

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

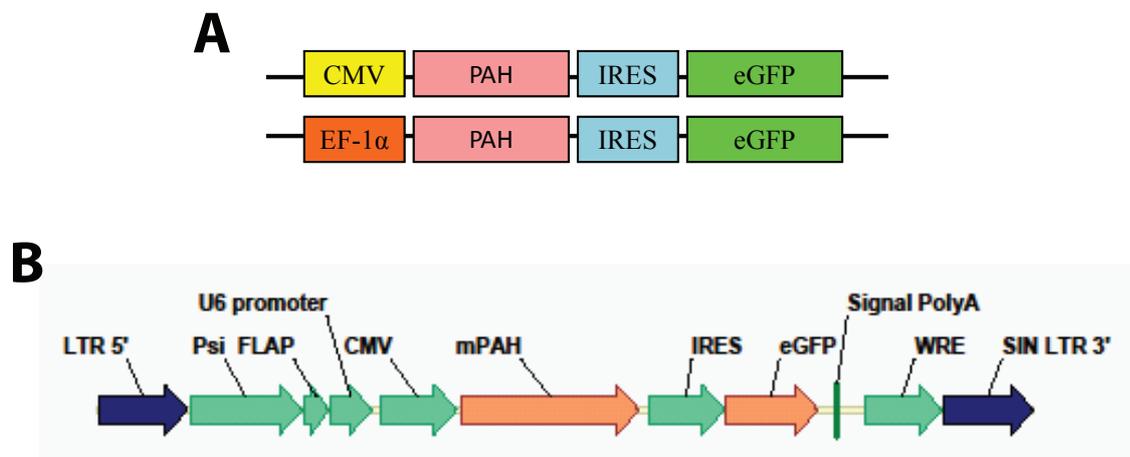


Figure R 7 : **A.** Schéma représentant les constructions lentivirales générées. Le promoteur CMV ou EF-1 α contrôle la transcription d'une cassette d'expression composée de l'ADNc codant la PAH suivie d'une séquence IRES puis l'ADNc codant l'eGFP. **B.** Représentation schématique de l'entièreté d'un provirus.

