

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements.....	xii
Avant-propos	xiv
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 La peau.....	1
1.1.1 Le collagène de type VII	4
1.2 L'épidermolyse bulleuse	5
1.2.1 L'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive	6
1.3 Les thérapies en développement pour traiter l'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive	7
1.3.1 La thérapie par remplacement de protéines	10
1.3.2 La thérapie cellulaire.....	11
1.3.3 La thérapie génique	14
1.3.3.1 Vecteurs utilisés en thérapie génique pour traiter l'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive	15
1.3.3.2 L'édition génique : l'édition ou la correction des séquences génomiques mutées ...	18
1.4 Le génie tissulaire pour la formation des peaux reconstruites	21
1.5 La thérapie génique combinée au génie tissulaire pour traiter l'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive.....	24
1.6 Quelles cellules utiliser pour traiter l'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive à l'aide de la thérapie génique et du génie tissulaire	25
1.7 Les essais cliniques associant la thérapie génique ex vivo au génie tissulaire.....	29
1.8 Hypothèse et objectifs	30
Chapitre 2 : Une peau reconstruite avec des kératinocytes et des fibroblastes génétiquement modifiés pour le traitement de l'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive .	32
2.1 Résumé	32
2.2 Manuscrit à être soumis pour publication	33
2.2.1 Abstract.....	34
2.2.2 Introduction	35
2.2.3 Material and Methods	36
2.2.3.1 Plasmids	37
2.2.3.2 Cell culture.....	37
2.2.3.3 Retroviral infection	38
2.2.3.4 Tissue-engineered skin.....	38
2.2.3.5 Fluorescence-activated cell sorting, immunofluorescence and histological analysis	39

2.2.3.6	Statistical analysis	40
2.2.4	Results	41
2.2.4.1	Efficient transduction of human fibroblasts and keratinocytes with vectors produced from 293Vec packaging cell lines in presence of the EF-C peptide	41
2.2.4.2	Efficient retroviral delivery of the COL7A1 gene to human fibroblasts and keratinocytes in the presence of EF-C	43
2.2.4.3	Transduced fibroblasts and keratinocytes self-assemble in tissue-engineered skin substitutes and express the exogenous collagen VII	44
2.2.4.4	Transduced keratinocyte stem cells are preserved in TES	46
2.2.4.5	The epidermal proliferation and differentiation profiles are conserved in TES made with transduced keratinocytes	46
2.2.5	Discussion	48
2.2.6	Acknowledgments	49
2.2.7	Conflicts of Interest	50
2.2.8	References	50
Chapitre 3	Discussion, perspectives et conclusion	55
Références	63
Appendice 1	Strategies integrating gene therapy and tissue engineering into the development of treatments for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa	73

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Les protéines exprimées au cours de la différenciation des kératinocytes.....	2
Tableau 1.2. Classification des types d'épidermolyse bulleuse.....	6
Tableau 1.3. Les thérapies en développement pour le traitement de l'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive	19

Liste des figures

Figure 1.1. Structure de la peau.....	1
Figure 1.2. Représentation schématique des interactions entre les fibrilles d'ancrage et d'autres composants de la jonction dermo-épidermique.....	3
Figure 1.3. Polymérisation des fibrilles d'ancrage.....	4
Figure 1.4. Morphologie caractéristique des colonies formées par les kératinocytes selon leur état de différenciation.....	22
Figure 1.5. Peau reconstruite produite par génie tissulaire selon l'approche d'auto-assemblage.....	23
Figure 1.6. Représentation schématique des stratégies <i>ex vivo</i> associant la thérapie génique et le génie tissulaire pour fournir un traitement pour l'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive (EBDR)	28
Figure 2.1. Analysis of GFP expressing cells by flow cytometry.....	42
Figure 2.2. Expression of HA-COLVII in monocultured transduced cells.....	43
Figure 2.3. Production of HA-COLVII in tissue-engineered skin substitutes.....	45
Figure 2.4. Detection of HA-COLVII and K19 in tissue-engineered skin substitutes.....	46
Figure 2.5. Differentiation profile of tissue-engineered skin substitutes.....	47

Liste des abréviations

AAV	Virus associé à l'adénovirus ; acronyme de la terminologie anglaise pour <i>adeno-associated virus</i>
ADA-SCID	Déficit en adénosine désaminase causant une déficience immunitaire combinée sévère ; acronyme de la terminologie anglaise pour <i>adenosine deaminase severe combined immunodeficiency</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ampho	<i>Amphotropic murine leukemia virus</i>
ARN	Acide ribonucléique
Baev	<i>Baboon endogenous virus</i>
BrdU	5'-bromo-2'-déoxyuridine
CAS9	Protéine 9 associée au CRISPR; acronyme de la terminologie anglaise pour <i>CRISPR associated protein 9</i>
CFE	Efficacité à former des colonies ; acronyme de la terminologie anglaise pour <i>colony-forming efficiency</i>
CGD	Granulomatose septique chronique ; acronyme de la terminologie anglaise pour <i>chronic granulomatous disorder</i>
COLVII	Collagène de type VII ; acronyme de la terminologie anglaise pour <i>type VII collagen</i>
CRISPR	Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées; acronyme de la terminologie anglaise pour <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CSM	Cellules souches mésenchymateuses (appelées <i>mesenchymal stem cells</i> (MSC) en anglais)
CSTA	Cellules souches dérivées du tissu adipeux (appelées <i>adipose-derived stem cells</i> (ADSC) ou <i>adipose stem cells</i> (ASC) en anglais)
DEB	EB dystrophique ; acronyme de la terminologie anglaise pour <i>dystrophic EB</i>
DEJ	Jonction dermo-épidermique ; acronyme de la terminologie anglaise pour <i>dermal-epidermal junction</i>
EB	Épidermolyse bulleuse
EBDR	Épidermolyse bulleuse dystrophique récessive (appelée <i>Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa</i> (RDEB) en anglais)
EF-C	Facteur de liaison C; acronyme de la terminologie anglaise pour <i>enhancing factor C</i>
EGF	Facteur de croissance épidermique ; acronyme de la terminologie anglaise pour <i>epidermal growth factor</i>
EPU	Unité épidermique de prolifération; acronyme de la terminologie anglaise <i>epidermal proliferation unit</i>
FACS	Cytométrie en flux ; acronyme de la terminologie anglaise pour <i>fluorescence-activated cell sorting analysis</i>
FCS	Sérum de veau fœtal ; acronyme de la terminologie anglaise pour <i>fetal calf serum</i>
FISH	Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence ; acronyme de la terminologie anglaise pour <i>fluorescence in situ hybridization</i>
Galv	<i>Gibbon ape leukemia virus</i>
GFP	Protéine fluorescente verte ; acronyme de la terminologie anglaise pour <i>green fluorescent protein</i>
HA	Héماغlutinine

HA-COL7A1	Gène COL7A1 étiqueté avec hémagglutinine
HB-EGF	Facteur de croissance épidermique liant l'héparine ; acronyme de la terminologie anglaise pour <i>heparin-binding epidermal growth factor</i>
Hygror	Gène résistante à l'hygromycine; la terminologie anglaise pour <i>hygromycin resistance gene</i>
iHFL	Couche nourricière humaine irradiée ; acronyme de la terminologie anglaise pour <i>irradiated human feeder layers</i>
iPSC	Cellules souches pluripotentes induites ; acronyme de la terminologie anglaise pour <i>induced pluripotent stem cells</i>
JEB	EB jonctionnelle ; acronyme de la terminologie anglaise pour <i>junctional epidermolysis bullosa</i>
K	keratine
LTR	Longue répétition terminale ; acronyme de la terminologie anglaise pour <i>long terminal repeat</i>
MOI	Multiplicité d'infection ; acronyme de la terminologie anglaise pour <i>multiplicity of infection</i>
MoMLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
NC-1	Extrémité non collagénique 1
NC2	Extrémité non collagénique 2
OCT	<i>Optimum cutting temperature</i>
PTC	Codon d'arrêt prématuré ; acronyme de la terminologie anglaise pour <i>premature stop codon</i>
RD114	<i>Feline endogenous virus</i>
RPE65	Protéine de 65 kDa spécifique de l'épithélium rétinien pigmenté ; acronyme de la terminologie anglaise pour <i>retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein</i>
SASS-4	acronyme de la terminologie anglaise pour <i>self-assembled skin substitutes method</i>
SCID-X1	Déficit immunitaire combiné sévère lié au chromosome X ; acronyme de la terminologie anglaise pour <i>X-linked severe combined immunodeficiency</i>
SIN	Vecteurs rétroviraux auto-inactivés ; acronyme de la terminologie anglaise pour <i>self-inactivated</i>
T	Transduit ; transduced en anglais
TALEN	Nucléases effectrices de type activateur de transcription ; acronyme de la terminologie anglaise pour <i>transcription activator-like effector nucleases</i>
TES	Peau reconstruite par génie tissulaire ; acronyme de la terminologie anglaise pour <i>tissue-engineered skin</i>
U	Non transduit ; untransduced en anglais
WAS	Syndrome de Wiskott-Aldrich; acronyme de la terminologie anglaise pour <i>Wiskott-Aldrich Syndrome</i>
ZFN	Nucléase à doigt de zinc ; acronyme de la terminologie anglaise pour <i>zinc-finger nuclease</i>

Dédicace

*Aux enfants porteurs de l'EBDR, avec l'espoir que
ce travail puisse contribuer à leurs vies.*

À Gustavo Antonietto.

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier ma directrice de recherche, Dre Lucie Germain, qui m'a fait confiance et qui m'a accueillie dans son équipe pour me faire découvrir le génie tissulaire et les cellules souches. Je suis heureuse d'avoir eu cette belle occasion de travailler sous sa direction à ce projet passionnant. J'ai eu la possibilité de me dépasser autant au niveau personnel que professionnel.

Je remercie également mon codirecteur de recherche, Dr Manuel Caruso; sa patience, sa disponibilité et sa passion pour la recherche m'ont appris énormément sur la thérapie génique, un sujet nouveau pour moi.

À Danielle Larouche, une personne très positive qui a toujours eu le bon mot pour m'encourager. Son assistance, son don pour l'écriture et son esprit scientifique ouvert ont été une précieuse aide pendant mon cheminement.

La réussite de ce projet est aussi le résultat du soutien technique d'une équipe qui a partagé son savoir-faire. Je remercie chaleureusement le personnel de recherche et les étudiants de l'équipe souche : Israël Martel, Francis Bisson, Amélie Lavoie, Amélie Morissette, Caroline Simard-Bisson, Benjamin Goyer, Laurence Cantin-Warren et Sergio Cortez Ghio. Également, je remercie Karim Ghani, de l'équipe du Dr. Caruso. Chacun a contribué avec ses forces à m'apprendre un nouveau domaine d'étude. Merci de votre collaboration !

Merci à toute l'équipe et à mes amis du LOEX, particulièrement à Rina Guignard, de son intérêt pour mon projet et de ses précieux conseils. Merci aussi à Sébastien Larochelle qui, avec son aide technique, ses suggestions et ses questions, m'a fait beaucoup avancer.

Je remercie profondément mon amoureux, Gustavo Antonietto. Mon rêve de retourner aux études est devenu une réalité grâce à sa compréhension, à son encouragement, à son amour et surtout à sa patience.

À ma famille, spécialement à mes parents, Bernadete Dakiw Piacski et Nelson Piacski; je les remercie de leur encouragement et de leur amour, forces très importantes pour poursuivre mon chemin.

À mes amis, un gros merci pour l'amitié et la compréhension. Merci aussi à Camille Mercier qui a gentiment révisé la langue française de mon mémoire.

Un merci très spécial et particulier à mon fidèle ami, Alfredo, toujours présent avec son amour et sa discipline!

Enfin, merci aux organismes subventionnaires de ce projet: le Fonds Wilbrod-Bhérier (Université Laval), la Fondation Le Grand Défi Pierre Lavoie, les Instituts de recherche en Santé du Canada (IRSC), le Réseau de thérapie cellulaire et tissulaire (ThéCell) du Fonds de recherche du Québec en Santé (FRQS), la Fondation du CHU de Québec - Université Laval, la Fondation des pompiers du Québec pour les grands brûlés, la Chaire de recherche du Canada en Cellules Souches et Génie Tissulaire et la Chaire de recherche sur les organes reconstruits en laboratoire et leurs applications cliniques de la Fondation de l'Université Laval.

Avant-propos

L'étude présentée dans le cadre de ce mémoire de maîtrise visait le développement d'une approche intégrant la thérapie génique et le génie tissulaire pour le traitement de l'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive (EBDR). Notre équipe de recherche a associé l'expertise de la culture de tissus par génie tissulaire développée au centre de recherche en organogénèse expérimentale de l'Université Laval / LOEX à l'expertise en thérapie génique du centre de recherche en oncologie de l'Université Laval, deux centres du CHU de Québec-Université Laval. À cette étape du projet, ce travail nous a permis de mettre au point la technique de transduction de fibroblastes et de kératinocytes aux propriétés de cellules souches en utilisant le gène de la GFP comme marqueur. Par la suite, le gène codant pour le collagène de type VII portant une étiquette HA a été transduit avec la méthode optimisée dans des fibroblastes et des kératinocytes. Ces cellules ont ensuite été utilisées pour fabriquer des peaux reconstruites par la méthode d'auto-assemblage. Ce modèle a permis d'évaluer si le collagène de type VII portant l'étiquette HA produit s'intégrait bien au niveau de la jonction dermo-épidermique des peaux reconstruites.

