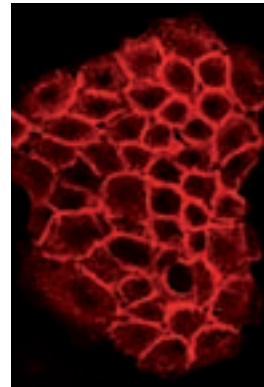


> La thérapie génique *ex vivo* consiste à exprimer de façon stable, dans des cellules de patients en culture, une version saine du gène muté responsable de la maladie, puis à réimplanter ces cellules « corrigées » chez le patient. La correction génétique n'est pérenne que si le gène thérapeutique est transféré dans les cellules souches du tissu concerné. Dans le cas des maladies génétiques cutanées prédisposant au cancer, un impératif est de réimplanter chez le patient des populations pures de cellules épidermiques génétiquement corrigées, ce qui nécessite leur sélection. Toutefois, l'étape de sélection peut altérer les cellules souches et augmenter le risque de rejet immunitaire. Ces difficultés ont pu être contournées en « étiquetant » les cellules souches épidermiques génétiquement manipulées à l'aide d'une petite protéine de surface naturellement exprimée dans la peau. Les cellules souches génétiquement manipulées et sélectionnées par cette méthode conservent toutes leurs propriétés et sont ainsi capables, lorsqu'elles sont greffées chez la souris, de régénérer une peau humaine normale à très long terme. Ces avancées devraient contribuer à améliorer les approches de thérapie génique cutanée des maladies prédisposant aux cancers de la peau et qui restent aujourd'hui sans traitement, notamment le *xeroderma pigmentosum*. Si ces avancées paraissent significatives, d'autres efforts sont encore nécessaires pour améliorer la qualité des greffons cutanés qui restent jusqu'à présent dépourvus d'annexes (follicules pileux, glandes sudorales), un inconvénient majeur en termes d'esthétique et de confort. <

## Thérapie génique cutanée

### La greffe prend

Valérie Bergoglio, Emilie Warrick,  
 Odile Chevallier-Lagente, Thierry Magnaldo



V. Bergoglio, O. Chevallier-Lagente, T. Magnaldo :  
 Génomes et Cancers,  
 CNRS FRE 2939,  
 Institut Gustave Roussy,  
 39, rue Camille Desmoulins,  
 94805 Villejuif, France.  
[magnaldo@igr.fr](mailto:magnaldo@igr.fr)

E. Warrick : Génomes et Cancers,  
 CNRS FRE 2939,  
 Institut Gustave Roussy,  
 Villejuif, France et L'Oréal  
 Recherche, Clichy, France.

Depuis près d'une vingtaine d'années, les maladies génétiques touchant différents organes ou tissus ont fait l'objet de recherches intenses dans l'espoir de les traiter par des approches de « correction génétique ». L'option la plus commune est l'introduction dans le génome de la cellule malade d'une ou de plusieurs copies saines du gène dont la mutation est à l'origine de la maladie, soit *in vivo* chez le patient, soit *ex vivo* dans les cellules en culture du patient. Les stratégies *in vivo* sont confrontées aux problèmes de l'accessibilité du tissu cible, de la spécificité et du rendement de la correction. Dans le cas de l'approche *ex vivo*, il faut, bien entendu, maîtriser la culture des cellules appropriées (provenant de l'organe ou du tissu ciblé) et pouvoir corriger fonctionnellement et à long terme leur défaut génétique tout en préservant les perspectives de réimplantation chez le patient.

L'épiderme, le tissu superficiel de la peau, occupe une place de premier plan dans le domaine de la thérapie génique [1-7]. L'accessibilité du tissu cutané est un avantage évident. Certaines maladies génétiques cutanées (les génodermatoses), parfois extrêmement invalidantes et compromettant le pronostic vital des patients, ne bénéficient d'aucun traitement curatif efficace. Dans ces cas rares, dont la liste figure dans le *Tableau 1*, la correction génétique des cellules pourrait donc être une solution thérapeutique [8].

Dès 1975, Rheinwald et Green [9] établissent dans un travail pionnier les conditions de la culture des kératinocytes épidermiques sains à très long terme. Dans les



Maladie	Gène	Protéine	Site d'expression	Altérations
Ichtyose lamellaire	<i>TGM1</i>	Transglutaminase	Granuleuses	Fonction barrière
Ichtyose liée à l'X	<i>STS</i>	Aryl-C-sulfatase	Granuleuses	Fonction barrière
Épidermolyse hyperkératotique	<i>KRT1/KRT10</i>	Kératines K1/K10	Spineuses	Épidermolyse
Épidermolyse hyperkératotique palmoplantaire	<i>KRT9</i>	Kératine K9	Spineuses	Épidermolyse
Épidermolyse bulleuse « simplex »	<i>KRT5/KRT14</i>	Kératines K5/K14	Basale	Épidermolyse
Épidermolyse bulleuse jonctionnelle	<i>LAMA3, LAMB2, LAMC2</i>	Laminine 5 sous-unités, $\alpha 3$ , $\beta 2$ , $\gamma 2$	Membrane basale	Épidermolyse
	<i>ITGA6, ITGB4</i>	Intégrines $\alpha 6$ , Intégrine $\beta 4$	Membrane basale	Épidermolyse
	<i>Col17A1</i>	Collagène 17/BP180	Membrane basale	Épidermolyse
Épidermolyse bulleuse dystrophique	<i>Col7A1</i>	Collagène 7	Membrane basale	Épidermolyse
<i>Xeroderma pigmentosum</i>	<i>XPA à XPG</i>	XPA à XPG	Ubiquitaire	Cancer cutané précoce