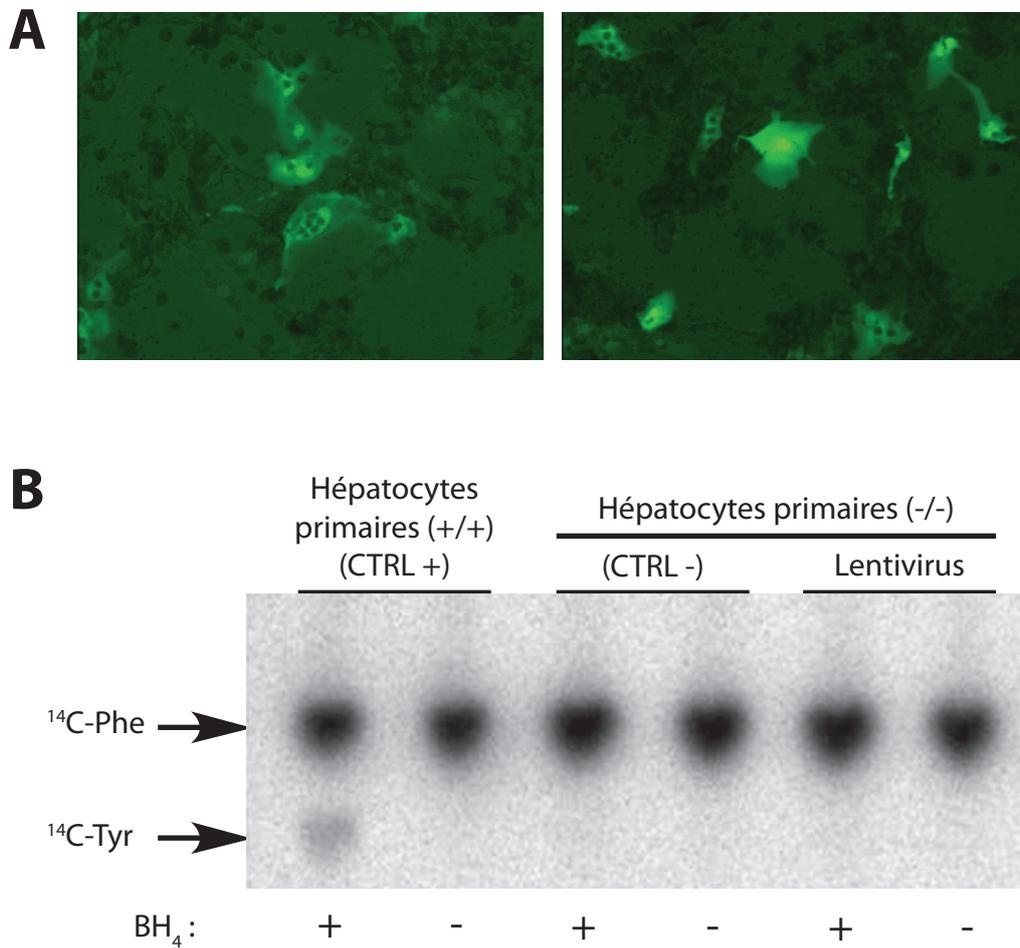


Figure R 8: A. Test de transduction d'hépatocytes primaires murins par vecteur lentiviral CMV-PAH-IRES-eGFP. Test de transduction en deux étapes par exposition à 2000 ng p24 de vecteur lentiviral à 24 h d'intervalle. Les images sont deux champs représentatifs après transduction. Images prises en microscopie à fluorescence en lumière bleue, 48h après la deuxième charge virale. **B.** Test de l'activité de la phénylalanine hydroxylase (PAH). Les hépatocytes primaires BTBR $\text{Pah}^{\text{enu}2}/\text{J}$ de génotype sauvage (+/+) montrent une conversion de Phe en Tyr et donc une activité PAH. Les hépatocytes primaires murins BTBR $\text{Pah}^{\text{enu}2}/\text{J}$ double mutants (-/-) ne présentent aucune activité PAH et servent de condition contrôle négative. Ces cellules ne permettent aucune transformation de Phe en Tyr après essai de transduction par le vecteur lentiviral de construction EF-1 α -PAH-IRES-eGFP.

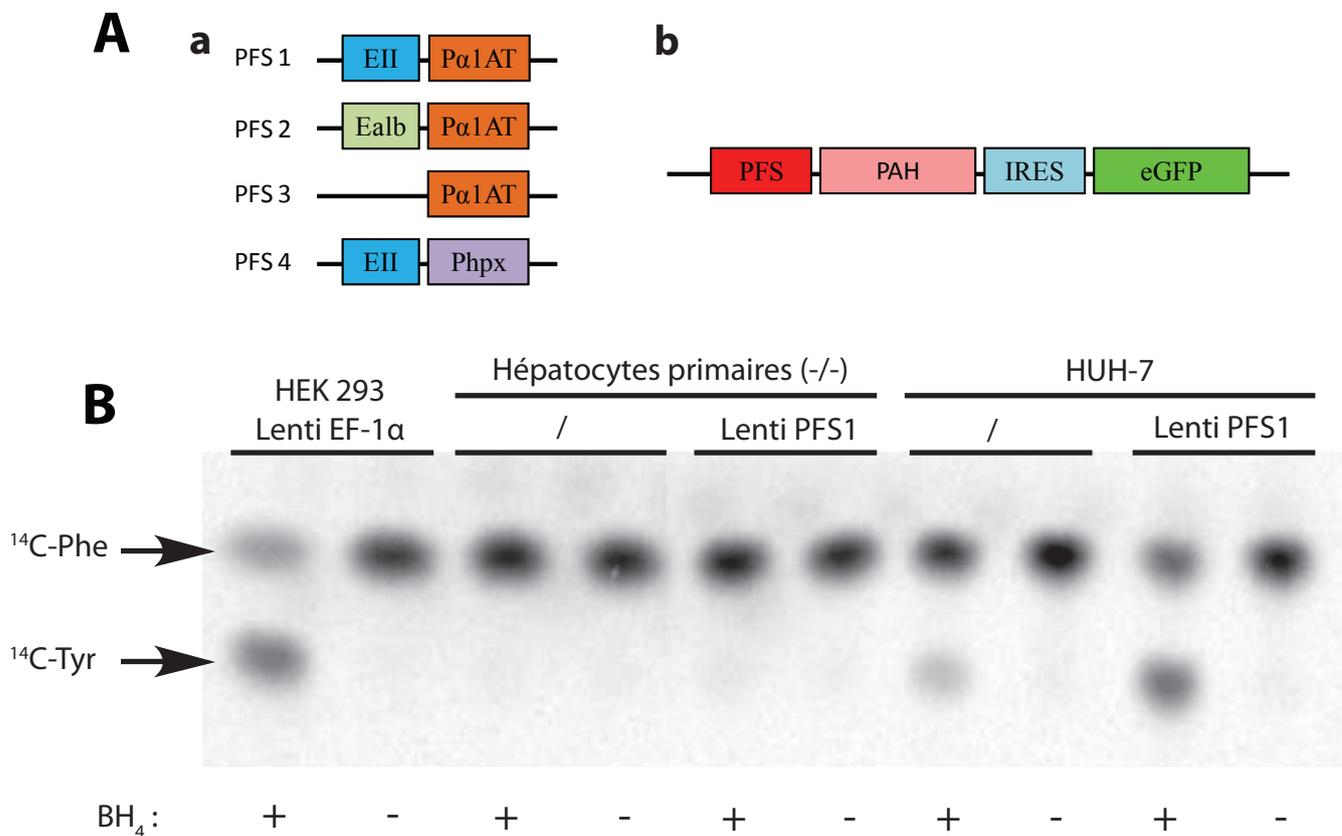
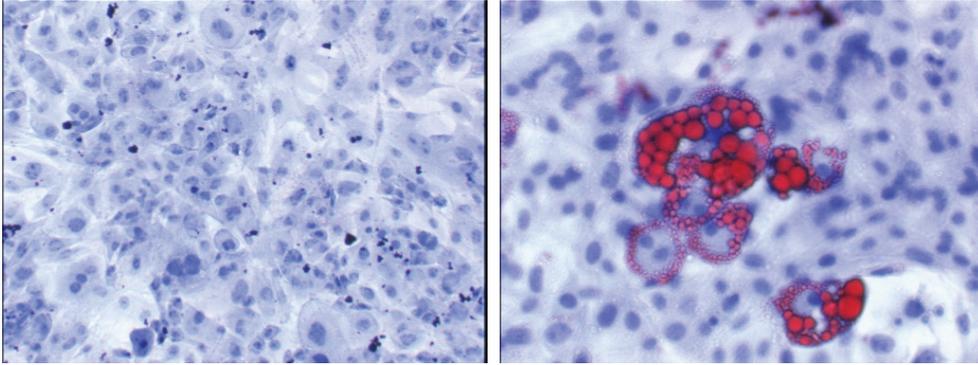
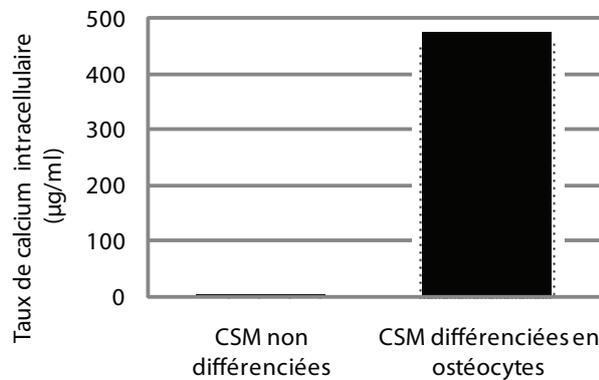


