1996) Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. *Cell* 84(4): 575-585.
- Puglisi-Allegra S, Cabib S, Pascucci T, Ventura R, Cali F, Romano V (2000) Dramatic brain aminergic deficit in a genetic mouse model of phenylketonuria. *Neuroreport* 11(6): 1361-1364.
- Ramus SJ, Forrest SM, Pitt DB, Saleeba JA, Cotton RG (1993) Comparison of genotype and intellectual phenotype in untreated PKU patients. *J Med Genet* 30(5): 401-405.
- Rehman J, Traktuev D, Li J et al (2004) Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 109(10): 1292-1298.
- Rocha DM, Faloona GR, Unger RH (1972) Glucagon-stimulating activity of 20 amino acids in dogs. *J Clin Invest* 51(9): 2346-2351.
- Rocha JC, Martel F (2009) Large neutral amino acids supplementation in phenylketonuric patients. *J Inherit Metab Dis* 32(4): 472-480.
- Sarkissian CN, Scriver CR, Mamer OA (2000) Measurement of phenyllactate, phenylacetate, and phenylpyruvate by negative ion chemical ionization-gas chromatography/mass spectrometry in brain of mouse genetic models of phenylketonuria and non-phenylketonuria hyperphenylalaninemia. *Anal Biochem* 280(2): 242-249.
- Sato Y, Araki H, Kato J et al (2005) Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* 106(2): 756-763.
- Schindeler S, Ghosh-Jerath S, Thompson S et al (2007) The effects of large neutral amino acid supplements in PKU: an MRS and neuropsychological study. *Mol Genet Metab* 91(1): 48-54.
- Schoemans R, Aigrot MS, Wu C et al (2010) Oligodendrocyte development and myelinogenesis are not impaired by high concentrations of phenylalanine or its metabolites. *J Inherit Metab Dis* 33(2): 113-120.
- Schrepfer S, Deuse T, Lange C et al (2007) Simplified protocol to isolate, purify, and culture expand mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 16(1): 105-107.
- Scriver CR, Cole DE, Houghton SA, Levy HL, Grenier A, Laberge C (1980) Cord-blood tyrosine levels in the full-term phenylketonuric fetus and the "justification hypothesis". *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(10): 6175-6178.
- Scriver CR, Gregory DM, Sovetts D, Tissenbaum G (1985) Normal plasma free amino acid values in adults: the influence of some common physiological variables. *Metabolism* 34(9): 868-873.
- Scriver CR, Kaufman S (2008) Hyperphenylalaninemia: phenylalanine hydroxylase deficiency. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th edn. New York: McGraw-Hill, 1667-1724.
- Scriver CR, Waters PJ (1999) Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria. *Trends Genet* 15(7): 267-272.
- Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS (2005) Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 328(1): 258-264.

- Seppen J, Rijnberg M, Cooreman MP, Oude Elferink RP (2002) Lentiviral vectors for efficient transduction of isolated primary quiescent hepatocytes. *J Hepatol* 36(4): 459-465.
- Sgodda M, Aurich H, Kleist S et al (2007) Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from rat peritoneal adipose tissue in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* 313(13): 2875-2886.
- Shaw DW, Maravilla KR, Weinberger E, Garretson J, Trahms CM, Scott CR (1991) MR imaging of phenylketonuria. *AJNR Am J Neuroradiol* 12(3): 403-406.
- Shefer S, Tint GS, Jean-Guillaume D et al (2000) Is there a relationship between 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase activity and forebrain pathology in the PKU mouse? *J Neurosci Res* 61(5): 549-563.
- Shi S, Gronthos S (2003) Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 18(4): 696-704.
- Silberberg DH (1967) Phenylketonuria metabolites in cerebellum culture morphology. *Arch Neurol* 17(5): 524-529.
- Smets F, Najimi M, Sokal EM (2008) Cell transplantation in the treatment of liver diseases. *Pediatr Transplant* 12(1): 6-13.
- Smith CB, Kang J (2000) Cerebral protein synthesis in a genetic mouse model of phenylketonuria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(20): 11014-11019.
- Smith ML, Hanley WB, Clarke JT et al (1998) Randomised controlled trial of tyrosine supplementation on neuropsychological performance in phenylketonuria. *Arch Dis Child* 78(2): 116-121.
- Sokal EM (2006) Liver transplantation for inborn errors of liver metabolism. *J Inher Metab Dis* 29(2-3): 426-430.
- Sommer I, Schachner M (1981) Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. *Dev Biol* 83(2): 311-327.
- Stankoff B, Aigrot MS, Noel F, Wattilliaux A, Zalc B, Lubetzki C (2002) Ciliary neurotrophic factor (CNTF) enhances myelin formation: a novel role for CNTF and CNTF-related molecules. *J Neurosci* 22(21): 9221-9227.
- Strom SC, Chowdhury JR, Fox IJ (1999) Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease. *Semin Liver Dis* 19(1): 39-48.
- Surtees R, Blau N (2000) The neurochemistry of phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 159(Suppl 2): S109-113.
- Tessari P, Deferrari G, Robaudo C et al (1999) Phenylalanine hydroxylation across the kidney in humans rapid communication. *Kidney Int* 56(6): 2168-2172.
- Thompson AJ, Smith I, Kendall BE, Youl BD, Brenton D (1991) Magnetic resonance imaging changes in early treated patients with phenylketonuria. *Lancet* 337(8751): 1224.
- Thony B (2010) Long-term correction of murine phenylketonuria by viral gene transfer: liver versus muscle. *J Inher Metab Dis* In press.
- Togel F, Weiss K, Yang Y, Hu Z, Zhang P, Westenfelder C (2007) Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 292(5): F1626-1635.
- Tolar J, Nauta AJ, Osborn MJ et al (2007) Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 25(2): 371-379.
- Trefz FK, Burgard P, Konig T et al (1993) Genotype-phenotype correlations in phenylketonuria. *Clin Chim Acta* 217(1): 15-21.
- Tusell L, Soler D, Agostini M, Pampalona J, Genesca A (2008) The number of dysfunctional telomeres in a cell: one amplifies; more than one translocate. *Cytogenet Genome Res* 122(3-4): 315-325.
- Ullrich K, Moller H, Weglage J et al (1994) White matter abnormalities in phenylketonuria: results of magnetic resonance measurements. *Acta Paediatr Suppl* 407: 78-82.
- Vajro P, Strisciuglio P, Houssin D et al (1993) Correction of phenylketonuria after liver transplantation in a child with cirrhosis. *N Engl J Med* 329(5): 363.