**Tableau 1. Exemples de génodermatoses qui pourraient bénéficier d'une thérapie génique cutanée.**

conditions optimales, il est possible d'obtenir 1,5 m<sup>2</sup> d'épithélium en culture en deux à trois semaines, à partir d'une biopsie de peau saine de quelques cm<sup>2</sup>. L'autogreffe des épithélium de culture ainsi obtenus a permis de sauver des milliers de personnes très gravement brûlées [10-12]. En 1987, les équipes de Richard Mulligan et de Howard Green avec Yann Barrandon réussirent la première modification génétique de kératinocytes épidermiques humains en culture par transfert du gène de l'hormone de croissance à l'aide de rétrovirus recombinants [13]. À cette époque, la plupart des gènes responsables des génodermatoses étaient inconnus, mais les grandes lignes du schéma stratégique de la thérapie génique cutanée étaient néanmoins tracées. Vingt années de recherches plus tard, le groupe de Michele DeLuca a récemment rapporté la première greffe d'un épithélium de culture génétiquement modifié chez un patient atteint d'épidermolyse bulleuse jonctionnelle, une maladie due à la mutation d'un composant de la membrane basale (la laminine 5), support de l'épiderme [14, 38]. Si ce résultat concrétise l'aboutissement longtemps espéré de nombreux travaux expérimentaux antérieurs, et que le principe général de la thérapie génique cutanée *ex vivo* semble aujourd'hui acquis, certains aspects de la stratégie devront être adaptés à la nature de la pathologie ciblée, et, parmi ceux-ci, la nécessité ou non de sélectionner les cellules génétiquement corrigées. En effet, dans le cas des génodermatoses associées à une prédisposition aux cancers de la peau, en particulier le *xeroderma pigmentosum* ou certaines épidermolyses bulleuses (jonctionnelles ou dystrophiques), la sélection des cellules génétiquement corrigées est une exigence supplémentaire afin de limiter la possibilité de réimplanter chez le patient des cellules susceptibles d'initier une tumeur dans le greffon. À cet égard, une étude très récente de notre équipe CNRS à l'Institut Gustave Roussy, « Génétique et physiopathologie des cancers épidermiques », montre qu'il est maintenant possible de sélectionner très efficacement et sans

altération des potentiels de croissance et de différenciation, une population kératinocytaire génétiquement manipulée et contenant une très forte proportion de cellules souches [15].

### Thérapie génique cutanée : un cahier des charges contraignant

L'épiderme est un tissu stratifié dans lequel deux compartiments peuvent être distingués. La couche basale représente le compartiment prolifératif et contient une petite proportion de cellules souches (environ 1 %) [16, 17]. Une cellule souche est une cellule capable d'assurer le renouvellement d'un organe ou d'un tissu au cours de la vie d'un individu [18]. Dans l'épiderme interfolliculaire, la localisation des cellules souches n'est pas clairement déterminée. Il faut donc distinguer les cellules souches interfolliculaires des cellules souches folliculaires qui, chez les rongeurs, occupent une localisation bien déterminée dans la partie supérieure du feuillet externe du follicule pileux appelée « bulge » (renflement en français) [16, 19, 20] ; bien que le « bulge » ne soit pas détecté dans le follicule pileux humain, les cellules souches folliculaires y sont également concentrées dans une zone circonscrite du feuillet épithélial externe [21]. Les couches suprabasales de l'épiderme sont formées de cellules qui ne se divisent plus et sont engagées dans un processus séquentiel et irréversible de différenciation. Le renouvellement permanent

de l'épiderme et sa capacité régénérative en cas de blessure limitée attestent de la présence de cellules souches. L'équilibre entre prolifération dans la couche basale et différenciation dans les couches cellulaires suprabasales témoigne de l'homéostasie épidermique [22]. Cet équilibre est perdu dans les pathologies non cancéreuses comme le psoriasis, ainsi que dans les carcinomes cutanés.

Le schéma général de la thérapie génique cutanée *ex vivo* est présenté sur la *Figure 1*. Comme dans le cas des grands brûlés, il faut pouvoir répondre à plusieurs contraintes : (1) obtenir une culture de grande qualité, c'est-à-dire contenant des cellules souches en proportion suffisante pour y assurer l'introduction du gène approprié ; (2) assurer un très fort pourcentage de cellules corrigées fonctionnellement et la pérennité à long terme de la correction dans la descendance des cellules corrigées ; (3) valider l'efficacité de la correction chez l'animal, par exemple après régénération de peau à long terme à partir des cellules corrigées. Ainsi, des feuilletts épithéliaux humains génétiquement manipulés et cultivés *ex vivo* peuvent être greffés en lieu et place de la peau endogène chez des souris immunodéficientes [23]. Après quelques semaines, l'épiderme humain est produit et il est possible d'étudier sa fonction à long terme *in vivo* ; (4) établir l'innocuité de la correction génétique, en excluant les problèmes de mutagenèse insertionnelle,