Figure R 9 : **A. a.** Composition des promoteurs foie-spécifiques (PFS). Promoteurs : alpha1-antitrypsine (P α 1AT), hémopexine (Phpx). Enhancers : second enhancer du virus de l'hépatite B (EII), région régulatrice distale de l'albumine (Ealb). **b.** Schéma générique de la cassette d'expression des constructions lentivirales à promoteur foie-spécifique (PFS). Les PFS de 1 à 4 ont été intégrés à la cassette. **B.** Test de l'activité de la phénylalanine hydroxylase (PAH). La lignée cellulaire HEK 293 transduite par le vecteur lentiviral EF-1 α -Pah-IRES-eGFP montre une forte activité PAH (contrôle positif de réaction). Les hépatocytes primaires murins BTBR Pah^{enu2/J} double mutants (-/-) n'exposent aucune activité PAH et servent de condition contrôle négative. Ces cellules ne permettent aucune transformation de Phe en Tyr après essai de transduction par le vecteur lentiviral de construction PFS1-PAH-IRES-eGFP. La lignée HUH-7 provient d'un hépatocarcinome et exhibe une activité PAH augmentée après transduction avec le vecteur PFS1-PAH-IRES-eGFP.

A CSM non différenciées CSM différenciées en adipocyte



B Différenciation ostéocytaire



C CSM non différenciées CSM différenciées en chondrocytes

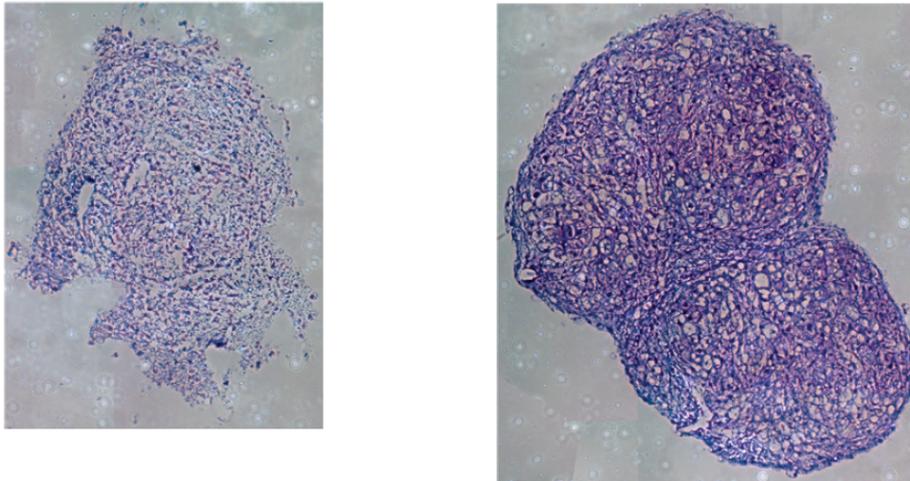


Figure R 11 : Expériences de différenciation de CSM murines. **A**. Différenciation adipocytaire. Images de microscopie en lumière blanche. La coloration rouge révèle la présence de lipides. **B**. Différenciation ostéocytaire. Mesure du taux intracellulaire de calcium. **C**. Différenciation chondrocytaire. Coloration des agrégats cellulaires au bleu de toluidine.