Le premier chapitre est une introduction qui vise à présenter la pertinence du projet dans le cadre de l'EBDR, de dresser l'état des connaissances sur le sujet et de définir la problématique qui a mené à l'hypothèse de recherche, laquelle propose l'association de la thérapie génique au génie tissulaire pour développer un traitement pour l'EBDR. La revue de littérature est une synthèse des connaissances sur l'avancement des thérapies proposées pour le traitement de l'EBDR. L'introduction mise à jour a été basée sur le chapitre intitulé « Strategies integrating gene therapy and tissue engineering into the development of treatments for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa » (Appendice 1) publié en 2016 dans le 5^e chapitre du livre « Epidermolysis bullosa : Prevalence, Clinical Manifestations and Management ». L'écriture de ce chapitre a été une invitation de la maison d'édition Nova Publisher, Inc., qui a donné la permission de l'utiliser pour l'inclure dans ce mémoire. J'en suis la première auteure et les autres auteurs sont, dans l'ordre, Danielle Larouche, Francis Bisson, Karim Ghani, Manuel Caruso et Lucie Germain. J'ai réalisé la revue de la littérature et j'ai écrit le manuscrit en collaboration avec Danielle Larouche. J'estime ma contribution à la rédaction de l'article à 85%; le 15% restant correspond principalement aux révisions apportées par les autres auteurs.

Le chapitre 2 présente un article de recherche original en anglais rédigé à partir des résultats des analyses. L'article s'intitule « A tissue skin equivalent with genetically engineered keratinocytes and fibroblasts for the treatment of recessive dystrophic epidermolysis bullosa ». J'en suis la première auteure et les autres auteurs sont, dans l'ordre, Danielle Larouche, Karim Ghani, Francis Bisson, Sergio Cortez Ghio, Sébastien Larochelle, Véronique Moulin, Manuel Caruso et Lucie Germain. L'article sera soumis prochainement dans le « Journal of Investigative Dermatology ». J'ai planifié le protocole de recherche et d'analyse sous la direction de Lucie Germain et la codirection de Manuel Caruso. J'ai exécuté les manipulations à l'aide de Francis Bisson. Sergio Cortez Ghio m'a aidée dans la conception des analyses statistiques des résultats. Danielle Larouche a contribué par ses commentaires critiques tout au long de la réalisation du projet. J'estime ma contribution à la rédaction de l'article à 70% ; le 30% restant correspond principalement aux révisions apportées par Manuel Caruso et les autres auteurs.

L'objet du chapitre 3 est une discussion qui présente un retour sur les principaux résultats du projet, une présentation des forces et des limites de l'étude, ainsi que de différentes perspectives pour la poursuite du projet.

Chapitre 1 : Introduction

1.1 La peau

La peau est formée de plusieurs couches cellulaires présentant des caractéristiques spécifiques à leur état de différenciation. L'épiderme, la couche la plus superficielle de la peau, est composée principalement de kératinocytes (> 80% de toutes les cellules de l'épiderme) (1). Dans cette couche, des populations mineures de cellules, telles que les cellules de Langerhans, les mélanocytes et les cellules de Merkel, sont également présents (2). L'épiderme est stratifié, avec 4 couches bien définies de kératinocytes, soit la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée (Figure 1.1).

Il est reconnu que les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme sont en division active. Un sous-groupe de cette population hétérogène de cellules maintient l'épiderme, ce sont les cellules souches. Selon le modèle de la division asymétrique, les cellules souches épithéliales cutanées se divisent asymétriquement, avec la production d'un clone de cellule souche et d'une cellule amplificatrice transitoire. La cellule amplificatrice transitoire est soumise à un grand nombre, mais limité de divisions cellulaires. La descendance de ces cellules peuplent les autres couches de l'épiderme et, après l'arrêt de la prolifération, elles commencent à se différencier (3, 4).

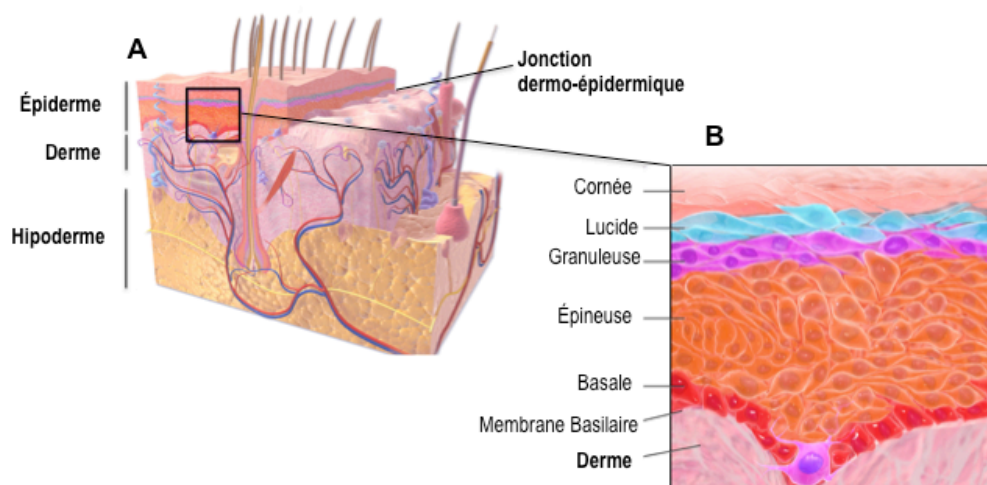


Figure 1.1. Structure de la peau. (A) Le derme et l'épiderme sont les deux principales couches de la peau, soutenues par l'hypoderme. L'interface entre le derme et l'épiderme est appelée la jonction dermo-épidermique. (B) L'épiderme est formé par les couches basale, épineuse, granuleuse et cornée, selon l'état de

différenciation des kératinocytes. La cohésion entre le derme et l'épiderme est assurée par la membrane basilaire. La couche lucide est présente dans les régions du corps où l'épiderme est épais, telles que la paume des mains et la plante des pieds. Adaptation de la figure Epidermis de Blausen.com staff. "Medical gallery of Blausen Medical 2014". Wikijournal of Medicine 1 (2). doi:10.15347/wjm/2014.010. ISSN 2001-8762. https://en.wikiversity.org/wiki/Wikijournal_of_Medicine/Wikijournal_of_Medicine/Medical_gallery_of_Blausen_Medical_2014. Libre distribution selon les termes de *Creative Commons Attribution- ShareAlike License*. (5)

Pendant le processus de différenciation, les kératinocytes acquièrent une composition moléculaire et des caractéristiques morphologiques distinctes (6). Ceci permet à la peau d'exercer différentes fonctions, comme la barrière sélective dynamique entre l'extérieur et l'intérieur de l'organisme, la protection face aux agressions chimiques, biologiques et physiques (forces mécaniques, rayonnement ultraviolet) (4).

Ainsi, les différentes protéines exprimées au cours du processus de différenciation de l'épiderme sont utilisées comme marqueurs de prolifération et de différenciation cellulaire (Tableau 1.1). Par exemple, la couche basale est composée de cellules prolifératives exprimant les kératines 5, 14 et 15 (7). Dans cette couche, la présence de la protéine Ki67 indique l'état prolifératif des kératinocytes (8), et la présence de la kératine 19 est associée aux cellules souches (9). L'expression des kératines 1 et 10 dans les couches épineuses et granuleuses confirme l'état de différenciation de ces kératinocytes, ajouté à d'autres marqueurs plus tardifs de différenciation, tels que la transglutaminase et la loricrine (7). Finalement, la couche cornée est formée par des kératinocytes complètement différenciés et sans aucune activité métabolique. Ils procurent à l'épiderme sa fonction de barrière.

Tableau 1.1 : Les protéines exprimées au cours de la différenciation des kératinocytes

Couche de l'épiderme	Protéine
Cornée	Loricrine; Cornifine; Filaggrine; Involucrine; Trichohyaline
Granuleuse	Transglutaminase; K1; K2e; K9; K10; Desmogléine; Desmocoline; Cornifine; Kératohyaline; Loricrine; Profilaggrine; Involucrine
Épineuse	Transglutaminase; K1; K2e; K9; K10; K11 Desmogléine; Desmocoline
Basale	K5; K14; K15; K19 (sous-groupe)

Adaptation du tableau 1.3, page 17 du mémoire de maîtrise de Lavoie, A. Localisation, quantification, dynamique et organisation des cellules souches épithéliales cutanées humaines *in situ* et *in vitro*. Québec: Université Laval; 2009. (7)

La couche dermique, ou le derme, est composée principalement de fibroblastes (Figure 1.1), qui sont des cellules mésenchymateuses responsables de la production des fibres de collagène et d'élastine formant la matrice extracellulaire (10).

La cohésion entre le derme et l'épiderme est assurée par la membrane basilaire, qui est une structure en forme de feuillet constituée de différentes composantes matricielles (11). La membrane basilaire est formée de la *lamina lucida* et de la *lamina densa* (Figure 1.2). La liaison entre ces composantes et le derme papillaire se fait par les fibrilles d'ancrage composées de collagène de type VII (Figure 1.2) (12). Cette région de la peau est appelée la jonction dermo-épidermique. En outre, les fibroblastes sécrètent de nombreux composants de la membrane basilaire formant la jonction dermo-épidermique, tels que les collagènes de type IV et VII, la laminine 332 (anciennement nommée laminine 5) et le nidogène (13). Les cytokines libérées par les fibroblastes stimulent également la sécrétion des collagènes de type IV et VII par les kératinocytes (9, 14, 15).

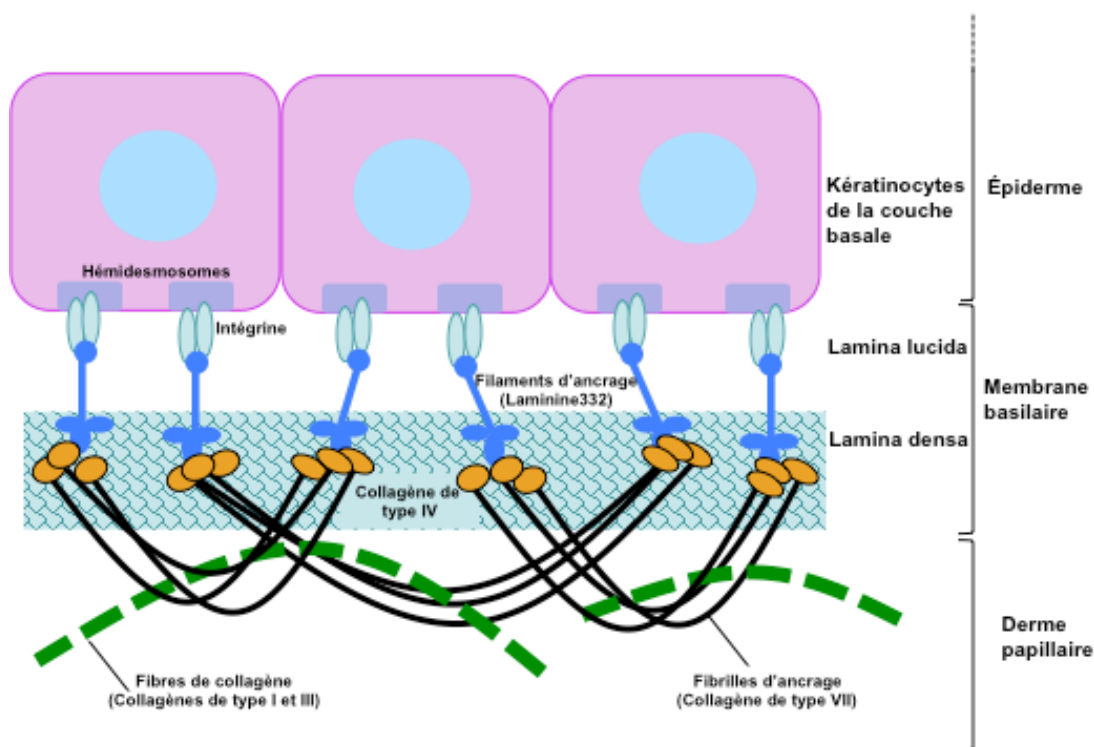


Figure 1.2. Représentation schématique des interactions entre les fibrilles d'ancrage et d'autres composants de la jonction dermo-épidermique. Le collagène de type VII, le composant principal des fibrilles d'ancrage, interagit avec les protéines de la matrice extracellulaire telles que la laminine 332 (composant des filaments d'ancrage) et le collagène de type IV (composant de la lamina densa), à travers les fibres de collagène, assurant ainsi la cohésion entre la membrane basilaire et le derme papillaire. Le lien entre les cellules de l'épiderme et de la lamina lucida est établi par l'interaction entre les hémidesmosomes et la laminine 332. Adaptation de la figure 1.B du livre : Epidermolysis Bullosa (EB): Prevalence, Clinical

1.1.1 Le collagène de type VII

Dû à l'important rôle du collagène de type VII dans la cohésion entre le derme et l'épiderme, et puisque des mutations au sein de son gène sont à l'origine de l'EBDR, une attention particulière sera accordée à celui-ci. Le gène *COL7A1* est localisé au chromosome 3p21.31 et son ADN de 32 kb contient 118 exons (16). Sa transcription génère un ARN messager de 8.9 kb qui est traduit en $\alpha 1(\text{VII})$ polypeptide. Ce dernier est par la suite polymérisé et sécrété comme un homotrimère du procollagène de type VII par les fibroblastes et par les kératinocytes dans l'espace extracellulaire. Ensuite, le procollagène de type VII subit des modifications post-transcriptionnelles pour former le collagène de type VII fonctionnel. Une fois assemblé en dimères antiparallèles, le collagène de type VII forme les fibrilles d'ancrage (17-22) (Figure 1.3). Le collagène de type VII interagit avec les protéines de la matrice extracellulaire, comme la laminine 332 et le collagène de type IV, pour former une structure qui contribue à la stabilisation de la connexion entre la membrane basilaire épidermique et le derme papillaire (17, 20, 21) (Figure 1.2).