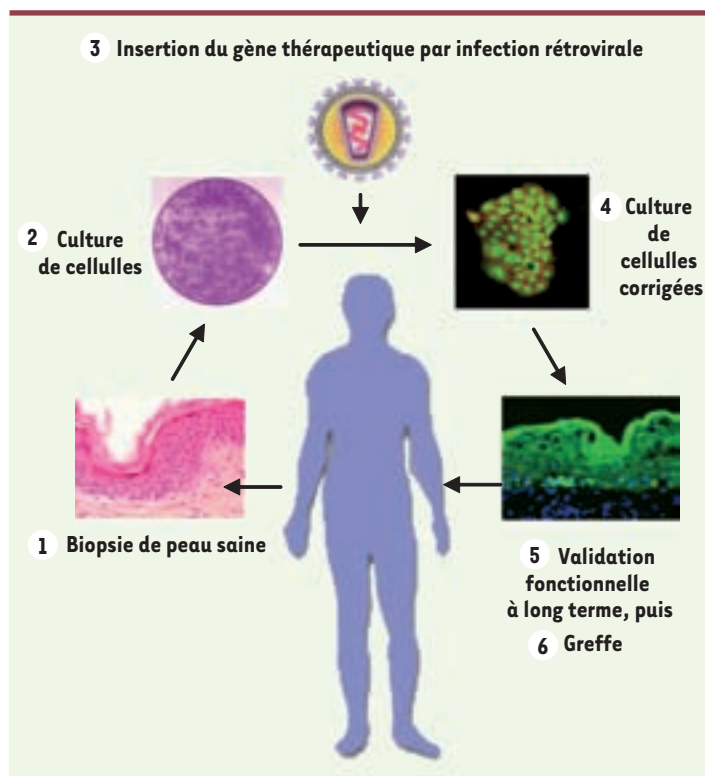
de transactivation d'oncogènes et de rejet immunitaire potentiel des cellules corrigées [14]. L'accessibilité du greffon cutané permettrait cependant, en cas de nécessité, de le retirer beaucoup plus facilement que dans le cas d'une greffe de cellules hématopoïétiques génétiquement corrigées [24]. (5) Enfin, étape ultime à l'issue de ces vérifications, réaliser la greffe d'un épithélium de culture génétiquement corrigé chez le patient [14].

La présence de cellules souches, leur correction génétique et leur maintien sont les facteurs limitants de toute approche de thérapie génique cutanée, faute de quoi la pérennité de la correction génétique est compromise [25, 26].

### Justification d'une stratégie de sélection des cellules génétiquement modifiées

Quelle que soit la pathologie, l'objectif le plus raisonnable est, en général, d'obtenir « le maximum » de cellules souches génétiquement corrigées, pour assurer une proportion élevée de cellules fonctionnelles génétiquement corrigées dans un épithélium de culture destiné à la greffe. Dans le cas des gnodermatoses associées à une prédisposition au cancer de la peau, en particulier *le xeroderma pigmentosum* ou les épidermolyses bulleuses dystrophiques ou jonctionnelles [27], il faut de plus limiter la possibilité de réimplanter avec le greffon des cellules potentiellement pré-cancéreuses ou cancéreuses - qui n'auraient pas reçu le gène thérapeutique. Il est alors nécessaire de « sélectionner » les cellules génétiquement corrigées, par exemple en co-exprimant dans les mêmes cellules le gène thérapeutique et un gène dont le produit confère la résistance à un

antibiotique [28]. La plupart des gènes de sélection proviennent de micro-organismes et leurs produits protéiques sont donc potentiellement immunogènes chez l'individu immunocompétent, excluant leur utilisation dans une perspective de greffe. C'est pourquoi l'essai rapporté par Mavilio *et al.* n'a été possible qu'en l'absence de transfert d'un gène de sélection mais, d'après les auteurs, « virtuellement » 100 % des cellules réimplantées chez le patient étaient corrigées [14, 38]. En revanche, dans la mesure où l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle peut être associée aux carcinomes cutanés, la sélection des cellules génétiquement corrigées sera nécessaire dans les cas où l'efficacité de la correction génétique est inférieure à 100 %.