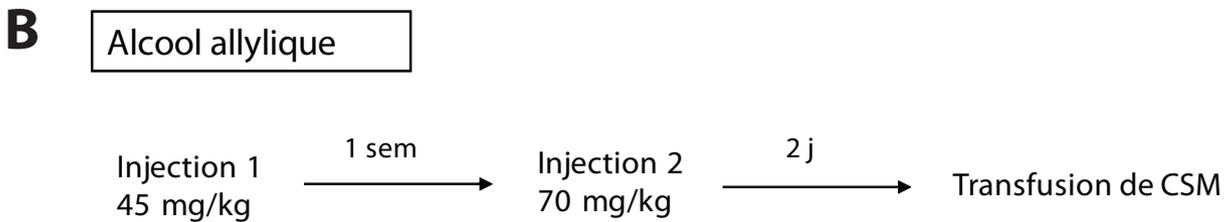
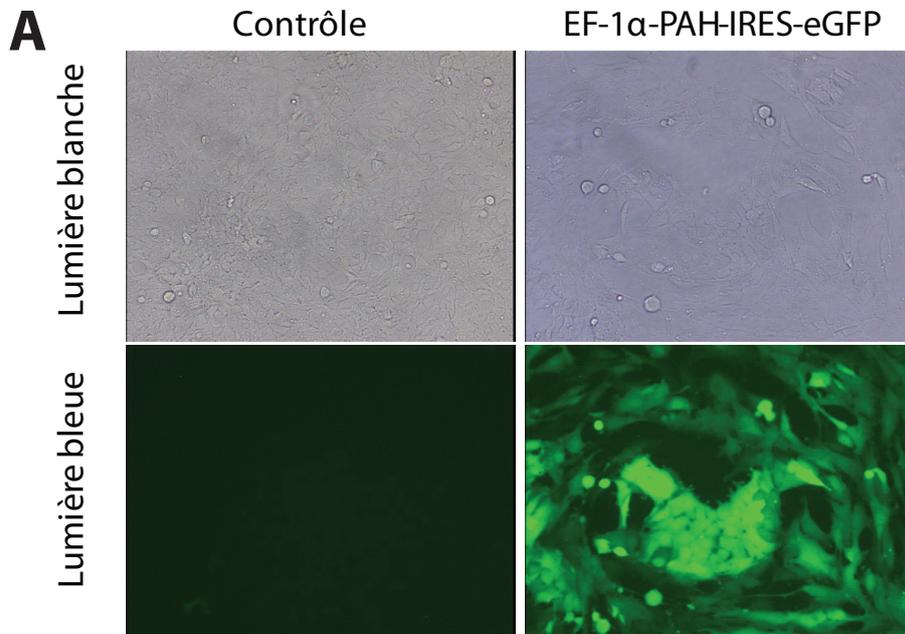
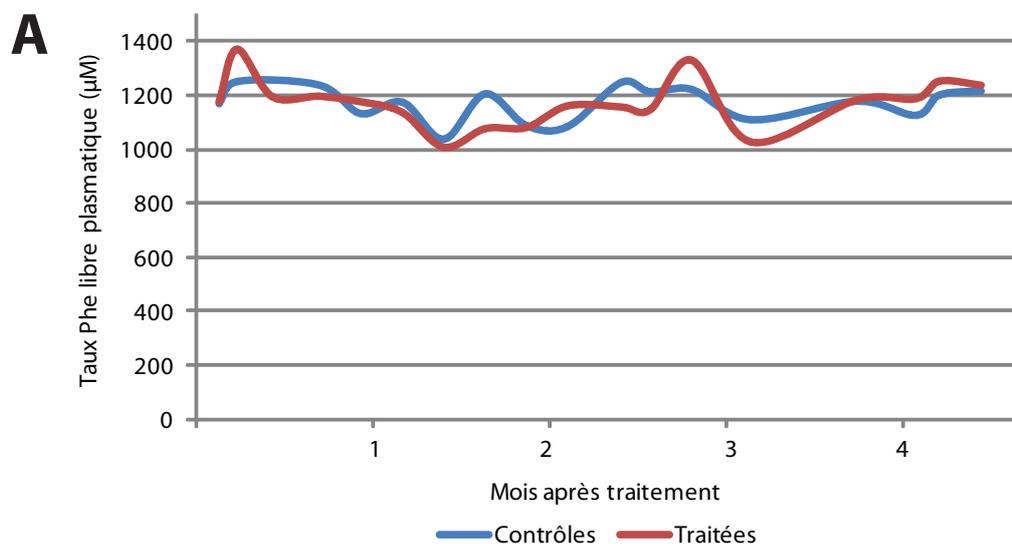
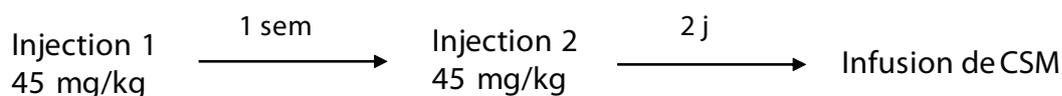


Figure R 12 : **A.** CSM murines transduites par 750ng, et 24h plus tard 1600ng p24 de vecteur lentiviral EF-1 α -PAH-IRES-eGFP. Images prises en lumière blanche ou bleue 48h après la première addition de vecteur.

B. Schéma du protocole de lésion hépatique à l'alcool allylique. La voie d'injection est intrapéritonéale. Intervalles en semaines (sem) ou jours (j).