- van Spronsen FJ, Enns GM (2010) Future treatment strategies in phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 99 Suppl 1: S90-95.
- van Spronsen FJ, Hoeksma M, Reijngoud DJ (2009) Brain dysfunction in phenylketonuria: is phenylalanine toxicity the only possible cause? *J Inher Metab Dis* 32(1): 46-51.
- van Til NP, Markusic DM, van der Rijt R et al (2005) Kupffer cells and not liver sinusoidal endothelial cells prevent lentiviral transduction of hepatocytes. *Mol Ther* 11(1): 26-34.
- Vieyra DS, Goodell MA (2007) Pluripotentiality and conditional transgene regulation in human embryonic stem cells expressing insulated tetracycline-ON transactivator. *Stem Cells* 25(10): 2559-2566.
- Walter JH, Tyfield LA, Holton JB, Johnson C (1993) Biochemical control, genetic analysis and magnetic resonance imaging in patients with phenylketonuria. *Eur J Pediatr* 152(10): 822-827.
- Wasinger EC, Mitic N, Hedman B, Caradonna J, Solomon EI, Hodgson KO (2002) X-ray absorption spectroscopic investigation of the resting ferrous and cosubstrate-bound active sites of phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry* 41(20): 6211-6217.
- Waters PJ, Parniak MA, Akerman BR, Scriver CR (2000) Characterization of phenylketonuria missense substitutions, distant from the phenylalanine hydroxylase active site, illustrates a paradigm for mechanism and potential modulation of phenotype. *Mol Genet Metab* 69(2): 101-110.
- Waters PJ, Parniak MA, Nowacki P, Scriver CR (1998) In vitro expression analysis of mutations in phenylalanine hydroxylase: linking genotype to phenotype and structure to function. *Hum Mutat* 11(1): 4-17.
- Weglage J, Moller HE, Wiedermann D, Cipic-Schmidt S, Zschocke J, Ullrich K (1998a) In vivo NMR spectroscopy in patients with phenylketonuria: clinical significance of interindividual differences in brain phenylalanine concentrations. *J Inher Metab Dis* 21(1): 81-82.
- Weglage J, Wiedermann D, Moller H, Ullrich K (1998b) Pathogenesis of different clinical outcomes in spite of identical genotypes and comparable blood phenylalanine concentrations in phenylketonurics. *J Inher Metab Dis* 21(2): 181-182.
- Weiss KM, Buchanan AV (2003) Evolution by phenotype: a biomedical perspective. *Perspect Biol Med* 46(2): 159-182.
- Williams RA, Mamotte CD, Burnett JR (2008) Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. *Clin Biochem Rev* 29(1): 31-41.
- Wretborn M, Humble E, Ragnarsson U, Engstrom L (1980) Amino acid sequence at the phosphorylated site of rat liver phenylalanine hydroxylase and phosphorylation of a corresponding synthetic peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 93(2): 403-408.
- Wu C, Schulte J, Sepp KJ, Littleton JT, Hong P (2010) Automatic Robust Neurite Detection and Morphological Analysis of Neuronal Cell Cultures in High-content Screening. *Neuroinformatics* in press.
- Wu YM, Joseph B, Gupta S (2006) Immunosuppression using the mTOR inhibition mechanism affects replacement of rat liver with transplanted cells. *Hepatology* 44(2): 410-419.
- Yamamura T, Konola JT, Wekerle H, Lees MB (1991) Monoclonal antibodies against myelin proteolipid protein: identification and characterization of two major determinants. *J Neurochem* 57(5): 1671-1680.
- Zychlinski D, Schambach A, Modlich U et al (2008) Physiological promoters reduce the genotoxic risk of integrating gene vectors. *Mol Ther* 16(4): 718-725.

7 Annexes

7.1 Article 1

Schoemans R, Aigrot MS, Wu C et al (2010) Oligodendrocyte development and myelinogenesis are not impaired by high concentrations of phenylalanine or its metabolites. *J Inherit Metab Dis* 33(2): 113-120.

7.2 Article 2

Josse C, Schoemans R, Niessen NA et al (2010) Systematic chromosomal aberrations found in murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* in press.