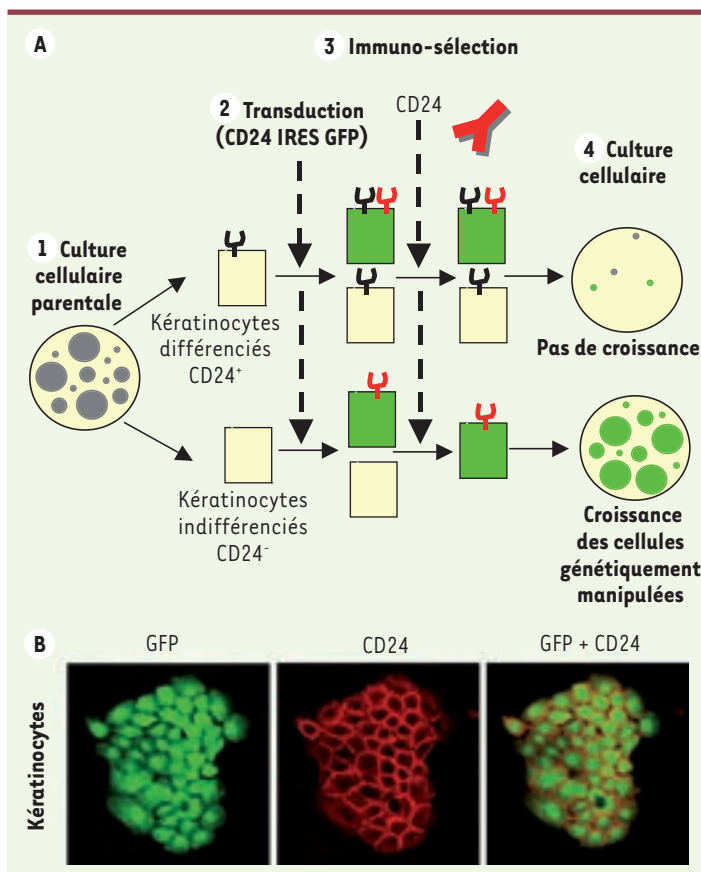


**Figure 1. De la biopsie à l'autogreffe.** À partir d'une biopsie de peau saine de quelques cm<sup>2</sup>, il est possible, dans des conditions optimisées, d'obtenir des cultures de kératinocytes primaires *ex vivo* (1), et de suivre les étapes indiquées (2-5) pour arriver jusqu'à l'autogreffe chez le patient (6). Mavilio *et al.* [14] ont pu démontrer la faisabilité de cette stratégie dans le cas d'un patient atteint d'une épidermolyse bulleuse jonctionnelle.

## Correction génétique *ex vivo* des kératinocytes épidermiques de *xeroderma pigmentosum*

Le *xeroderma pigmentosum* (XP) est une génodermatose très rare à transmission autosomique récessive, dont la caractéristique majeure est, précisément, une prédisposition extrême aux cancers de la peau. Dès le plus jeune âge, les patients atteints de XP présentent une forte intolérance au soleil, illustrée par d'importants coups de soleil à la moindre exposition. Les ultraviolets de la lumière solaire introduisent des lésions dans l'ADN. Chez les patients XP, le système de réparation de ces lésions par excision de nucléotide est inefficace [29, 30]. L'absence de réparation de ces lésions mutagènes peut être à l'origine du développement tumoral. Les enfants atteints de XP ne bénéficient d'aucun traitement réellement efficace, et la prise en charge n'inclut qu'une photoprotection et une surveillance dermatologique strictes, afin de limiter l'apparition des tumeurs. Comme dans le cas des épidermolyses bulleuses, l'absence de traitement efficace motive les approches de correction génétique *ex vivo* des kératinocytes épidermiques de patients XP [31, 32]. Dans ce cas, la forte prédisposition aux cancers cutanés d'origine kératinocytaire impose la sélection des cellules génétiquement corrigées susceptibles d'être réimplantées chez le patient. Une stratégie inédite de sélection des cellules corrigées a récemment été proposée par notre équipe. La Figure 2 illustre cette stratégie. Les cellules différenciées de l'épiderme, qui ont perdu tout potentiel prolifératif, expriment à leur surface une petite protéine appelée CD24 [33].

Aucune cellule de la couche basale n'exprime cette protéine, ce qui exclut son expression par les cellules souches. En culture, les cellules prolifératives sont issues de la couche basale. La stratégie a donc été de faire exprimer la protéine CD24 à la surface de ces cellules basales à l'aide d'un vecteur rétroviral. Grâce à cette petite « étiquette de surface », les cellules prolifératives (y compris les cellules souches) ayant été transduites avec succès et exprimant l'antigène CD24 peuvent être purifiées à l'aide d'un anticorps spécifique reconnaissant la petite protéine CD24. Si la culture contient également des cellules différenciées (qui expriment le CD24 naturellement), celles-ci seront également sélectionnées mais, compte tenu de leur état différencié, seront incapables de proliférer et seront donc éliminées au cours de la culture. Ainsi, si la petite étiquette CD24 est co-exprimée avec un gène d'intérêt, toutes les cellules purifiées sur le critère d'expression de CD24 exprimeront également le gène d'intérêt [34]. L'étude démontre que le schéma théorique de cette nouvelle stratégie de sélection est vérifié [15]. L'utilisation d'un gène traceur (*green fluorescent protein*, GFP) a permis de suivre l'évolution des kératinocytes épidermiques génétiquement modifiés. Le gène *CD24* et le gène codant la GFP ont été insérés dans un vecteur rétroviral dérivé du virus leucémogène de Moloney. Après leur infection par ces rétrovirus, les kératinocytes génétiquement manipulés ont été sélectionnés par immunoaffinité. De cette façon nous avons obtenu des populations quasiment pures (99,9 %) de cellules fluorescentes. La stabilité de l'expression des gènes codant la GFP et le CD24 exogènes a été observée pendant plus d'une année en culture au cours de laquelle les analyses clonales ont indiqué que la technique permettait d'enrichir fortement la population en cellules souches génétiquement manipulées (Figure 3). Ces cellules ont conservé un caryotype normal ainsi que tous leurs potentiels : elles sont ainsi capables de former une peau normale en



**Figure 2.** A. Schéma théorique de la stratégie de sélection CD24. Les cellules cultivées (1) à partir d'une petite biopsie cutanée sont infectées par un rétrovirus (CD24 IRES GFP, 2) permettant d'exprimer le gène de complémentation génétique aux vertus thérapeutiques. Ici, le gène choisi code pour la protéine GFP, qui émet de la fluorescence. Les cellules génétiquement modifiées sont ensuite sélectionnées à l'aide d'un anticorps spécifique (3), puis propagées en culture (4). B. Tous les kératinocytes infectés par le rétrovirus CD24 IRES GFP puis sélectionnés pour l'expression du CD24, expriment à la fois la GFP et le CD24 exogène, comme indiqué.