B Alcool allylique



Rétrorsine /CCl₄

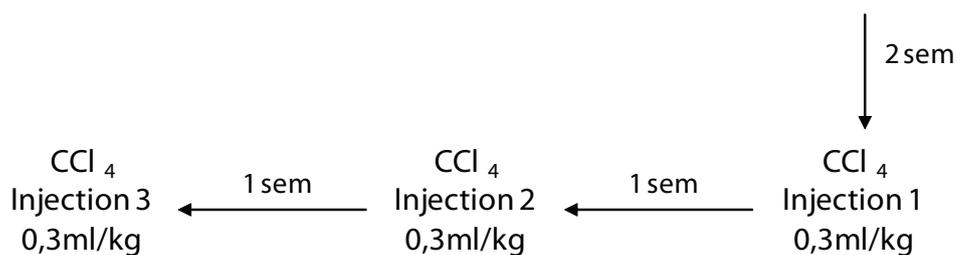
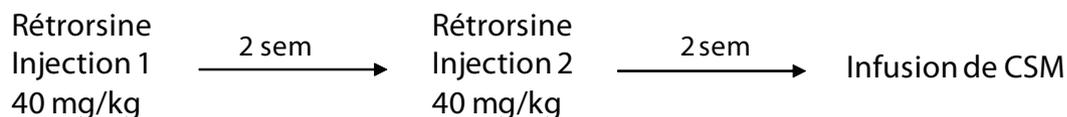


Figure R 13 : **A.** Taux en Phe libre plasmatique chez les animaux BTBR Pah^{enu2}/J à activité PAH déficiente (-/-) traités par greffe de CSM murines BTBR Pah^{enu2}/J de génotype sauvage +/+. Le suivi s'est étalé sur quatre mois post traitement. **B.** Représentation schématique des protocoles de lésion hépatique mis au point. La voie d'injection des agents chimiques est invariablement intrapéritonéale. Intervalles en semaines (sem) ou jours (j).

Souche	Durée de culture (mois)	Sélection négative	Nombre de passages	Milieu de culture	Cytométrie de flux							Différenciation			Nombre de chromosomes			
					CD45	CD34	CD11b	CD106	Sca-1	CD90.2	Osteo	Adipo	Chondro	mitoses	40	70	120	
BTRR -Pah ^{enu2} /J	5,2	oui	5	DMEM/F12+10% SVF +10% SC +20ng/mL HGF								ND	ND	ND	25	0	25	0
BTRR -Pah ^{enu2} /J	2,1	oui	2	DMEM/F12+10% SVF +10% SC								ND	ND	ND	17	0	16	1
BTRR -Pah ^{enu2} /J	2,1	oui	3	DMEM/F12+10% SVF +10% SC								ND	ND	ND	13	0	13	0
BTRR -Pah ^{enu2} /J	2,9	oui	2	DMEM/F12+10% SVF +10% SC								ND	ND	ND	10	0	10	0
BTRR -Pah ^{enu2} /J	5,0	oui	6	DMEM/F12+10% SVF +10% SC								ND	ND	ND	24	0	21	3
BTRR -Pah ^{enu2} /J	3,2	oui	3	DMEM/F12+10% SVF +10% SC +20ng/mL HGF	0,4%	3,8%	4,0%	81,1%	75,6%	80,6%		+	-	+	12	2	10	0
BTRR -Pah ^{enu2} /J	1,8	oui	3	DMEM/F12+10% SVF +10% SC +20ng/mL HGF	0,0%	1,0%	0,2%	99,2%	97,2%	91,1%		+	-	-	9	1	7	0
BTRR -Pah ^{enu2} /J	3,6	oui	4	DMEM/F12+10% SVF +10% SC +20ng/mL HGF	0,1%	0,2%	0,1%	98,6%	97,1%	63,9%		+	-	+	23	0	23	0
BTRR -Pah ^{enu2} /J	2,6	oui	3	DMEM/F12+10% SVF +10% SC								ND	ND	ND	10	4	6	0
BTRR T +f/J	4,1	non	5	DMEM/F12+10% SVF +10% SC								ND	ND	ND	4	0	0	4
BTRR T +f/J	2,7	non	4	DMEM/F12+10% SVF +10% SC								ND	ND	ND	16	7	9	0
BTRR T +f/J	3,5	non	4	DMEM/F12+10% SVF +10% SC								ND	ND	ND	6	0	4	2
C57BL/6	3,3	non	4	DMEM/F12+10% SVF +10% SC								ND	ND	ND	15	0	13	2
C57BL/6	/	non	7	DMEM+10% SVF								ND	ND	ND	15	1	9	5
C57BL/6	/	non	6	DMEM+10% SVF								ND	ND	ND	12	0	10	2
BTRR -Pah ^{enu2} /J	3,4	non	13	Murine Mesencult Mesenchymal Stem Cell	0,9%	5,5%	0,2%	30,8%	40,8%	0,9%		+	+	-	13	0	11	2
BTRR -Pah ^{enu2} /J	3,5	non	10	Murine Mesencult Mesenchymal Stem Cell	2,0%	85,9%	1,8%	90,7%	92,1%	83,1%		+	+	+	20	0	20	0
BTRR -Pah ^{enu2} /J	3,5	non	10	Murine Mesencult Mesenchymal Stem Cell	1,2%	12,9%	2,1%	72,4%	71,5%	0,1%		ND	ND	ND	22	0	2	20
BTRR -Pah ^{enu2} /J	5,4	non	15	Murine Mesencult Mesenchymal Stem Cell	0,3%	5,8%	0,9%	94,8%	84,2%	2,8%		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BTRR -Pah ^{enu2} /J	3,5	non	11	Murine Mesencult Mesenchymal Stem Cell	0,6%	12,8%	0,6%	93,3%	69,9%	2,2%		+	+	-	23	1	20	2
BTRR -Pah ^{enu2} /J	4,1	non	12	Murine Mesencult Mesenchymal Stem Cell								ND	ND	ND	20	2	18	0