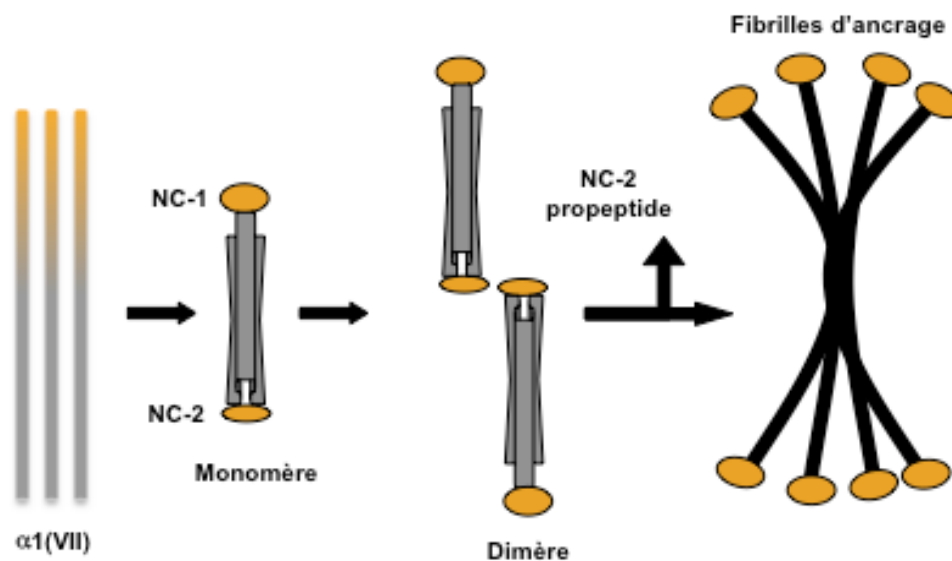


Figure 1.3. Polymérisation des fibrilles d'ancrage. Le gène *COL7A1* code pour le collagène de type VII, qui est normalement sécrété dans l'espace extracellulaire par les fibroblastes dermiques et les kératinocytes épidermiques. Cette protéine est un homotrimère formé de 2 chaînes de $\text{pro}\alpha 1$ collagène (VII) et chaque

chaîne comprend un domaine collagénique G-X-Y central de 145 kDa flanqué des extrémités non collagéniques NC1 (145 kDa) et NC2 (34 kDa). Dans la matrice extracellulaire, le collagène de type VII forme des dimères antiparallèles disposés bout à bout après le clivage du domaine NC2. Ensuite, ces molécules se réunissent pour former la fibrille d'ancrage, un élément majeur de la jonction dermo-épidermique responsable de l'adhérence entre le derme et l'épiderme. Adaptation de la figure 1.A du livre : Epidermolysis Bullosa (EB): Prevalence, Clinical Manifestations and Management, Strategies integrating gene therapy and tissue engineering into the development of treatments for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa, 77-114, copyright 2016. Piaciski, AD.; Larouche, D.; Bisson, F.; Ghani, K.; Caruso, M.; Germain, L. Avec la permission de Nova Science Publishers, Inc. $\alpha 1(VII)$: pro $\alpha 1$ collagène (VII), kDa : kilodalton, NC-1 : extrémité non collagénique 1, NC2 : extrémité non collagénique 2.

1.2 L'épidermolyse bulleuse

L'intégrité de la peau peut être affectée par des mutations, c'est le cas notamment dans les maladies génétiques rares connues sous le nom d'épidermolyse bulleuse (EB).

L'EB est caractérisée par la fragilité mécanique et structurale de la peau et des muqueuses (23). Elle est causée par l'absence ou la non-fonctionnalité de différentes protéines importantes pour l'adhésion intercellulaire des cellules épithéliales ou pour l'adhésion de l'épiderme au derme. Ces défauts peuvent mener à des décollements légers de l'épiderme jusqu'à la formation de bulles sévères, d'érosions, de cicatrices et de mutilations. Les patients atteints d'EB souffrent donc de plaies récurrentes et les complications associées varient selon la sévérité de la maladie et peuvent même entraîner la mort (16, 24, 25). Les soins médicaux dédiés aux patients porteurs de l'EB demandent une équipe multidisciplinaire de médecins et infirmières qui appartiennent à différentes spécialités, comme la dermatologie, la chirurgie plastique, la gastroentérologie, l'hématologie, l'ophtalmologie, la cardiologie, la dentisterie et la pédiatrie (16, 24, 25). Par conséquent, même si les malades sont peu nombreux, les coûts associés aux soins de ces patients sont importants.

Selon le type de protéine affectée par la mutation autosomale, les quatre types majeurs d'EB sont l'EB simplex, l'EB jonctionnelle, l'EB dystrophique et le syndrome de Kindler (Tableau 1.2) (26). Dans le cadre de ce mémoire, le traitement en développement vise le soin de l'EB dystrophique récessive.

Tableau 1.2 : Classification des types d'épidermolyse bulleuse

Type d'épidermolyse bulleuse (EB)	Région de la peau affectée	Protéine mutée
EB simplex	Épiderme suprabasal	Transglutaminase 5 Plakoglobine Plakophiline 1 Desmoplakine
	Épiderme basal	Kératine 5 Kératine 14 Plectine BP230 Exophiline
EB jonctionnelle	Lamina lucida	Intégrine $\alpha 6\beta 4$ Intégrine $\alpha 3$ Collagène XVII Laminine 332
EB dystrophique dominante ou récessive	Sub-lamina densa	Collagène VII
Syndrome de Kindler	Variée	Kindline-1

(26, 27).

1.2.1 L'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive

L'EB dystrophique est causée par des mutations dominantes ou récessives du gène *COL7A1* qui code pour le collagène de type VII (28, 29). Puisque cette protéine participe à l'attachement de l'épiderme au derme au niveau de la jonction dermo-épidermique, un simple frottement mécanique peut provoquer le décollement entre ces deux couches en cas de perte de fonction du collagène de type VII. Les patients sont également aux prises avec des difficultés de cicatrisation. La sévérité du phénotype varie selon le type de mutation. Normalement, les cas plus sévères d'EB dystrophique sont associés aux mutations récessives (EBDR) (16).

Plus de 730 mutations et variantes du gène *COL7A1* associées à la maladie EBDR ont été enregistrées dans des différentes bases de données en ligne (30, 31). Les mutations pathologiques conduisent à la production d'un collagène de type VII non fonctionnel ou à son absence. En conséquence, les fibrilles d'ancrage de la jonction dermo-épidermique ne sont pas assemblées correctement ou ne sont pas formées, ce qui réduit l'adhérence entre le derme et l'épiderme et provoque des plaies. Les patients atteints d'EBDR souffrent donc de ces plaies pendant toute leur vie (24). Des protéines partiellement fonctionnelles produisent des phénotypes plus atténués de l'EBDR (17). D'autres symptômes, comme la déformation des mains et des pieds, l'anémie, la malnutrition et

le retard de croissance sont également associés à la maladie avec des degrés divers de sévérité (16, 26). La cardiomyopathie est aussi une des complications associées à l'EBDR (24).

En plus de son rôle dans l'assemblage des fibrilles d'ancrage, le collagène de type VII est important pour la migration des kératinocytes dans le processus de réparation des plaies (28, 32). La protéine non fonctionnelle ou son absence peut donc entraver ce processus (32). En conséquence, chez certains patients EBDR, le manque de collagène de type VII empêche la guérison des plaies provoquées par son absence (33). Puisque les plaies chroniques et l'inflammation augmentent le risque de développer un cancer, une prévalence élevée de carcinomes cellulaires squameux est observée chez les patients EBDR dans les régions de la peau où il y a d'intenses décollements (24, 34-36). Ce risque est aussi augmenté par la présence d'infection par des bactéries flagellées (37). Selon Fine et ses collaborateurs, plus de 80% des patients avec la forme sévère de l'EBDR vont mourir d'une métastase provenant d'un carcinome squameux à un âge moyen de 45 ans, et la survie sur 5 ans pour ce cancer est presque nulle (36). En outre, les kératinocytes EBDR sont morphologiquement différents des kératinocytes normaux (38) et leur motilité *ex vivo* est plus grande, ce qui favoriserait le processus de cancérogenèse (39, 40).

À ce jour, il n'y a aucun traitement curatif pour l'EBDR ni pour les autres sous-types d'EB. Les interventions thérapeutiques ont pour but de contrôler l'infection et la douleur, de favoriser la guérison des plaies et de protéger la peau des traumatismes (16, 27, 41, 42). Toutefois, la morbidité associée à cette maladie demeure importante. En plus d'améliorer significativement la qualité de vie des patients, un traitement permanent et précoce des plaies, tel que la greffe de peaux reconstruites par génie tissulaire, éviterait leur récurrence ainsi que les complications comme les difformités ou le développement de carcinomes.

1.3 Les thérapies en développement pour traiter l'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive

L'objectif de toute thérapie pour l'EBDR est de remplacer le collagène de type VII défectueux par une forme fonctionnelle capable de s'intégrer correctement à la jonction dermo-épidermique et de former des fibrilles d'ancrage efficaces (43). Ainsi, différentes approches pour développer un

traitement pour l'EBDR ont été envisagées, telles que l'utilisation d'une protéine recombinante, la thérapie cellulaire et la thérapie génique (Tableau 1.3).

Plusieurs études ont démontré que l'expression correcte du collagène de type VII par les kératinocytes EBDR leur permet de récupérer une morphologie normale (39, 40, 43, 44). Cependant, il y a des facteurs importants qui doivent être considérés lors de l'élaboration des stratégies de traitements pour l'EBDR. Par exemple, l'expression augmentée du collagène de type VII a été associée à des problèmes tels que la fibrose (17). En outre, après la transduction rétrovirale des kératinocytes pour introduire le gène *COL7A1*, une augmentation de la migration et de l'invasion des kératinocytes EBDR provenant d'un carcinome cellulaire squameux a été observé (35). Ce comportement a été associé à un niveau de collagène de type VII qui a beaucoup dépassé celui de l'état physiologique, en association avec une activation augmentée de la voie PI3K. Par conséquent, il est possible que la réexpression du collagène de type VII dans des kératinocytes EBDR malins ou précancéreux conduise à une surproduction de cette protéine pouvant mener à des effets indésirables (35). Des investigations préliminaires par profilage protéomique sur le potentiel cancéreux des cellules génétiquement modifiées pourrait aider à éviter le traitement d'un patient avec une thérapie inappropriée (45). Il a été démontré dans un modèle animal qu'un minimum de 35% du niveau physiologique de collagène de type VII est nécessaire pour une bonne adhérence dermo-épidermique (46). Pour éviter les effets néfastes d'une surproduction de collagène de type VII mentionnés ci-haut, le développement d'un traitement contre l'EBDR ne devrait pas viser un niveau de collagène de type VII dépassant son niveau physiologique.

Un autre facteur à considérer est la réponse immunitaire potentielle contre le collagène de type VII nouvellement introduit (44, 47). Quand un modèle murin « *knockout* » pour le collagène de type VII a été utilisé pour évaluer la distribution du collagène de type VII humain recombinant après son injection intradermique, des anticorps circulants dirigés contre le collagène de type VII humain ont été mesurés dans le sang des souris 4 semaines après le traitement. Toutefois, les anticorps ne se sont pas liés au collagène de type VII humain nouvellement intégré dans la jonction dermo-épidermique et n'ont donc pas déclenché de réactions immunitaires (48). Dans une autre étude, la présence d'anticorps anti-collagène de type VII dans le sérum ou dans des échantillons de la peau provenant de 22 patients atteints d'EBDR a été évaluée afin de caractériser le phénotype de la maladie. Parmi les 11 patients dont le sérum a montré une réactivité contre le collagène de type VII par ELISA, aucun de ces patients n'a présenté de réaction immunitaire dirigée contre le collagène de



type VII dans la peau. La présence de ces anticorps sur ces patients non traités est liée aux protéines non fonctionnelles produites par ces patients. Dans cette étude, aucune corrélation n'a été observée entre la présence d'anticorps anti-collagène de type VII dans la peau des patients et le niveau d'expression de la protéine du collagène de type VII, le type de mutation du gène *COL7A1*, l'âge des patients ou la sévérité de l'EBDR (49). Par contre, Tampoia et ses collaborateurs ont observé une corrélation entre les titres élevés d'anticorps anti-collagène de type VII et le score de Birmingham de 15 sur 17 patients EBDR évalués (50). Le score de Birmingham est un indice du degré de sévérité de l'EB (50).