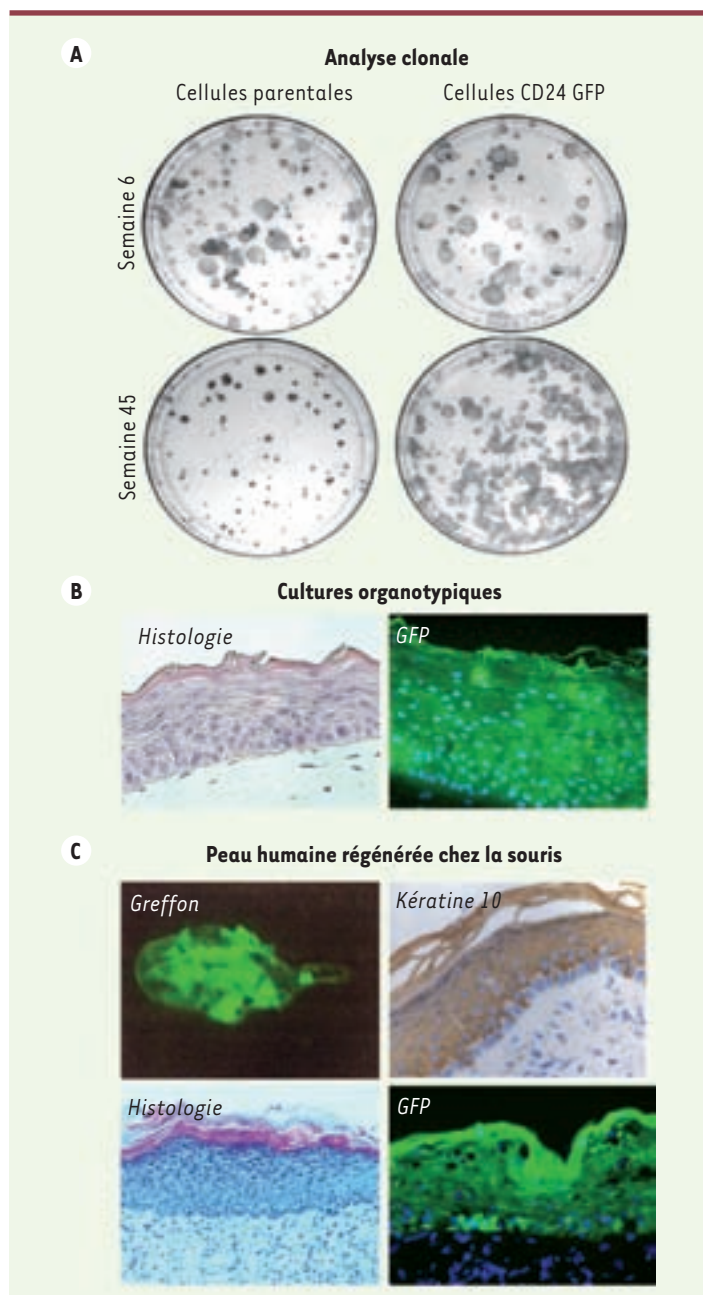
terme de différenciation et de prolifération en culture organotypique *ex vivo* et, également, de régénérer à long terme (22 semaines) une peau normale *in vivo* après greffe chez la souris immunodéficente (*nu/nu*) (Figure 3).

Cette méthode de sélection respecte donc le cahier des charges de la thérapie génique cutanée *ex vivo*. L'enrichissement des populations sélectionnées en cellules souches interfolliculaires devrait aussi permettre de progresser dans leur caractérisation. En effet, en raison de leur « dispersion » dans la couche basale de l'épiderme interfolliculaire, celles-ci ont été beaucoup moins étudiées que les cellules souches folliculaires qui occupent une localisation précise dans le follicule pileux [20, 35].

### Perspectives thérapeutiques pour le xeroderma pigmentosum

Grâce à cette nouvelle technique de sélection non invasive, une priorité de l'équipe est maintenant de corriger à très long terme les défauts de réparation de l'ADN des kératinocytes isolés à partir de patients XP atteints du groupe de complémentation le plus fréquent, XP-C [29, 30]. Il faudra non seulement vérifier que les peaux XP-C génétiquement corrigées sont capables de réparation après irradiation UV, mais aussi que les altérations de la différenciation épidermique rapportées dans les cultures organotypiques de peau XP-C sont également corrigées [36]. Une fois toutes les vérifications décrites ci-dessus réalisées, il sera alors possible d'envisager, dans un premier temps, de greffer chez les patients des petites surfaces d'épithélium de culture génétiquement corrigé. Cette possibilité dépendra elle-même de l'obtention d'autorisations légales.

Plusieurs questions restent toutefois posées, notamment celle du rôle de CD24 dans l'épiderme, qui reste inconnu. Chez l'homme, le CD24 est une petite protéine de 80 acides aminés. L'enchaînement peptidique ancré à la membrane cellulaire *via* un glycoposphatidyl inositol subit de nombreuses glycosylations augmentant considérablement son poids moléculaire apparent (environ 45 à 65 kDa en fonction des tissus). La petite taille du cadre de lecture de CD24 est un avantage, car elle n'utilise qu'une petite partie de la capacité cargo des vecteurs rétroviraux. L'inactivation du gène *cd24* par recombinaison homologue chez la souris n'a provoqué aucun phénotype cutané [33].