Figure R 14 : Tableau récapitulatif des différents isolements de CSM murines effectués à partir de moelle osseuse. La souche murine de provenance des cellules est renseignée ainsi que la durée de culture et le nombre de passages in vitro avant détermination du caryotype. Quand indiqué, une sélection négative des cellules hématopoïétiques a été réalisée par marquages anti CD34, CD45, CD11b. La composition du milieu de culture est spécifiée quand elle est de formulation connue (SVF : sérum de veau foetal ; SC : sérum de cheval ; HGF : Hepatocyte Growth Factor). Certaines cultures ont été caractérisées par cytométrie de flux pour les marqueurs Sca-1, CD106, CD90.2 et CD34, CD45, CD11b (les trois derniers étant des marqueurs hématopoïétiques). La capacité de différenciation des CSM en ostéocytes, adipocytes et chondrocytes a été évaluée et est renseignée comme positive (+), négative (-) ou non déterminée (ND). Le nombre de chromosomes (chr.) a été déterminé par caryotypage. Le nombre total de mitoses analysées par culture est indiqué, les caryotypes sont classés selon trois catégories : normal (environ 40 chr.), tétraploïde (environ 70 chr.) et hyperploïde (environ 120 chr.) (Josse et al. 2010)

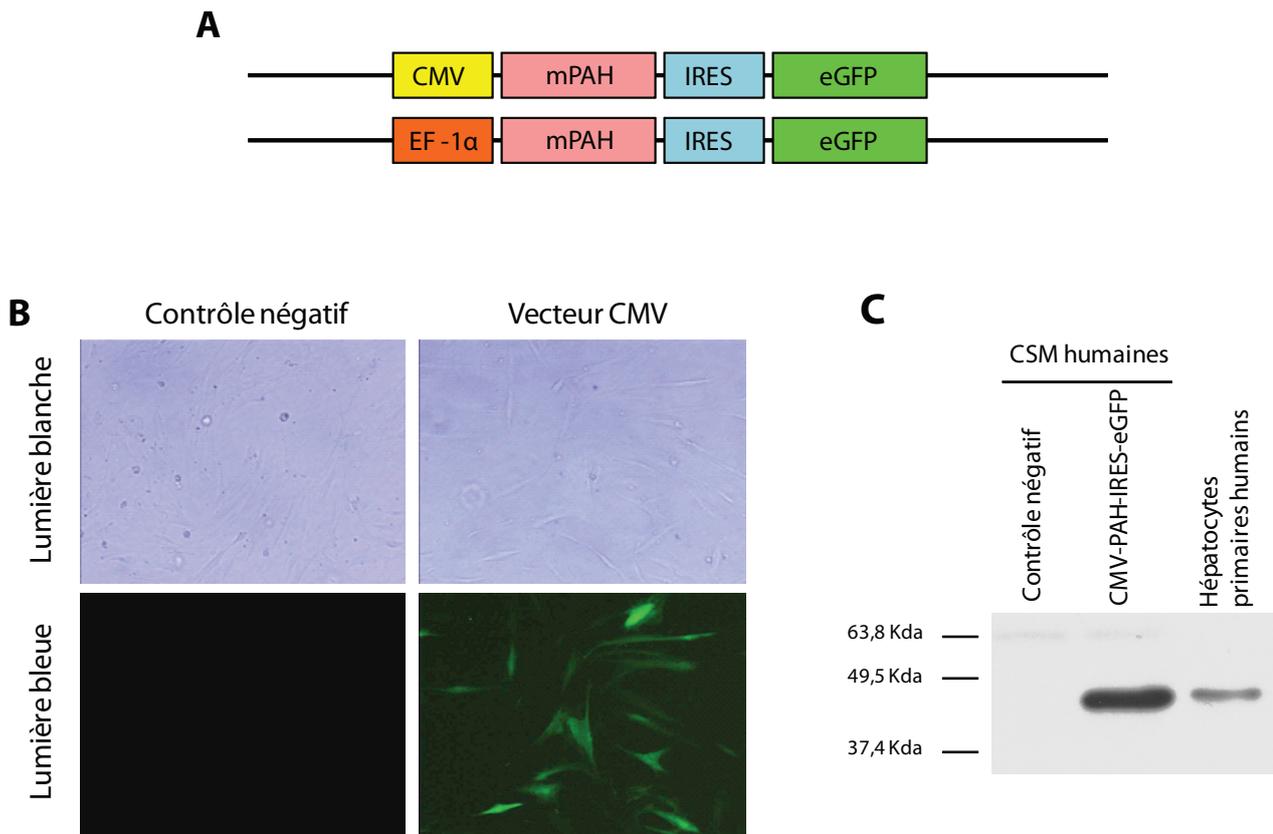


Figure R 15 : **A.** Schéma de la cassette d'expression véhiculée par deux types de vecteurs lentiviraux. **B.** CSM humaines transduites par 1000 ng p24 de vecteur lentiviral CMV-eGFP. Images prises en lumière blanche ou bleue 48h après addition de vecteur. **C.** Western blot détectant la PAH dans des extraits protéiques provenant de CSM humaines transduites par vecteur lentiviral à promoteur CMV, ou d'hépatocytes primaires humains.