Néanmoins, d'autres études doivent être faites pour veiller à ce que la présence d'anticorps anti-collagène de type VII circulants ne soit pas une contre-indication à l'introduction d'une nouvelle forme de collagène de type VII chez les patients atteints d'EBDR. Si c'est le cas, la sélection des patients pour les essais cliniques devra se faire avec prudence (49), en particulier chez les patients avec des mutations nulles qui n'expriment aucune forme de collagène de type VII (47). S'il y a en effet un risque de développer une réaction immunitaire contre le collagène de type VII, les tests immunologiques validés permettant la détection d'une immunité préexistante contre le collagène de type VII pourraient être utilisés pour sélectionner les patients admissibles pour la thérapie (51).

Puisqu'il y a plus de 730 mutations qui peuvent causer l'EBDR, les stratégies de traitement pourraient varier en fonction de la mutation responsable de la maladie. Par exemple, environ 10-25% des patients atteints d'EBDR ont des mutations non-sens dans le gène *COL7A1* (43). Il a été démontré *ex vivo* que les aminoglycosides, qui regroupent des antibiotiques, tels que la gentamicine, la généticine et la paromomycine, permettent aux ribosomes de franchir les PTCs (acronyme de la terminologie anglaise pour *premature stop codon*, codon d'arrêt prématuré) créés par des mutations non-sens dans le gène *COL7A1* lors de la transcription. Ainsi, le traitement *in vitro* de fibroblastes et de kératinocytes isolés de patients EBDR avec des aminoglycosides a permis l'expression du collagène de type VII. La faisabilité de l'utilisation de cette classe d'agents pour le traitement des mutations PTC sur les cellules EBDR a été confirmée dans une étude sur des peaux reconstruites *in vitro*. En effet, du collagène de type VII intégré à la jonction dermo-épidermique a été observé dans les peaux reconstruites *in vitro* avec des cellules EBDR traitées avec des aminoglycosides (43). Cependant, les effets secondaires et les risques associés à l'administration à long terme de ces médicaments restent à définir. Des molécules moins toxiques, telles que PTC124 (dérivé non-aminoglycoside), sont actuellement en cours de développement, mais leur efficacité est controversée

(43, 52). Une étude clinique (Identifiant NCT02698735 (53)) devra confirmer l'utilité de l'application topique ou intradermique de la gentamicine pour le traitement des mutations associées aux PTC sur les patients EBDR.

1.3.1 La thérapie par remplacement de protéines

La thérapie par remplacement de protéines est une approche usuelle pour le traitement de plusieurs maladies. Pour traiter l'EBDR, la thérapie par remplacement du collagène de type VII est une thérapie temporaire qui consiste à administrer des injections répétées de protéine recombinante localement ou systémiquement. La première démonstration de la puissance de cette stratégie pour le traitement de l'EBDR a été publiée en 2004 par Woodley et ses collaborateurs (54). Des études précliniques chez la souris athymique (54) ou chez la souris dont le gène du collagène de type VII a été inactivé (48, 55, 56) ont fourni la preuve de concept que le collagène de type VII humain injecté est capable de former les fibrilles d'ancrage à la jonction dermo-épidermique, même en présence d'anticorps circulants contre le collagène de type VII humain (48, 54, 56). Cependant, quelques inconvénients doivent être surmontés pour que la thérapie par remplacement du collagène de type VII soit applicable chez l'homme. Comme le collagène de type VII est faiblement soluble dans des solutions aqueuses, la réduction du volume d'injection ainsi que l'augmentation du rendement de production de la protéine représentent des défis importants (57). En plus, la sécurité du traitement et les coûts associés à son administration à vie doivent également être pris en considération. Un autre facteur très important est la stabilité du collagène de type VII dans la peau. Une étude récente réalisée chez des souris génétiquement modifiées a démontré que la demi-vie du collagène de type VII exogène et endogène correctement déposé dans la jonction dermo-épidermique est similaire (58). Pourtant, les propriétés pharmacocinétiques des protéines recombinantes administrées peuvent varier (58). Cette observation a des impacts sur le dosage et la fréquence de l'application de la protéine pour les différentes thérapies en développement (59). À cet effet, les résultats d'un essai clinique sont attendus (60, 61).

1.3.2 La thérapie cellulaire

« La thérapie cellulaire est définie comme étant l'administration de cellules entières vivantes ou de la maturation d'une population de cellules spécifiques chez un patient pour le traitement d'une maladie » (62). Trois approches principales pour le traitement des lésions de la peau de patients atteints d'EBDR ont été explorées en thérapie cellulaire : l'injection locale de cellules dans le derme, leur injection directement dans la circulation sanguine systémique et la transplantation de moelle osseuse allogénique.

Il a été démontré que l'injection intradermique de fibroblastes allogéniques sains chez les patients EBDR a augmenté l'expression du collagène de type VII à la jonction dermo-épidermique (63). Des effets positifs chez les patients traités ont été observés pendant plusieurs mois, bien que les fibroblastes des donneurs étaient indétectables 2 semaines après l'injection. De façon surprenante, les fibrilles d'ancrage étaient structurellement défectueuses, puisque le collagène de type VII a été principalement exprimé par les propres cellules du patient et non par les fibroblastes allogéniques injectés. Les auteurs suggèrent que l'effet majeur des fibroblastes allogéniques serait d'augmenter les niveaux d'ARN messager du gène *COL7A1* endogène. En conséquence, le dépôt du collagène de type VII mutant à la jonction dermo-épidermique serait augmenté, ce qui permettrait la formation de fibrilles d'ancrage minimalement fonctionnelles (63). Nagy et ses collaborateurs ont corroboré ces résultats dans une étude en double aveugle menée sur un patient EBDR où ils ont observé l'expression du collagène de type VII exogène et endogène pendant environ 9 mois après une seule injection de fibroblastes. L'expression du gène *COL7A1* au niveau de l'ARN messager a été observée jusqu'à 3 mois, probablement à cause de l'augmentation de l'expression de l'allèle *COL7A1* mutant. En réponse à l'injection intradermique des fibroblastes allogéniques, le mécanisme qui sous-tend la régulation à la hausse de l'expression du collagène de type VII du patient EBDR semble impliquer le HB-EGF (acronyme de la terminologie anglaise pour *heparin-binding epidermal growth factor*, facteur de croissance épidermique liant l'héparine), dont le niveau a augmenté de plus de 3 fois chez le patient (64). Les auteurs ont émis l'hypothèse que l'injection des fibroblastes induit une inflammation, ce qui conduit à la régulation positive du HB-EGF, probablement par une augmentation de l'expression du facteur de transcription AP-1 (64). Toutefois, cette étude n'a pas montré de différences entre l'injection des fibroblastes ou d'une solution saline sur l'extension ou le taux de ré-épithélialisation de deux érosions chroniques de patients EBDR (64). Une limitation

majeure de cette approche est que le HB-EGF est impliqué dans de nombreux processus tumorigènes et que les patients EBDR sont à risque élevé de développer un carcinome cellulaire squameux (64-66). Les auteurs ont conclu que l'inflammation, qui a également eu lieu avec le traitement placebo, était suffisante pour provoquer une augmentation de l'expression du collagène de type VII (64). L'effet de l'injection des fibroblastes allogéniques sur la fermeture des plaies de patients EBDR a été évalué subséquemment dans deux études (67, 68). Une des deux études a montré que tant les fibroblastes allogéniques que la solution placebo ont été efficaces pour la fermeture des plaies, indépendamment de la régénération du collagène de type VII (67). Les auteurs ont suggéré que la présence de l'albumine dans le milieu pour stabiliser les fibroblastes a pu augmenter la cicatrisation des plaies observée dans le traitement expérimental ainsi que dans la condition placebo. L'autre étude a démontré que l'injection de fibroblastes allogéniques était plus efficace que la solution placebo pour stimuler la fermeture des plaies jusqu'à 28 jours après le traitement (68). La petite taille de l'échantillonnage, la différence entre les protocoles d'étude, les cellules et les solutions utilisées entre les deux études peuvent justifier les différences observées. Pourtant, considérant que le traitement n'est pas permanent et qu'il est douloureux pour le patient, l'utilité de cette approche reste à déterminer.

La perfusion intradermique des cellules mésenchymateuses stromales allogéniques a mené à une amélioration de l'intégrité de la jonction dermo-épidermique chez deux patients EBDR qui n'exprimaient pas de collagène de type VII. De plus, du collagène de type VII a été détecté dans la jonction dermo-épidermique de la peau intacte chez ces patients ainsi qu'au niveau des plaies chroniques. Cet effet a été observé une semaine après la perfusion des cellules mésenchymateuses et a duré 4 mois. En outre, la ré-épithélialisation de la peau endommagée a été restreinte à la zone imprégnée de cellules mésenchymateuses, soutenant l'efficacité du traitement (69). L'administration intraveineuse de cellules mésenchymateuses allogéniques a été évaluée sur 10 enfants porteurs de l'EBDR dans une étude clinique de phase I. Comme ce fut le cas pour l'injection de fibroblastes allogéniques mentionnée auparavant, une augmentation du collagène de type VII ou la formation de nouvelles fibrilles d'ancrage n'a pas été observée malgré l'amélioration de la condition des plaies des patients (70).

Basé sur les expériences passées de transplantation de cellules souches de la moelle osseuse (71), Tolar et Wagner ont proposé des stratégies améliorées pour utiliser cette source de cellules pour produire le collagène de type VII chez les patients EBDR (72). Dans une étude clinique

réalisée sur 20 patients atteints d'EBDR traités par cette approche, une amélioration de l'intégrité de la peau et de la qualité de vie a été observée chez la majorité des patients. Même si une guérison complète n'a pas été obtenue, les effets bénéfiques ont même été perceptibles jusqu'à 5 ans après le traitement. Quoique les mécanismes qui expliquent cette amélioration n'aient pas encore été confirmés, l'injection des cellules souches de la moelle osseuse pourrait induire une inflammation, et conséquemment, la régulation positive du HB-EGF, de la même façon qu'il a été observé avec l'injection des fibroblastes allogéniques, discuté précédemment dans ce chapitre. D'autre part, des mécanismes endogènes de régénération de la peau non liés au collagène de type VII pourraient être impliqués. Deux autres hypothèses ont été soulevées par les auteurs. La première est que les leucocytes circulants pourraient sécréter assez de collagène de type VII pour former des fibrilles d'ancrage fonctionnelles. La deuxième est que les cellules souches non-hématopoïétiques de la moelle osseuse pourraient migrer vers les plaies et s'y établir. L'avantage de cette stratégie réside dans la possibilité d'offrir un traitement systémique pour l'EBDR. Toutefois, certains inconvénients importants sont associés au processus, comme par exemple, la myéloablation et la quantité de cellules qui devraient être injectées aux patients pour qu'assez de collagène de type VII soit produit et relocalisé dans les fibrilles d'ancrage. Une évaluation des risques et bénéfices pour les patients s'impose lors de l'utilisation d'une technique invasive comme la myéloablation.

Certains patients atteints d'EBDR présentent un mosaïcisme révertant. Dans cette condition, les kératinocytes révertants sont caractérisés par une correction somatique spontanée du gène *COL7A1* délétère. Cette situation est particulièrement avantageuse pour la thérapie cellulaire car elle offre la possibilité de sélectionner les cellules cutanées révertantes pour des applications en thérapie cellulaire ou en génie tissulaire sans manipulation du génome (73) puisque ces cellules sont naturellement corrigées, ce qui s'avèrerait un avantage pour la sécurité du patient. De plus, le coût du traitement serait plus faible s'il n'y a pas de vecteur à produire. Toutefois, il faut être en mesure de s'assurer que des cellules révertantes souches sont conservées dans les cultures et les tissus reconstruits et qu'ils peuvent survivre à long terme après leur transplantation.

En cas de difficultés à cultiver les cellules révertantes cutanées en nombre suffisant pour traiter un patient, une alternative serait de reprogrammer les cellules révertantes en cellules souches pluripotentes induites (iPSC, acronyme de la terminologie anglaise pour *induced pluripotent stem cells*) qui peuvent ainsi être amplifiées *in vitro*. Tolar et ses collaborateurs ont réussi à générer des iPSCs à partir de kératinocytes révertants de patients EBDR et de les reprogrammer en cellules

hématopoïétiques et en kératinocytes normaux par la suite (74). La faisabilité de la stratégie visant à générer des iPSCs à partir de fibroblastes de souris déficientes en collagène de type VII (75) ou de kératinocytes de patients souffrant d'EBDR (76), suivi de la reprogrammation des iPSCs en fibroblastes ou kératinocytes normaux et de leur utilisation pour fabriquer des peaux reconstruites a été montrée. Toutefois, même si l'approche par iPSCs est intéressante, elle nécessite de nombreuses manipulations géniques en laboratoire dont les risques pour les patients devront être évalués.

Plusieurs sources accessibles de cellules souches dont les conditions de culture sont bien établies sont disponibles chez l'adulte pour la thérapie cellulaire, telles que les cellules progénitrices de l'épiderme, les cellules souches mésenchymateuses stromales et les cellules souches dérivées du tissu adipeux (77, 78). D'autres sources riches en cellules souches telles que le placenta, le cordon ombilical (68), le sang du cordon ombilical et de la membrane amniotique ont également été proposées (78, 79), et les récents progrès dans l'utilisation de ces sources ont été passés en revue par Nevala-Plagemann et al. (79).