**Figure 3. Régénération à long terme d'une peau normale après greffe chez la souris immunodéficente.** **A.** Résultats de l'analyse clonale (analyse clonale) obtenue soit avant la transduction rétrovirale (cellules parentales), soit après transduction rétrovirale et tri cellulaire sur le critère « expression du CD24 » (cellules CD24 GFP). Quarante-cinq semaines après la sélection, il est clair que les cellules transduites par le vecteur CD24 GFP présentent un potentiel clonogénique supérieur et génèrent des clones de taille supérieure (semaine 45, cellules CD24 GFP) par comparaison avec les cellules parentales au même passage (semaine 45, cellules parentales). **B.** Les cultures organotypiques (cultures organotypiques) montrent que l'histologie est correcte (histologie) et que toutes les cellules épidermiques expriment le gène traceur codant la GFP (GFP). **C.** L'expression du gène traceur *GFP* persiste à long terme dans la peau qui est produite après greffe sur la souris athymique *Nude* (22 semaines après greffe). L'histologie (histologie) et la différenciation épidermique (kératine 10) sont normales.



Par ailleurs, nos expériences décrites ci-dessus [15] ont montré que l'expression ectopique de CD24 dans les cellules souches épidermiques n'affecte pas leur devenir. Compte tenu de son expression naturelle dans l'épiderme, l'utilisation du marqueur CD24 pour sélectionner les cellules basales génétiquement manipulées pourrait être immunologiquement compatible avec la greffe chez les patients atteints de génodermatoses prédisposant aux cancers cutanés comme le XP ou certaines épidermolyses bulleuses. Il faut espérer que l'optimisation des techniques de greffes, aujourd'hui encore limitées à des feuilletts épithéliaux dépourvus d'annexes, contribuera à un meilleur confort chez le patient.

Au-delà de ces perspectives appliquées à la thérapie génique cutanée, le système mis en place permettra aussi d'examiner à très long terme le devenir de cellules humaines primaires génétiquement manipulées. Par exemple, il sera possible d'examiner l'impact de l'extinction stable de gènes dont les produits participent au contrôle de la prolifération cellulaire (par exemple, *P53*, *PATCHED*), ou à la réparation de l'ADN par excision de nucléotides comme *XPC* ou *XPD*, et dont les mutations peuvent être associées au cancer ou à une prédisposition au cancer. Le système de sélection mis en place pourrait également permettre de développer des modèles pathologiques par greffe sur la souris des cellules primaires humaines génétiquement manipulées pour l'extinction de gènes spécifiques ou la surexpression de mutations spécifiques [23].

Les retombées fondamentales et appliquées pourraient profiter non seulement aux patients atteints de maladies rares, et notamment les patients XP, mais aussi à la population générale. La possibilité de régénérer à long terme de la peau humaine pathologique chez la souris permettra d'une part, un meilleur décryptage des événements moléculaires associés au développement des carcinomes cutanés, et, d'autre part, d'étudier l'efficacité de traitements pharmacologiques des carcinomes cutanés. Il faut ici rappeler que le cancer de la peau non mélanocytaire est au premier rang de toutes les tumeurs chez l'homme et continue de progresser de façon constante [37]. ♦

## REMERCIEMENTS

Je remercie le Dr Françoise Bernerd pour ses encouragements et sa lecture critique. Emilie Warrick est doctorante dans le cadre d'un doctorat CIFRE L'ORÉAL/CNRS. La recherche a été soutenue par l'Association pour la Recherche sur le Cancer, la Fondation de l'Avenir, la Société Française de Dermatologie, l'Association Française contre les Myopathies. Ces associations sont vivement remerciées pour leur aide.

## SUMMARY

### Cutaneous gene therapy: the graft takes

Prospects of *ex vivo* cutaneous gene therapy rely on stable corrective gene transfer in epidermal stem cells followed by engraftment of corrected cells in patients. In the case of cancer prone genodermatoses, such as xeroderma pigmentosum, cells that received the corrective gene must be selected. However, this step is potentially harmful and can increase risks of immune rejection of grafts. These obstacles have

recently been overcome thanks to the labeling of genetically modified stem cells using a small epidermal protein naturally absent in stem cells. This approach was shown to be respectful of the fate of epidermal stem cells that retained full growth and differentiation capacities, as well as their potential to regenerate normal human skin when grafted in a mouse model in the long term. These progresses now open realistic avenues towards *ex vivo* cutaneous gene therapy of cancer prone genodermatoses such as xeroderma pigmentosum. However, major technical improvements are still necessary to preserve skin appendages which would contribute to aesthetic features and confort of patients. ♦