A

Cinétique	Mode d'administration et dose	Concentration mesurée chez la souris	Concentration attendue chez l'homme
Traitement du jour -1 au jour 14 par rapport à la transfusion de cellules	Rapamycine (Rapamune Sirop 1 mgr/mL) dans l'eau de boisson Final : 0,8 mg/kg/jour si on compte qu'une souris boit 150 µL/g/jour	9,38 ± 4,76 µg/L	± 8,5 µg/L
	Tacrolimus (Prograft ampoules 5 mgr/mL) dans l'eau de boisson Final : 4 mg/kg/jour si on compte qu'une souris boit 150 µL/g/jour	13,43 ± 7,1 µg/L	5 - 20 µg/L
Traitement à parti du jour 14 par rapport à la transfusion de cellules	MMF (CellCept Sirop 200 mgr/mL) dans l'eau de boisson Final : 400 mg/kg/jour si on compte qu'une souris boit 150 µL/g/jour	11,34 ± 8,75 mg/L	2,5 - 4,5 mg/L
	Tacrolimus (Prograft ampoules 5 mgr/mL) dans l'eau de boisson Final : 6 mg/kg/jour si on compte qu'une souris boit 150 µL/g/jour	9,41 ± 5,09 µg/L	5 - 20 µg/L

B

	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4	Groupe 5
Nombre d'animaux	1	6	2	1	4
Lésion Hépatique	non	oui	oui	non	non
Infusion hCSM transduites	non	oui	oui	oui	oui
Immunosuppression	non	oui	non	non	oui

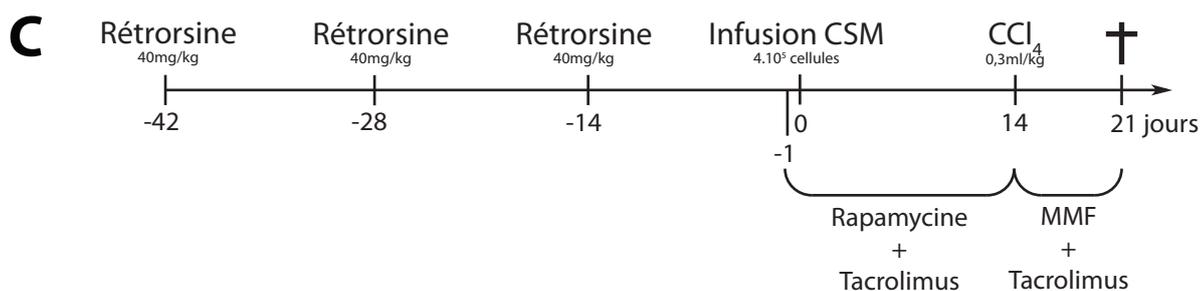


Figure R 16 : Expérience d'infusion de CSM humaines chez la souche murine BTBR Pah^{enu2}/J. **A.** Modalités du traitement immunosuppresseur mis au point en vue de l'infusion de CSM humaines chez la souche murine BTBR Pah^{enu2}/j. **B.** Description des groupes quant au nombre d'animaux et modalités de traitement. **C.** Plan centralisant toutes les étapes de l'expérimentation au cours du temps dans le cas du groupe 2.

A

	Groupe 1 contrôle +	Groupe 2 contrôle -	Groupe 3 I.S. Rapa + Tacro	Groupe 4 I.S. MMF + Tacro
Nombre d'animaux	4	4	6	6
Greffe MDA-MB-231	oui	oui	oui	oui
Immunosuppression	innée	non	oui	oui

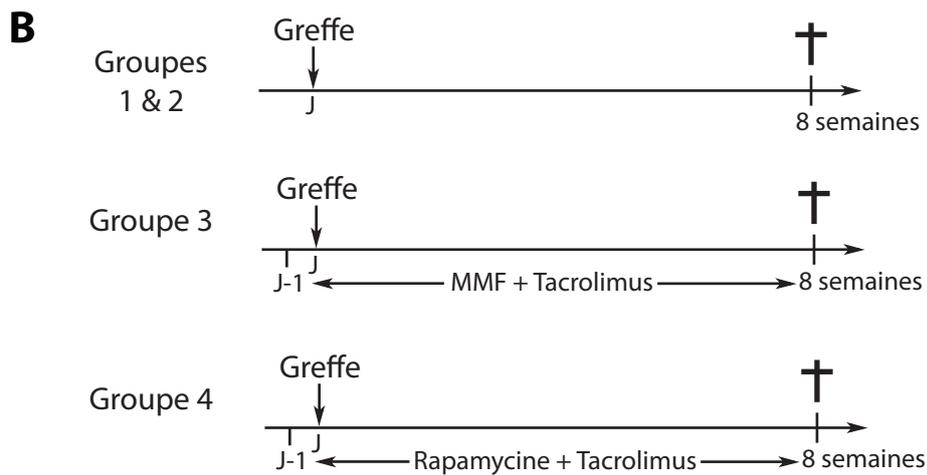


Figure R 17 : Test fonctionnel du protocole d'immunosuppression. **A.** Description des groupes quant au nombre d'animaux et modalités de traitement. **B.** Plans schématisant les étapes de l'expérimentation au cours du temps.