1.3.3 La thérapie génique

Le transfert de gène est une technique qui a été utilisée depuis plus de 30 ans pour étudier la fonction et la régulation des gènes *in vitro*. La thérapie génique est définie par le transfert d'un acide nucléique, soit l'ARN ou l'ADN, pour traiter ou prévenir une maladie (80). Cette approche est maintenant utilisée pour traiter différentes maladies génétiques et acquises. Diverses stratégies peuvent être envisagées telles que la correction d'un gène muté, par la modification du génome ou la modification de l'ARN messager défectueux par trans-épissage. Dans le cas d'une mutation récessive, le phénotype de type sauvage de la cellule peut être restauré par l'introduction d'une copie saine du gène. En 1989, Rosenberg et ses collaborateurs ont effectué le premier essai dans lequel des patients étaient injectés avec des cellules génétiquement modifiées (81). Depuis, plus de 1800 essais cliniques en thérapie génique ont été réalisés, sont en cours ou ont été approuvés dans le monde entier (82). Dans la dernière décennie, la thérapie génique a commencé à montrer des avantages cliniques importants chez les patients. Par exemple, la vue de patients atteints d'amaurose congénitale de Leber a été améliorée suite à l'injection dans la rétine d'un vecteur de

virus adéno-associé (AAV) contenant le transgène RPE65 (83, 84). Dans le cas de l'hémophilie B, certains patients ont pu arrêter les injections hebdomadaires de facteur IX après une injection intraveineuse d'un AAV contenant un transgène codant pour ce facteur de coagulation (85, 86). La thérapie génique a également été efficace pour le traitement de troubles d'immunodéficience tels que SCID-X1, ADA-SCID, CGD et WAS. Les progrès et les limites de ces approches thérapeutiques sont discutés dans une revue (87). Ces essais montrent que la thérapie génique *ex vivo* est une approche prometteuse pour le traitement des maladies génétiques et qu'elle a un potentiel évident pour le développement de différentes stratégies pour traiter l'EB de façon permanente.

1.3.3.1 Vecteurs utilisés en thérapie génique pour traiter l'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive

L'introduction d'un gène dans une cellule nécessite un véhicule car les gènes sont des acides nucléiques formant de grosses molécules chargées négativement. Des transporteurs non viraux, tels que les liposomes ou les molécules polycationiques, ou l'injection directe de l'ADN seul ou par électroporation, sont des méthodes qui se sont avérées inefficaces (33). Quoique l'intégration du gène avec un vecteur non viral puisse être considérablement améliorée par l'utilisation de l'enzyme viral intégrase, son efficacité demeure faible (88, 89).

Actuellement, l'utilisation des vecteurs viraux est le moyen le plus efficace pour transférer un gène dans une cellule cible. Toutefois, un bon vecteur viral doit être capable de livrer le gène thérapeutique dans les cellules sans les endommager (90, 91) et sans altérer les caractéristiques biologiques qui leur sont pertinentes. Pour le traitement de l'EBDR par thérapie génique, l'objectif est d'intégrer le gène fonctionnel du collagène de type VII dans le génome des fibroblastes et/ou des kératinocytes atteints d'EBDR afin que ceux-ci produisent du collagène de type VII, et ce, de façon permanente. Dans les études visant cet objectif, les systèmes viraux qui ont été les plus fréquemment utilisés sont les vecteurs rétroviraux (gamma-rétroviraux et lentiviraux), car ils sont capables d'intégrer leurs gènes dans l'ADN de l'hôte (80, 91) et sont conçus de sorte qu'ils soient incapables de se répliquer afin d'éviter le risque de dissémination virale. Plusieurs études portant sur la correction de gènes dans les cellules en culture ont démontré que ces vecteurs sont capables

d'accommoder un gène aussi gros que celui du COL7A1 et de le transférer dans des fibroblastes et des kératinocytes (39, 40, 44, 92-96).

Pour transférer le gène dans la cellule, le vecteur rétroviral doit être encapsidé dans une enveloppe virale formée de glycoprotéines capables de se lier aux récepteurs à la surface de la cellule cible. Une fois lié, le vecteur fusionne avec la membrane cellulaire et libère l'ARN dans le cytoplasme. Par la suite, l'ARN est transcrit inversement en ADN double-brin qui s'intègre dans le génome cellulaire lors de la division cellulaire. Le gène porté par un vecteur lentiviral est capable de pénétrer le noyau cellulaire et de s'intégrer dans le génome sans que la cellule ne se divise (80, 97). Cependant, le vecteur lentiviral est plus laborieux à produire par transfection transitoire ou avec des lignées cellulaires inductibles (98), tandis que le vecteur gammarétroviral a l'avantage de pouvoir être produit avec des lignées cellulaires d'encapsulation stables (99, 100).

Les interactions entre le vecteur viral et le récepteur cellulaire peuvent être augmentées par le pseudotypage, qui est un processus par lequel des glycoprotéines hétérologues de l'enveloppe virale sont incorporées à la surface du rétrovirus pour modifier son tropisme vers la cellule et augmenter son pouvoir infectieux.

Même si le pseudotypage peut augmenter l'efficacité de la transduction, l'adsorption initiale de la particule virale à la membrane cellulaire dépend du rapprochement entre le récepteur cellulaire et l'enveloppe virale. Toutefois, cette étape est restreinte par la répulsion causée par les charges négatives présentes à la surface des deux membranes respectives (97, 101). Pour cette raison, des facilitateurs de transduction sont normalement utilisés pour réduire ces forces de répulsion. Différentes molécules, comme des polymères polycationiques (polybrène et diethylaminoethyl (DEAE)-dextran, des protéines recombinantes (rétronectine), des peptides (protamine and vectofusin-1) et des peptides qui vont former des nanofibrilles (EF-C), permettent la neutralisation des charges négatives de la particule virale, ce qui favorise son adsorption sur la membrane cellulaire chargée négativement. De cette façon, la fusion de la particule virale à la membrane de la cellule cible ainsi que son pouvoir infectieux sont augmentés (97).

Toutefois, un inconvénient possible des vecteurs rétroviraux est leur capacité d'intégration aléatoire dans le génome qui peut provoquer de la mutagénèse insertionnelle (102, 103). Un petit nombre de patients ont développé une leucémie lors d'essais cliniques où des vecteurs rétroviraux ont été utilisés pour modifier des cellules souches hématopoïétiques. Bien que le mécanisme exact

qui a déclenché la leucémie dans ces cas n'a pas été complètement élucidé, il est reconnu que, en plus des mutations somatiques, des promoteurs viraux ont participé au déclenchement de la maladie en régulant à la hausse des proto-oncogènes se trouvant à proximité (104, 105). Le risque d'activation des oncogènes pourrait être réduit par l'utilisation de vecteurs viraux ne contenant pas leurs promoteurs et leurs séquences activatrices. De tels vecteurs rétroviraux auto-inactivés (SIN) (acronyme de la terminologie anglaise pour *self-inactivated*) contenant un transgène contrôlé par un promoteur physiologique interne ont donc été générés (106, 107). Une intégration stable du gène *COL7A1* dans le génome de kératinocytes et de fibroblastes EBDR, transduits à l'aide d'un vecteur SIN, utilisés pour produire des peaux reconstruites a été observée suite à la greffe de ces peaux sur des souris (44). Une autre étude a démontré l'efficacité des vecteurs SIN à transduire le gène *COL7A1* dans des fibroblastes qui ont ensuite été injectés dans la portion dermique de peaux reconstruites à partir de cellules de patient EBDR transplantées chez la souris (108).

En raison des séquences répétitives contenues dans l'ADN complémentaire du gène *COL7A1* et de sa grande taille, le réarrangement génétique peut se produire dans des vecteurs rétroviraux pendant la transcription inverse. Pour surmonter ce problème, Murauer et ses collaborateurs ont conçu un transcrit d'ARN trans-épissé plus court que le transcrit normal du *COL7A1*. Cette stratégie fut un succès et la forme correcte du collagène de type VII a été produite par les kératinocytes EBDR exprimant cet ARN. Comme prévu, une localisation normale du collagène de type VII à la jonction dermo-épidermique, ainsi que la formation normale des fibrilles d'ancrage a été observée dans un modèle de peau reconstruite *in vitro* (40). Le groupe a utilisé récemment une stratégie non virale pour délivrer dans la peau murine, à l'aide d'un pistolet, un plasmide qui exprimera l'ARN qui pourra être épissé en trans. Toutefois, même si la technique a permis de restaurer le collagène de type VII, son niveau d'expression est demeuré faible (109).

Dans la plupart des pays industrialisés, la réglementation exige que, pour une utilisation clinique, les produits à base de cellules cultivées ou ayant subi des manipulations géniques soient manufacturés selon les bonnes pratiques de fabrication (BPF) (27). En vertu de ces exigences, le contrôle des étapes critiques du processus de production est très important pour assurer la qualité du produit et donc sa sécurité et son efficacité chez le patient. Ainsi, la construction et la production de vecteurs viraux doivent de préférence être effectuées à partir de lignées cellulaires d'encapsidation stables (27). Les vecteurs doivent être caractérisés pour leur sécurité biologique, comme par exemple, la capacité de réplication, l'intégration du vecteur, la biodistribution, l'élimination et

l'immunogénicité. Le potentiel de formation de tumeur ou le risque de formation ectopique de tissus est également à déterminer (110).

Certaines études ont démontré la faisabilité de caractériser des clones dérivés d'une seule cellule souche transduite (40, 111, 112). Basé sur l'hypothèse que la population cellulaire obtenue est homogène, ce genre de stratégie clonale permet aux chercheurs d'effectuer différents tests avant de transplanter les cellules chez le patient, par exemple, la détermination du caryotype, les essais de tumorigénicité, et des vérifications pour les intégrations provirales et les réarrangements potentiels. Chaque analyse confère un niveau supplémentaire de sécurité (112). Leurs résultats ont démontré que les kératinocytes souches transduits isolés ainsi que les cellules dérivées n'ont pas développé de signes de carcinogenèse, comme la translocation chromosomique et la durée de vie indéfinie. De plus, ils n'ont pas démontré de pouvoir tumorigène lors d'essais chez des souris athymiques immunodéficientes (112).

1.3.3.2 L'édition génique : l'édition ou la correction des séquences génomiques mutées

L'édition génique est la correction des séquences mutées directement dans le gène par des nucléases modifiées. Les nucléases modifiées pour cibler des sites génomiques spécifiques peuvent activer le mécanisme de réparation de l'ADN cellulaire par clivage du gène d'intérêt (113, 114).

Plusieurs stratégies d'édition du génome ont été développées, y compris celles utilisant des méganucléases (115, 116), des nucléases à doigts de zinc (ZFN, acronyme de la terminologie anglaise *zinc-finger nuclease*) (117), des nucléases effectrices de type activateur de transcription (TALENs, acronyme de la terminologie anglaise pour *transcription activator-like effector nucleases*) (118), et la nucléase Cas9 associée aux courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées (CRISPR, acronyme de la terminologie anglaise pour *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) (17, 60, 113, 119-121).

L'efficacité de la technologie TALEN pour corriger le gène *COL7A1* a été évaluée dans une étude réalisée par Osborn et ses collaborateurs. La correction du gène *COL7A1* de fibroblastes EBDR par la technologie TALEN a été combinée à leur reprogrammation en iPSCs. Les iPSCs ont été injectés dans un modèle *in vivo* de tératome et du collagène de type VII a été localisé au niveau

de structures typiques de la jonction dermo-épidermique. Ces résultats sont une preuve de la faisabilité de thérapies individualisées combinant les technologies TALEN et iPSC (118). De plus, la technologie TALEN a été associée au concept de sélection clonale pour produire des peaux reconstruites à partir de clones produisant le collagène de type VII (122).

Une autre étude a démontré la faisabilité d'utiliser les technologies TALEN ou CRISPR pour éliminer le gène défectueux sur un des allèles du génome de fibroblastes de patients portant la version dominante de l'EB dystrophique. Les cellules ont ensuite été utilisées pour générer des iPSCs qui ont été reprogrammés en fibroblastes et en kératinocytes exprimant le collagène de type VII à partir de l'allèle non défectueux (123).

Bien que les approches ZFN, TALEN et CRISPR sont prometteuses, la prudence est de mise dans leur application à cause du risque d'effets hors-cibles (87, 124, 125).

Tableau 1.3 : Les thérapies en développement pour le traitement de l'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive *

Thérapie	Approche	État de la recherche	Commentaires
Remplacement de protéines	Protéine recombinante	Études précliniques : - modèle murin (48, 54-56)	Correction non permanente du déficit en collagène de type VII. Formation des fibrilles d'ancrage dans la jonction dermo-épidermique.
	Fibroblastes allogéniques	Études précliniques : - modèle murin (64) Études cliniques (63, 67, 68)	Correction non permanente du déficit en collagène de type VII. Amélioration de l'état clinique des patients indépendamment de la production du collagène de type VII.
Cellulaire	Cellules mésenchymateuses	Étude clinique (69, 70) NCT02579369**a NCT02323789**b	Correction non permanente du déficit en collagène de type VII. Amélioration de l'état clinique des patients indépendamment de la production du collagène de type VII.
	Cellules souches hématopoïétiques	Études cliniques (71, 72) NCT01033552**c	Stratégie prometteuse pour une correction à long-terme, mais des risques associés au processus doivent être réduits.
	Cellules révertantes autologues	Étude préclinique : - modèle murin (74)	Kératinocytes révertants utilisés pour générer des iPCSs.
	Cellules souches pluripotentes induites (iPCS)	Études précliniques : - modèle murin (75, 76, 118, 126)	Les résultats obtenus favoriseront la translation vers les essais cliniques.