## RÉFÉRENCES

1. Choate KA, Medalie DA, Morgan JR, Khavari PA. Corrective gene transfer in the human skin disorder lamellar ichthyosis. *Nat Med* 1996 ; 2 : 1263-7.
2. Ghazizadeh S, Harrington R, Garfield J, Taichman LB. Retrovirus-mediated transduction of porcine keratinocytes in organ culture. *J Invest Dermatol* 1998 ; 111 : 492-6.
3. Dellambra E, Vailly J, Pellegrini G, et al. Corrective transduction of human epidermal stem cells in laminin-5-dependent junctional epidermolysis bullosa. *Hum Gene Ther* 1998 ; 9 : 1359-70.
4. Vailly J, Gagnoux-Palacios L, Dell'Ambra E, et al. Corrective gene transfer of keratinocytes from patients with junctional epidermolysis bullosa restores assembly of hemidesmosomes in reconstructed epithelia. *Gene Ther* 1998 ; 5 : 1322-32.
5. Khavari PA. Genetic correction of inherited epidermal disorders. *Hum Gene Ther* 2000 ; 11 : 2277-82.
6. Robbins PB, Lin Q, Goodnough JB, et al. *In vivo* restoration of laminin 5 beta 3 expression and function in junctional epidermolysis bullosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 5193-8.
7. Larcher F, Dellambra E, Rico L, et al. Long-term engraftment of single genetically modified human epidermal holoclones enables safety pre-assessment of cutaneous gene therapy. *Mol Ther* 2007 ; 15 : 1670-6.
8. Magaldi T, Sarasin A. Genetic reversion of inherited skin disorders. *Mutat Res* 2002 ; 509 : 211-20.
9. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975 ; 6 : 331-43.
10. Gallico GG 3rd, O'Connor NE, Compton CC, et al. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med* 1984 ; 311 : 448-51.
11. Ronfard V, Rives JM, Neveux Y, et al. Long-term regeneration of human epidermis on third degree burns transplanted with autologous cultured epithelium grown on a fibrin matrix. *Transplantation* 2000 ; 70 : 1588-98.
12. Barrandon Y. Genetic manipulation of skin stem cells: success, hope, and challenges ahead. *Mol Ther* 2007 ; 15 : 443-4.
13. Morgan JR, Barrandon Y, Green H, Mulligan RC. Expression of an exogenous growth hormone gene by transplantable human epidermal cells. *Science* 1987 ; 237 : 1476-9.
14. Mavilio F, Pellegrini G, Ferrari S, et al. Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nat Med* 2006 ; 12 : 1397-402.
15. Bergoglio V, Larcher F, Chevallier-Lagente O, et al. Safe selection of genetically manipulated human primary keratinocytes with very high growth potential using CD24. *Mol Ther* 2007 ; 15 : 2186-93.
16. Blanpain C, Horsley V, Fuchs E. Epithelial stem cells: turning over new leaves. *Cell* 2007 ; 128 : 445-58.
17. Guasch G. Les cellules souches épithéliales de la peau. *Med Sci (Paris)* 2006 ; 22 : 710-2.
18. Lajtha LG. Stem cell concepts. *Diff Res Biol Div* 1979 ; 14 : 23-34.
19. Kobayashi K, Rochat A, Barrandon Y. Segregation of keratinocyte colony-forming cells in the bulge of the rat vibrissa. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 7391-5.

20. Cotsarelis G. Epithelial stem cells: a folliculocentric view. *J Invest Dermatol* 2006 ; 126 : 1459-68.
21. Rochat A, Kobayashi K, Barrandon Y. Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. *Cell* 1994 ; 76 : 1063-73.
22. Fuchs E, Byrne C. The epidermis: rising to the surface. *Curr Opin Genet Dev* 1994 ; 4 : 725-36.
23. Del Rio M, Larcher F, Serrano F, et al. A preclinical model for the analysis of genetically modified human skin *in vivo*. *Hum Gene Ther* 2002 ; 13 : 959-68.
24. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000 ; 288 : 669-72.
25. Choate KA, Khavari PA. Sustainability of keratinocyte gene transfer and cell survival *in vivo*. *Hum Gene Ther* 1997 ; 8 : 895-901.
26. Bestor TH. Gene silencing as a threat to the success of gene therapy. *J Clin Invest* 2000 ; 105 : 409-11.
27. Gache Y, Baldeschi C, Del Rio M, et al. Construction of skin equivalents for gene therapy of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Hum Gene Ther* 2004 ; 15 : 921-33.
28. Deng H, Choate KA, Lin Q, Khavari PA. High-efficiency gene transfer and pharmacologic selection of genetically engineered human keratinocytes. *BioTechniques* 1998 ; 25 : 274-80.
29. Magnaldo T. La « guerre » du NER (nucleotide excision repair). *Med Sci (Paris)* 2004 ; 20 : 268-70.
30. Bergoglio V, Magnaldo T. Nucleotide excision repair and related human diseases. In : Volff JN, ed. *Genome and disease*, vol. 1. Basel : Karger, 2006 : 35-52.
31. Arnaudeau-Begard C, Brellier F, Chevallier-Lagente O, et al. Genetic correction of DNA repair-deficient/cancer-prone xeroderma pigmentosum group C keratinocytes. *Hum Gene Ther* 2003 ; 14 : 983-96.
32. Magnaldo T. Xeroderma pigmentosum: from genetics to hopes and realities of cutaneous gene therapy. *Exp Opin Biol Ther* 2004 ; 4 : 169-79.
33. Magnaldo T, Barrandon Y. CD24 (heat stable antigen, nectadrin), a novel keratinocyte differentiation marker, is preferentially expressed in areas of the hair follicle containing the colony-forming cells. *J Cell Sci* 1996 ; 109 : 3035-45.
34. Magnaldo T, Sarasin A. Utilisation du gène marqueur CD24 pour la sélection des kératinocytes souches transformés par des séquences exogènes. *International Patent* 2003 ; WO 03004655.
35. Kaur P. Interfollicular epidermal stem cells: identification, challenges, potential. *J Invest Dermatol* 2006 ; 126 : 1450-8.
36. Bernerd F, Asselineau D, Vioux C, et al. Clues to epidermal cancer proneness revealed by reconstruction of DNA repair-deficient xeroderma pigmentosum skin *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 7817-22.
37. DePinho RA. The age of cancer. *Nature* 2000 ; 408 : 248-54.
38. Kahn A. Thérapie génique d'une épidermolyse bulleuse jonctionnelle. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 109-10.