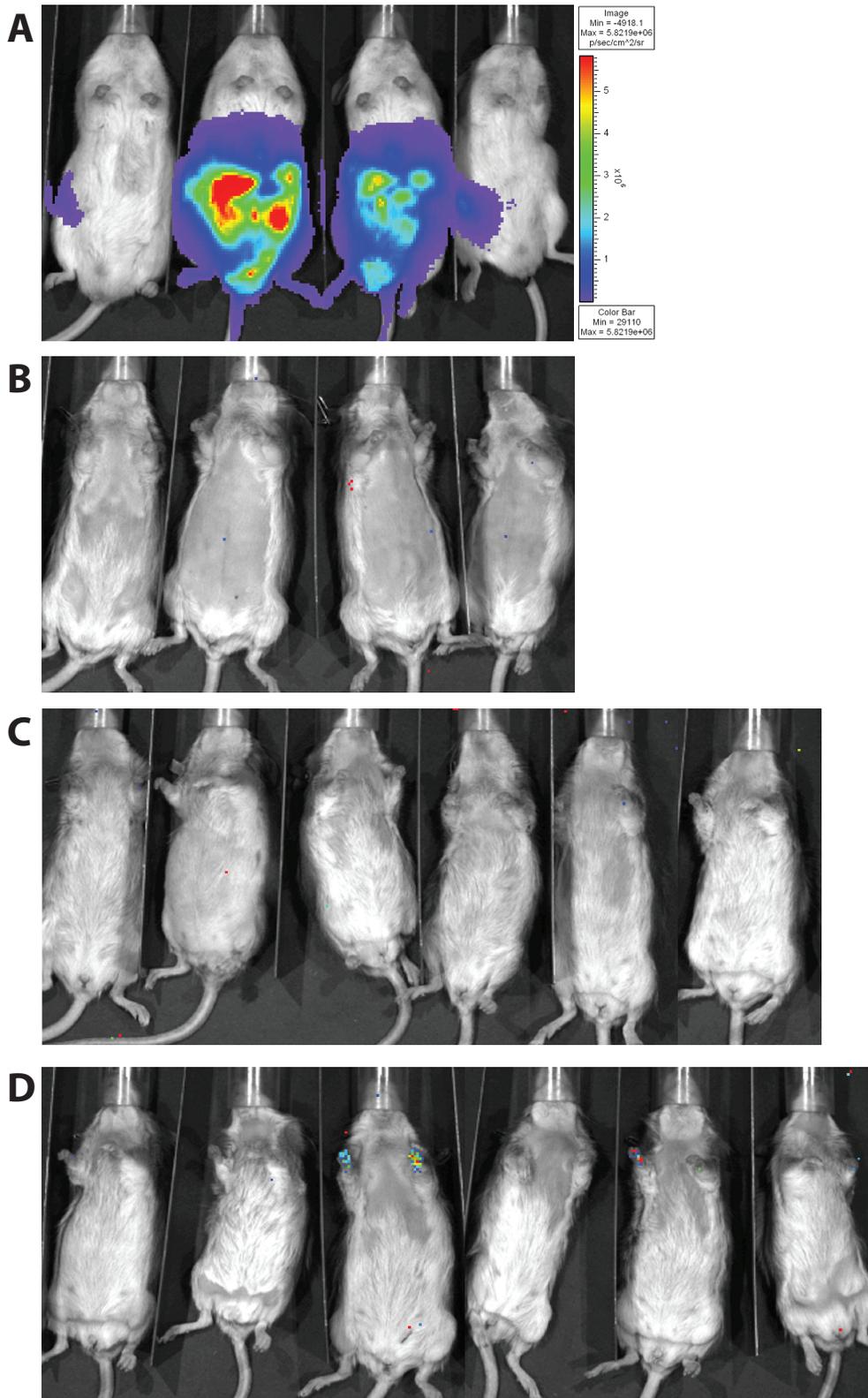


Figure R 18 : Test fonctionnel du protocole d'immunosuppression par greffe sous cutanée de cellules tumorales humaines. **A.** Groupe contrôle positif de prise de greffe (lignée murine immunodéficiente NOD/SCID). **B.** Groupe contrôle négatif, lignée immunocompétente BTBR Pah^{enu2}/J. **C.** Groupe BTBR Pah^{enu2}/J traité par rapamycine et tacrolimus. **D.** Groupe BTBR Pah^{enu2}/J traité par MMF et tacrolimus.