Thérapie	Approche	État de la recherche	Commentaires
Génique	Introduction d'une copie saine du gène dans le génome	<u>Étude in vitro</u> (93) <u>Études précliniques</u> : - modèle murin (39, 44, 92, 94, 96, 108, 111, 112) - modèle canin (95) <u>Études cliniques</u> NCT02810951**d NCT01263379**e NCT02493816**f	Correction à long-terme du déficit en collagène de type VII. Les études cliniques en cours fourniront des renseignements qui répondront à de nombreuses questions sur la sécurité des vecteurs viraux, sur la réponse immunitaire contre le collagène de type VII et sur l'efficacité des traitements.
	Modification de l'ARN défectueux par trans-épissage	<u>Études précliniques</u> : - modèle murin (40, 109)	Correction à long-terme du déficit du collagène de type VII. Les résultats obtenus sur le potentiel de l'approche favoriseront la translation vers des essais cliniques.
	Correction du gène par l'édition du génome	<u>Étude in vitro</u> : (118) <u>Étude préclinique</u> : - modèle murin (122)	TALEN. Approche intéressante pour la correction à long-terme du déficit du collagène de type VII. À suivre, les nouveaux développements avec cette technologie prometteuse.

*Les thérapies pharmacologiques ne sont pas considérées dans ce tableau.

**Numéro d'identifiant sur le site ClinicalTrials.gov (53) :

- NCT02579369 – *A Phase 1 Clinical Study to Evaluate the Safety of ALLO-ASC-DFU in the Subjects With Dystrophic Epidermolysis Bullosa*. Étude clinique de phase I visant à évaluer la sécurité de l'ALLO-ASC-DFU, des cellules souches mésenchymateuses provenant du tissu adipeux, pour traiter des patients avec l'épidermolyse bulleuse dystrophique.
- NCT02323789 – *A Phase I/II Study Evaluating Allogeneic Mesenchymal Stromal Cells in Adults With Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa*. Étude de phase I/II visant à évaluer l'effet des cellules mésenchymateuses stromales allogéniques pour traiter des adultes avec l'EBDR.
- NCT01033552 – *Biochemical Correction of Severe Epidermolysis Bullosa by Allogeneic Stem Cell Transplantation*. Correction biochimique de l'EB sévère par la transplantation de cellules souches. Phase II.
- NCT02810951 – *A Phase I/II Study of FCX-007 (Genetically-Modified Autologous Human Dermal Fibroblasts) for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa (RDEB)*. Étude de phase I/II sur l'utilisation des FCX-007 (fibroblastes dermiques humains autologues modifiés) pour traiter l'EBDR.
- NCT01263379 – *A Phase 1/2A Single Center Trial of Gene Transfer for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa (RDEB) Using the Drug LZRSE-COL7A1 Engineered Autologous Epidermal Sheets (LEAES)*. Étude monocentrique de phase I/II : transfert du collagène de type VII dans des feuillets épidermiques autologues reconstruits pour traiter l'EBDR en utilisant la drogue LZRSE-COL7A1.
- NCT02493816 – *Phase I Study of Lentiviral-mediated COL7A1 Gene-modified Autologous Fibroblasts in Adults With Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa*. Étude de phase I : intégration du gène COL7A1 par lentivirus dans des fibroblastes autologues pour traiter l'EBDR chez l'adulte.

Dans un concept de médecine personnalisée, tous les efforts consacrés à la recherche de différentes stratégies et technologies sont importants, car certaines techniques pourraient être combinées pour fournir le traitement optimal pour chaque patient EBDR.

1.4 Le génie tissulaire pour la formation des peaux reconstruites

Le but du génie tissulaire est de recréer un tissu présentant des caractéristiques qui permettent la réparation d'un tissu endommagé tout en conservant ses propriétés physiologiques, mécaniques et structurales.

Dans le cas de la peau, la régénération à long terme de l'épiderme est possible grâce à la présence de cellules souches épithéliales qui peuvent être identifiées à l'aide du marquage de la kératine 19 (9). Ces cellules ont les caractéristiques nécessaires pour maintenir la capacité d'auto-renouvellement de la peau, ainsi que son aptitude à se différencier, et ont la capacité de guérir les plaies. Pour que les peaux reconstruites conservent à long terme ces propriétés fondamentales après la greffe, une attention particulière doit être apportée aux conditions de culture afin que celles-ci favorisent la conservation des cellules souches. Ces propriétés ont été démontrées chez certains modèles de peau reconstruite bilamellaire (127-129), dont le modèle par auto-assemblage développé au sein de notre laboratoire (9).

Dans les cultures monocouches, le comportement clonogénique d'un kératinocyte donné indique son état de différenciation. Ainsi, à partir de critères morphologiques combinés aux propriétés de prolifération, les colonies de kératinocytes peuvent être divisées en trois types : les holoclones, les méroclones et les paraclones (130) (Figure 1.4). À cause de leur forte capacité proliférative en culture, les kératinocytes souches forment des holoclones. Ces colonies se caractérisent par leur grande taille et sont composées principalement de petits kératinocytes homogènes (131). Le méroclone est caractéristique de la majorité de la population de cellules amplificatrices transitoires, où les cellules prolifèrent avec un nombre limité de divisions (132). Ces clones se caractérisent par la présence des kératinocytes à différents stades de différenciation et ils sont considérés comme une étape intermédiaire entre les holoclones et les paraclones (131). Les paraclones sont de petites colonies issues de cellules amplificatrices transitoires qui se sont déjà divisées plusieurs fois. Ils se caractérisent par leur petite taille et sont constitués de grandes cellules différenciées (131, 132). La culture sur plusieurs passages provoque la conversion des holoclones en méroclones, puis en paraclones (132). Ce processus, appelé conversion clonale, est normalement irréversible (130, 132). Le stress, des conditions non optimales de culture, l'augmentation du nombre de passages et l'âge du donneur sont des facteurs qui augmentent le taux de conversion clonale (132). Bien entendu,

pour la reconstruction des peaux *ex vivo*, les conditions de culture doivent limiter le processus de conversion clonale.

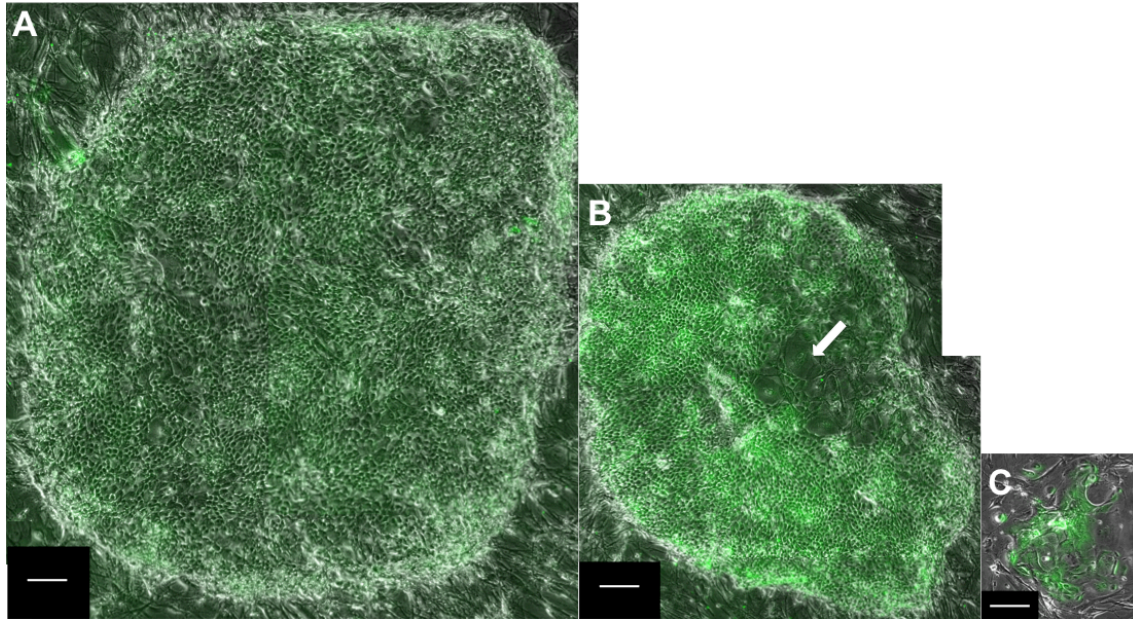


Figure 1.4. Morphologie caractéristique des colonies formées par les kératinocytes selon leur état de différenciation : holoclone (A), méroclone (B) et paraclone (C). Notez que le méroclone contient davantage de grandes cellules (flèche) comparativement à l'holoclone formé principalement de petites cellules. Échelle : barre = 200 μ m.

Les peaux reconstruites peuvent être produites à partir d'une variété de méthodes basées sur l'utilisation de matières biologiques, de matériaux synthétiques ou de matrice extracellulaire exogène (77, 127, 133-138). L'utilisation des cellules autologues, qui ne sont pas immunogènes, est préférable pour la fabrication des peaux reconstruites à des fins cliniques afin d'éviter le rejet, qui surviendrait avec des cellules allogéniques, suite à leur transplantation sur le patient. L'approche du génie tissulaire par la méthode d'auto-assemblage permet la production des peaux reconstruites à partir de fibroblastes et de kératinocytes autologues sans avoir besoin d'un support au préalable pour y ensemer les cellules (131, 139-141). Avec cette approche, les fibroblastes produisent les composants du tissu conjonctif qui forment le derme (Figure 1.5.A). Les cellules épithéliales reproduisent les couches typiques de l'épiderme (basale, épineuse, granuleuse, cornée) et les kératinocytes basaux sont reliés au derme reconstruit par une membrane basilaire (Figure 1.5.B,C). Dans un modèle de peau reconstruite, il est important d'avoir une membrane basilaire bien structurée

afin de favoriser la réapparition du microenvironnement, ou la niche, qui est essentiel pour la conservation des cellules souches épithéliales (9). La niche est constituée d'interactions entre les cellules souches, les cellules voisines (du même type (kératinocytes) et d'autres types, comme les fibroblastes), des facteurs de croissance, des molécules de signalisation et de la matrice extracellulaire (9). Ainsi, en préservant l'homéostasie du tissu nouvellement formé, la méthode de reconstruction de la peau par auto-assemblage devient un avantage lors de l'utilisation du génie tissulaire.

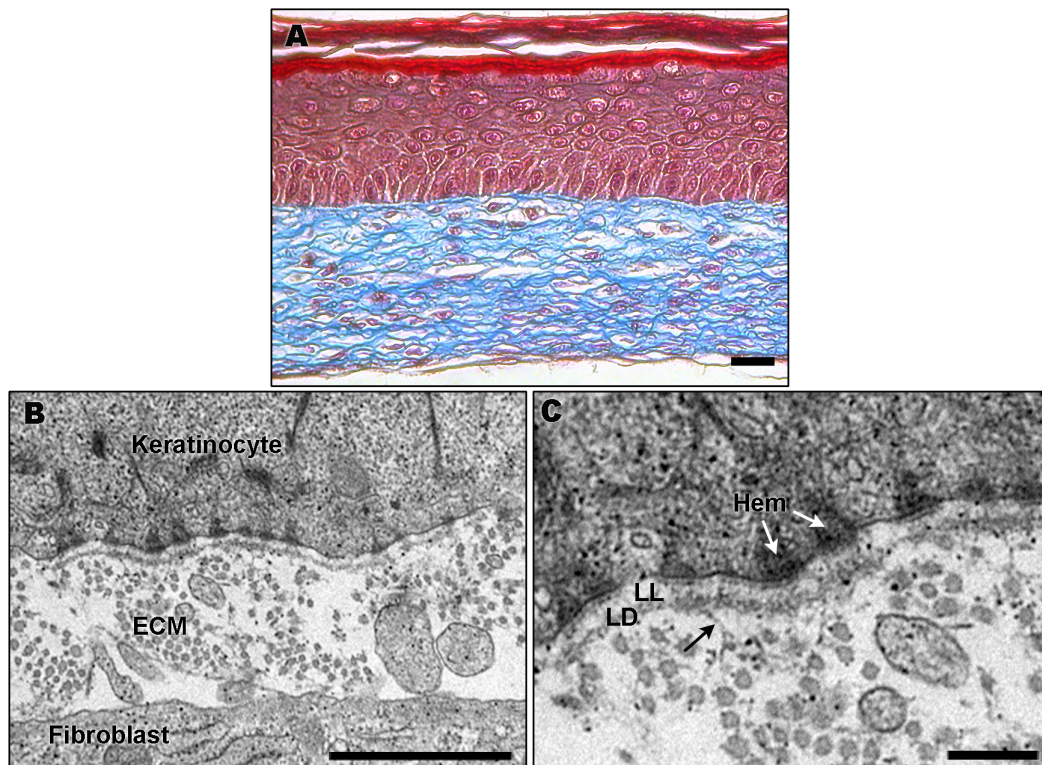


Figure 1.5. Peau reconstruite produite par génie tissulaire selon l'approche d'auto-assemblage. (A) Coupe histologique colorée par trichrome de Masson. (B-C) Observation par microscopie électronique à transmission. À noter que la peau reconstruite présente des caractéristiques histologiques typiques de la peau humaine normale, telles qu'un épithélium stratifié kératinisé reposant sur une composante dermique formée de fibres de collagène denses de couleur bleu (A). Notez la présence d'une membrane basilaire avec une lamina lucida, une lamina densa et de nombreux hémidesmosomes entre l'épiderme et le derme reconstruits (C). Le collagène de type VII, le principal composant des fibrilles d'ancrage, interagit avec la laminine 332, un composant de la lamina lucida et le collagène de type IV, un composant de la lamina densa. Les flèches noires indiquent une structure similaire aux fibrilles d'ancrage telles que celles formées par le collagène de type VII. ECM: matrice extracellulaire, HEM : hémidesmosome, LD : lamina densa, LL : lamina lucida. Échelle : barres = A, 100 μ m; B, 1 μ m; C, 0,2 μ m. Adaptation de la figure 2 du livre : *Epidermolysis Bullosa (EB): Prevalence, Clinical Manifestations and Management, Strategies integrating gene therapy and tissue engineering into the development of treatments for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa*, 77-114, copyright 2016. Placeski, AD.; Larouche, D.; Bisson, F.; Ghani, K.; Caruso, M.; Germain, L. Avec la permission de Nova Science Publishers, Inc.