TIRÉS À PART  
T. Magnaldo

## Collection SCIENCE ET BIOMÉDECINE



ISBN : 2-84254-107-3 64 pages



ISBN : 2-84254-108-1 80 pages



ISBN : 2-84254-111-1 86 pages

### Bon de commande

À retourner à EDK, 2, rue Troyon - 92316 Sèvres Cedex  
Tél. : 01 55 64 13 93 - Fax : 01 55 64 13 94 - E-mail : edk@edk.fr

NOM : ..... Prénom : .....

Adresse : .....

Code postal : ..... Ville : .....

Pays : .....

Fonction : .....

Je souhaite recevoir l'ouvrage **Les oligo-éléments** : 10 € + 3 € de port = **13 € TTC**

Je souhaite recevoir l'ouvrage **Acides gras, acides aminés et peptides** : 12 € + 3 € de port = **15 € TTC**

Je souhaite recevoir l'ouvrage **Stress oxydatif et aliments** : 14 € + 3 € de port = **17 € TTC**

en ..... exemplaire, soit un total de ..... €

Par chèque, à l'ordre de **EDK**

Par carte bancaire :  Visa  Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Signature :

Date d'expiration : | | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | |

## Ateliers de formation 2008

Renseignements et inscriptions :  
Ateliers de formation Inserm  
101, rue de Tolbiac  
75654 Paris Cedex 13  
Tél. : 33 (0)1 44 23 62 04 — Fax : 33 (0)1 44 23 62 93  
ateliers@tolbiac.inserm.fr

# Inserm

Institut national  
de la santé et de la recherche médicale

## ■ Atelier de formation n° 190

### Les récepteurs TLR : de la recherche à la médecine

**Organisateurs** : Charles Hétru (IBMC, Strasbourg), Valérie Quesniaux (Institut de Transgénèse, Orléans)

#### Phase I • Le point sur...

16-17 octobre 2008 • Saint-Raphaël

**Objectifs** • L'immunologie s'est longtemps focalisée sur l'immunité adaptative qui présente beaucoup d'intérêt aussi bien en recherche fondamentale qu'au domaine des applications médicales. Cependant, la plupart des espèces animales sont dépourvues d'immunité adaptative et résistent pourtant très bien aux agressions de multiples pathogènes. De récentes découvertes chez les invertébrés ont ravivé l'intérêt pour l'immunité innée chez les mammifères, en plein essor actuellement. Les récepteurs « Toll Like Receptor » (TLR), représentent des éléments clef de cette immunité. Ces récepteurs transmembranaires découverts récemment (1997) sont impliqués dans de nombreuses réponses aux pathogènes ou inflammatoires et les chercheurs se retrouvent confrontés à ce nouveau domaine. Les informations sur les TLR augmentant rapidement, l'atelier sera l'occasion de faire un état des lieux des connaissances du domaine et des aspects techniques associés aux travaux sur ces récepteurs, sur les contraintes et les pièges. Le programme abordera également les modèles appropriés ainsi que les interactions entre les TLR et les voies de signalisation.

**Public** • Chercheurs, médecins, post-doctorants, doctorants, ingénieurs dont le domaine d'études porte sur les TLR mais également ceux qui se trouvent brusquement confrontés aux TLR.  
Les conférences seront données en anglais.

**Nombre maximum de participants** : 80.

#### Programme •

- Précision du contexte immunologique des TLR
- Implication entre immunité innée et adaptative
- Description des voies de signalisations que ces immunités déclenchent
- Ligands et spécificités associées
- Identification de la distribution tissulaire et cellulaire
- Liaison entre les aspects moléculaires des TLR et leur activités
- Connaissance du rôle potentiel dans certaines maladies génétiques
- Potentialités d'application au domaine médical et pharmaceutique.

#### Phase II • Maîtrise technique

19-21 novembre 2008 • Orléans

**Programme** • Le but de la partie technique du stage est de donner des éléments concrets pour répondre à une question : « Comment vérifier si une l'activité donnée passe par les voies TLR ? » Plusieurs méthodes d'étude de la réponse TLR seront abordées : manipulation des ligands inducteurs des TLR, les pièges à éviter ; les inhibiteurs spécifiques ou non (anticorps) ; les animaux génétiquement modifiés pour l'expression ou l'inactivation des gènes de TLR ; d'autres approches telles que cellules modifiées pour l'expression des TLR, gènes rapporteurs, siRNA

**Sélection** • 6-9 participants seront sélectionnés parmi les participants de la phase I.

**Avec la participation de** • Julie Magarian Blander (New York, USA), Dominique Buzoni-Gatel (Paris, France), Marco Colonna (St Louis, USA), Isabelle Couillin (Orléans, France), Brian Foxwell (London, UK), Nick Gay (Cambridge, UK), François Huaux (Brussels, Belgique), Jean-Luc Imler (Strasbourg, France), Jean-Paul Mira (Paris, France), Jane A. Mitchell (London, UK), Muriel Moser (Brussels, Belgique), Valérie Quesniaux (Orléans, France), Jean-Claude Sirard (Lille, France), Mustapha Si-Tahar (Paris, France), Patrick Squiban (Marseille, France), Philip Taylor (Cardiff, UK)

**Date limite d'inscription** : 10 juillet 2008