1.5 La thérapie génique combinée au génie tissulaire pour traiter l'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive

La thérapie génique évolue vers de nouveaux développements où les cellules souches et le génie tissulaire ouvrent la voie à de nouvelles stratégies novatrices et prometteuses pour le traitement de l'EBDR.

Lorsque la thérapie génique est combinée au génie tissulaire, l'objectif est d'offrir un traitement local mais permanent par une greffe de peau. Par conséquent, l'auto-renouvellement du tissu reconstruit corrigé pour l'EBDR, dans lequel les cellules expriment le collagène de type VII fonctionnel, est une condition *sine qua non* pour avoir les effets à long terme de la thérapie génique. Par conséquent, une attention particulière doit être portée à la procédure de transfert de gène afin de transduire les cellules souches. Pour cela, les facteurs les plus importants à considérer sont la conception du vecteur et la méthode utilisée pour la transduction des cellules (142). Le procédé de transfert de gène dans les cellules peut être stressant et accélérer le processus de différenciation, ce qui conduit à la conversion clonale (132). Par conséquent, le processus de transduction doit être le moins agressif possible afin d'éviter la différenciation prématurée des cellules souches. Un moyen pour détecter si les kératinocytes qui ont intégré un transgène sont des cellules souches est de vérifier leur capacité à former des holoclones (9, 27, 130) avant de les utiliser pour la thérapie génique.

Pour toutes les méthodes de génie tissulaire à base de cellules vivantes, il est possible de transférer des gènes dans des cellules *in vitro* avant leur utilisation dans les tissus reconstruits. Cette approche confère un avantage au point de vue de la sécurité et de l'efficacité du transfert de gène, car il est possible d'évaluer l'intégration des gènes dans les cellules souches, par exemple, par la technique d'hybridation *in situ* par fluorescence. L'intégrité des tissus reconstruits produits peut également être vérifiée avant leur transplantation sur le patient par des analyses histologiques ainsi que la détection de marqueurs de différenciation de la peau par immunofluorescence.

Pour traiter l'EBDR avec des tissus reconstruits, des kératinocytes dérivés d'un holoclone individuel, où le gène *COL7A1* a été transféré avec succès, peuvent être utilisés pour ensemercer les tissus (111, 112). Bien qu'il se soit avéré difficile d'obtenir des kératinocytes clonogéniques ou formant des holoclones à partir d'échantillons de peau prélevés chez les patients atteints d'EB

jonctionnelle (143), des kératinocytes de patients EBDR ont été cultivés (44, 112). Il a été démontré que les kératinocytes souches de patients EBDR ont un profil similaire à celui des kératinocytes souches de sujets normaux en ce qui concerne leur propriété d'expansion en culture et leur capacité à former des clones (112). Dans cette étude, il a été démontré que seulement quelques cellules EBDR répondaient aux critères de cellule souche et de sécurité après l'intégration du gène. Ainsi, des différences d'expression du collagène de type VII dans les cellules souches transduites provenant du même patient pour différents clones ont été observées (112). Étant donné que la régénération de l'épiderme est assurée par des cellules souches provenant de différents réservoirs (renflement du poil, épiderme, glande, etc.) (144) des études complémentaires doivent être effectuées pour déterminer si un épithélium formé à partir d'un clone unique est capable de maintenir l'homéostasie de la peau.

1.6 Quelles cellules utiliser pour traiter l'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive à l'aide de la thérapie génique et du génie tissulaire

Quelle est la meilleure approche en thérapie génique pour le traitement de l'EBDR : l'utilisation des kératinocytes ou des fibroblastes? En fait, les deux types cellulaires ont des avantages et des inconvénients.

La culture des kératinocytes de la peau est plus exigeante que celle des fibroblastes. Par exemple, elle nécessite l'ajout de plusieurs additifs et l'utilisation de couches nourricières pour conserver les cellules souches (145). De plus, ce type cellulaire est considéré difficile à transduire par des vecteurs viraux relativement à d'autres types cellulaires comme les fibroblastes. Cependant, les kératinocytes EBDR autologues produisent toutes les protéines liées à la jonction dermo-épidermique, ils sont donc un bon choix pour la modification génétique (90).

En ce qui concerne le traitement des patients, deux façons principales de greffer les kératinocytes peuvent être utilisées: la pulvérisation des cellules ou la transplantation de substituts cutanés produits *in vitro* par génie tissulaire, tels que les feuillets d'épiderme cultivé autologues ou des peaux reconstruites bilamellaires avec une composante dermique et épidermique. La pulvérisation de kératinocytes fraîchement isolés en suspension sur des plaies causées par des

brûlures de deuxième degré a démontré certains effets bénéfiques sur la guérison (146, 147). Toutefois, le nombre et taux de survie des cellules souches dans ces conditions reste à déterminer. Le principal avantage des feuillets d'épiderme cultivé autologues est la possibilité de produire, dans un court laps de temps, des centaines de centimètres carrés de tissu épidermique. Une étude a montré que les cellules souches survivent dans les feuillets d'épiderme cultivé autologues, car l'expression stable d'un transgène inséré dans ceux-ci a été observée à long terme après l'implantation sur des patients (143). Puisque les feuillets d'épiderme cultivé autologues sont appliqués localement et en surface, la biodistribution des cellules souches est facile à contrôler. D'ailleurs, les feuillets d'épiderme cultivé autologues sont utilisés pour traiter des patients brûlés depuis plus de 30 ans, et la formation de tissu ectopique dans d'autres organes n'a jamais été rapportée. Bien que l'utilisation des feuillets d'épiderme cultivé autologues soit bien établie parmi les stratégies de soins standard des grands brûlés, ces greffons sont fragiles. Ils ne comprennent que l'épiderme, le derme et la membrane basale sont absents et doivent donc se reformer après la greffe. Ainsi, les feuillets d'épiderme sont minces et n'ont pas les propriétés mécaniques conférées par le derme. Pour pallier à cet inconvénient, l'autre option consiste à produire de la peau reconstruite bilamellaire formée d'une composante dermique en plus d'un épiderme.

Étant donné que les fibroblastes produisent du collagène de type VII, ils sont également ciblés pour une utilisation en thérapie génique pour l'EBDR. Les protocoles de transduction de gène dans ce type cellulaire sont bien établis. Combinés au génie tissulaire, les fibroblastes génétiquement modifiés peuvent être inclus dans la composante dermique de la peau reconstruite bilamellaire. En comparaison avec l'injection de cellules sous l'épiderme, les peaux reconstruites bilamellaires offrent la possibilité de vérifier la correction de la pathologie et l'intégrité architecturale du tissu avant sa greffe sur le patient. Toutefois, l'expression du collagène de type VII à long terme dans les fibroblastes des peaux reconstruites greffées reste à déterminer.

Titeux et ses collaborateurs ont transduit des fibroblastes et des kératinocytes EBDR en utilisant des vecteurs rétroviraux SIN. Ils ont montré, dans un modèle de peau humaine reconstruite greffée sur des souris athymiques, que la seule présence des kératinocytes ou des fibroblastes produisant du collagène de type VII fonctionnel au sein des tissus reconstruits est suffisante pour promouvoir l'assemblage des fibrilles d'ancrage et de rétablir l'adhérence dermo-épidermique (44).

D'autres sources de cellules souches, telles que les cellules mésenchymateuses du tissu adipeux ou les cellules du placenta, du cordon ombilical, du sang ombilical ou de la membrane amniotique, pourraient également être utilisées pour générer le collagène de type VII corrigé par thérapie génique et pour ensuite être utilisées pour la reconstruction de la peau par génie tissulaire. La capacité plus limitée à la différenciation des cellules souches post-natales est un avantage, car ceci réduit le risque de formation de tissu ectopique (131).

La reprogrammation de cellules de la peau de patients atteints d'EBDR, corrigées pour exprimer le collagène de type VII avant ou après la génération des iPSCs, qui seraient ensuite différenciées en kératinocytes ou en fibroblastes corrigés, a fait l'objet d'études intéressantes qui proposent différentes stratégies locales ou systémiques pour reconstruire de façon permanente les tissus endommagés des patients atteints d'EBDR (75, 76, 118, 126, 148). Les avantages de cette approche sont le potentiel de prolifération élevé des iPSCs et le fait qu'elles peuvent être générées à partir de différentes sources de cellules autologues (77).

Ainsi, l'utilisation de ces différentes sources de cellules autologues pourrait surmonter la difficulté de la préparation et de la culture de kératinocytes et / ou de fibroblastes primaires qui pourraient exister chez certains des patients EB (143).

Une représentation schématique des stratégies *ex vivo* associant la thérapie génique et le génie tissulaire pour fournir un traitement pour l'EBDR est présentée dans la figure 1.6. La combinaison de différentes stratégies émergeant des progrès technologiques et d'une meilleure connaissance de la maladie EBDR soulève l'espoir de fournir des traitements individualisés adaptés aux différents phénotypes / génotypes présents chez les patients EBDR. Actuellement, des études et des essais cliniques ont démontré que la reconstruction de la peau par génie tissulaire en utilisant des fibroblastes et / ou des kératinocytes génétiquement modifiés est une approche prometteuse pour l'obtention d'un traitement permanent pour corriger les effets délétères associés à la déficience du collagène de type VII dans la peau des patients EBDR.

Progrès de la thérapie génique combinée au génie tissulaire ex vivo pour traiter l'EBDR

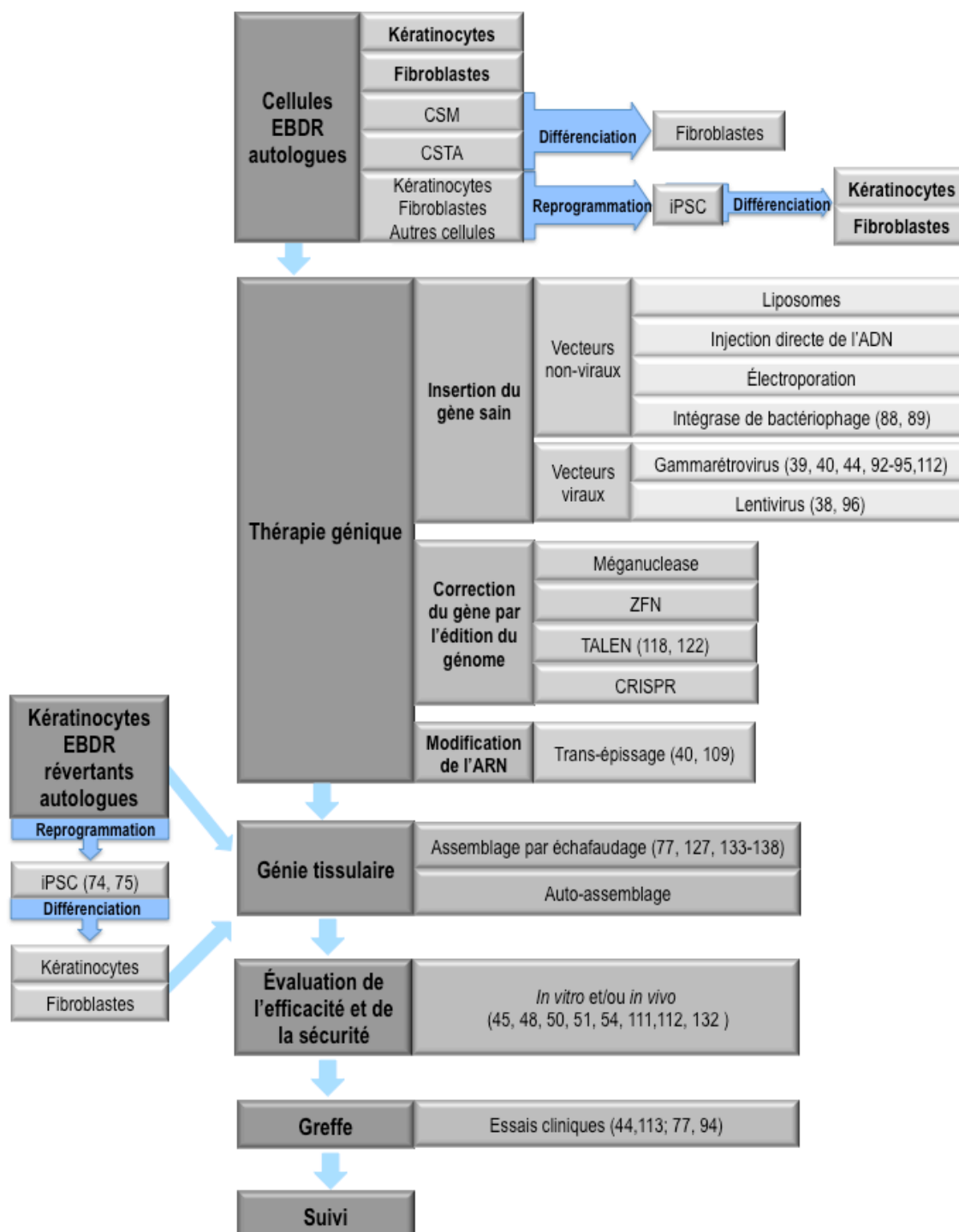


Figure 1.6. Représentation schématique des stratégies ex vivo associant la thérapie génique et le génie tissulaire pour fournir un traitement pour l'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive (EBDR). Les cellules autologues EBDR sont préférées aux cellules allogéniques. Si les cellules souches mésenchymateuses (CSM) et les cellules souches dérivées du tissu adipeux (CSTA) sont utilisées, elles

peuvent être différenciées en fibroblastes. Des cellules dérivées de sources autres que les fibroblastes ou les kératinocytes souches pourraient également être reprogrammées en cellules souches pluripotentes induites (iPSC), avant ou après l'édition ou le remplacement du gène, et ensuite être différenciées en kératinocytes ou fibroblastes. Les cellules révertantes pourraient être directement utilisées pour reconstruire des peaux reconstruites ou être reprogrammées en iPSC pour augmenter la quantité de cellules. Une fois que la source de cellules a été sélectionnée, les différentes technologies de thérapie génique sont disponibles pour introduire le gène sain ou pour corriger le gène mutant. L'étape suivante consiste à produire la peau reconstruite en utilisant des méthodes de culture et de génie tissulaire appropriées afin de conserver les cellules souches transduites, de s'assurer de l'intégration sécuritaire du gène et de la production du collagène de type VII et de sa localisation à la jonction dermo-épidermique. La greffe de la peau reconstruite fonctionnelle chez l'homme pourrait se faire après avoir démontré la conformité aux exigences de sécurité et d'efficacité. Le suivi des patients sera important pour évaluer l'efficacité à long terme de la stratégie choisie. Adaptation de la figure 3 du livre : Epidermolysis Bullosa (EB): Prevalence, Clinical Manifestations and Management, Strategies integrating gene therapy and tissue engineering into the development of treatments for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa, 77-114, copyright 2016. Piaciski, AD.; Larouche, D.; Bisson, F.; Ghani, K.; Caruso, M.; Germain, L. Avec la permission de Nova Science Publishers, Inc. CRISPR : Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées ; TALEN : Nucléases effectrices de type activateur de transcription ; ZFN : Nucléase à doigts de zinc.

1.7 Les essais cliniques associant la thérapie génique *ex vivo* au génie tissulaire

Mavilio et ses collaborateurs italiens ont effectué le premier essai clinique utilisant des kératinocytes cultivés provenant d'un patient atteint d'une EB jonctionnelle causée par une déficience en laminine 332. Les kératinocytes ont été transduits avec un vecteur gammarétroviral portant le gène *LAMB3* et utilisés pour produire des feuillets d'épiderme cultivé autologues. De la laminine 332 a été observée au niveau des sites où les feuillets d'épiderme cultivé autologues ont été greffés avec succès (143). L'épiderme régénéré était pleinement fonctionnel après la transplantation et aucune perte de l'épithélium n'a été rapportée après huit ans, démontrant ainsi la durabilité de la greffe et l'intégration permanente de cellules souches génétiquement modifiées (27, 149). Cette étude a démontré la possibilité, l'efficacité et la sécurité de l'utilisation du génie tissulaire conjointement avec la thérapie génique et a ouvert de nouvelles perspectives pour le développement d'un traitement pour l'EBDR (27). En 2014, ce protocole a été appliqué par le même groupe pour traiter un autre patient atteint d'EB jonctionnelle (47).

À l'heure actuelle, deux essais cliniques combinant la thérapie génique et le génie tissulaire pour traiter les patients atteints d'EBDR sont en cours (Tableau 1.2). Le premier est un essai de phase I (identificateur NCT01263379) (53) entrepris aux États-Unis où des feuillets d'épiderme

cultivé autologues produits avec des kératinocytes EBDR dans lesquels la forme correcte du gène *COL7A1* a été insérée avec des vecteurs rétroviraux classiques (77, 94), sont greffés sur les lésions des patients. Une autre étude est en cours en Europe. Elle utilise un modèle de peau reconstruite contenant des fibroblastes et des kératinocytes EBDR dont le gène défectueux a été corrigé par un vecteur rétroviral SIN (44, 113).

Ces études fourniront des réponses à certaines des nombreuses questions qui demeurent quant à la sécurité des vecteurs viraux, au risque d'avoir une réponse immunitaire contre le collagène de type VII nouvellement introduit, et à l'efficacité des différents traitements proposés. Toutefois, la poursuite du développement de nouvelles stratégies pour le traitement de l'EBDR utilisant des protocoles de transduction du gène *COL7A1* plus efficaces, des vecteurs viraux plus sécuritaires et des substituts cutanés (e.g. peaux reconstruites bilamellaires (derme et épiderme)) plus performants est nécessaire afin d'offrir les meilleurs traitements aux patients atteints de cette maladie.

1.8 Hypothèse et objectifs

L'hypothèse de ce travail de recherche est que l'intégration du gène *COL7A1* fonctionnel codant pour le collagène de type VII dans les fibroblastes et les kératinocytes de patients atteints d'EBDR, leur culture puis leur utilisation pour produire des peaux reconstruites *in vitro* restaurera les déficits d'adhésion de la jonction dermo-épidermique des patients greffés. Toutefois, la première étape dans le développement d'un tel traitement est la mise au point des conditions de culture optimales pour le transfert du gène *COL7A1* dans les fibroblastes et les kératinocytes. Ainsi, l'objectif principal de cette étude était de mettre au point une méthode efficace pour transduire le gène *COL7A1* dans des fibroblastes et des kératinocytes normaux et d'évaluer la capacité du collagène de type VII nouvellement produit à former des fibrilles d'ancrage au niveau de la jonction dermo-épidermique des peaux reconstruites par la méthode d'auto-assemblage.

Le premier objectif spécifique de cette étude était d'optimiser la méthode de transduction des fibroblastes et des kératinocytes afin que le transfert de gène puisse se faire avec une faible MOI (multiplicité d'infection, acronyme de la terminologie anglaise pour *multiplicity of infection*). En effet,

l'utilisation de MOI élevée est associée à un risque d'insertion multiple du gène à différents endroits, que nous cherchons à éviter. Pour y arriver, nous avons d'abord testé quatre pseudoparticules virales, ainsi que deux facilitateurs de transduction, pour insérer le gène de la GFP dans des fibroblastes et des kératinocytes normaux en culture. Les vecteurs utilisés ont été produits par une lignée cellulaire d'encapsidation de rétrovirus. Puis, la capacité des kératinocytes à former des holoclones après la transduction a été évaluée afin de s'assurer que la méthode permettait de transduire les cellules souches épithéliales.

Le deuxième objectif spécifique était de transférer le gène *COL7A1* portant une étiquette HA, permettant de le différencier du collagène endogène, dans des fibroblastes et des kératinocytes normaux et de vérifier si le collagène de type VII nouvellement produit était en mesure de s'intégrer dans la jonction dermo-épidermique. Pour ce faire, les conditions optimisées à l'objectif 1 ont été utilisées pour transduire les fibroblastes et les kératinocytes. Puis, des peaux ont été reconstruites par la méthode d'auto-assemblage à partir des cellules transduites. Des analyses histologiques ainsi que la détection de marqueurs de différenciation de la peau par immunofluorescence ont été effectuées pour évaluer la qualité des tissus reconstruits. Finalement, l'intégration de la protéine nouvellement formée au niveau de la jonction dermo-épidermique a été évaluée par l'immunodétection de l'étiquette HA.

Chapitre 2 : Une peau reconstruite avec des kératinocytes et des fibroblastes génétiquement modifiés pour le traitement de l'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive

2.1 Résumé

L'épidermolyse bulleuse dystrophique récessive (EBDR) est une maladie génétique rare causée par des mutations du gène *COL7A1*, codant pour le collagène de type VII (COLVII) et qui est sécrétée par les kératinocytes et les fibroblastes cutanés. L'absence du COLVII empêche la formation des fibrilles d'ancrage à la jonction dermo-épidermique. Nous proposons de traiter les patients EBDR avec des greffes de peau reconstruites par le génie tissulaire formées à partir des fibroblastes et des kératinocytes génétiquement corrigées par thérapie génique. D'abord, l'efficacité du transfert de l'ADNc normal du gène *COL7A1* des vecteurs rétroviraux pseudotypés avec Ampho, Baev, Galv, et RD114 a été testée. Le vecteur Ampho était le meilleur pour transduire les fibroblastes. De plus, les facilitateurs de transduction polybrène et le peptide EF-C ont été testés et ce dernier s'est avéré plus efficace. Ainsi, en utilisant le vecteur Ampho et le peptide EF-C, le gène *COL7A1* portant l'étiquette HA a été transduit dans 19% des fibroblastes et 36% des kératinocytes. Dans les peaux reconstruites produites avec ces cellules, nous avons observé un dépôt continu du HA-COLVII à la jonction dermo-épidermique, ainsi que des cellules souches épidermiques transduites. Cette approche est prometteuse pour offrir un traitement aux patients souffrant d'EBDR.

2.2 Manuscrit à être soumis pour publication

A TISSUE-ENGINEERED SKIN WITH GENETICALLY ENGINEERED KERATINOCYTES AND FIBROBLASTS FOR THE TREATMENT OF RECESSIVE DYSTROPHIC EPIDERMOLYSIS BULLOSA

Angela Dakiw Piaceski¹, Danielle Larouche¹, Karim Ghani², Francis Bisson¹, Sergio Cortez Ghio¹, Sebastien Larochelle¹, Véronique Moulin¹, Manuel Caruso² and Lucie Germain¹

¹Centre de Recherche en organogénèse expérimentale de l'Université Laval/LOEX, Québec, Canada

²Centre de Recherche sur le cancer de l'Université Laval, Québec, Canada

^{1,2}Centre de Recherche du CHU de Québec-Université Laval, Québec, Canada

*Address correspondence to:

E-mail: lucie.germain@fmed.ulaval.ca; manuel.caruso@crhdq.ulaval.ca

Short title: Self-assembled skin substitute for the treatment of RDEB

Keywords: epidermolysis bullosa; tissue-engineering; gene therapy; cell therapy; retroviral vector; stem cells, reconstructed skin.

2.2.1 Abstract

Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa (RDEB) is a rare genetic disease caused by mutations in the *COL7A1* gene that encodes type VII collagen (COLVII). This disease is characterized by intense blistering, fragility of the skin and mucous membranes, and many other debilitating symptoms. There is no cure for RDEB, and only palliative treatments are offered to patients. Collagen VII that is normally expressed by epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts forms anchoring fibrils at the dermal-epidermal junction (DEJ). One logical approach that has been proposed to correct the defect is the transfer of a normal *COL7A1* cDNA in keratinocytes. In this study, we are setting-up the base of a strategy for RDEB that includes gene therapy and tissue engineering. We propose to treat RDEB patients with grafts of tissue-engineered skin (TES) that comprise dermal and epidermal layers made with genetically corrected fibroblasts and keratinocytes. First, gene transfer efficacy of different retroviral vectors pseudotyped with the Ampho, Baev, Galv and RD114 envelopes was tested. We found that the Ampho vector was superior for gene delivery into fibroblasts. Most importantly, we report that the EF-C peptide was a much better transduction enhancer than polybrene that is commonly used to facilitate gene transfer. A 3 to 4-fold increase in fibroblasts and at least a 2-fold increase in keratinocytes was obtained. By using these conditions, a 19% gene transfer of a HA-tagged *COL7A1* gene was achieved in fibroblasts and 36% in keratinocytes. In TES made with the transduced cells, we observed a continuous and intense deposit of HA-collagen VII at the DEJ. Furthermore, transduced epidermal stem cells and the characteristics of a skin graft are preserved in this model. This approach is promising to offer a treatment to patients suffering from RDEB.

2.2.2 Introduction

Epidermolysis bullosa (EB) is a genetic disease comprising a heterogeneous group of rare inherited skin disorders in which minor mechanical stress in the skin and mucous membranes causes the formation of blisters and erosions. There are four major types of EB depending on the location of the target proteins and the level of blisters: EB simplex (EBS; epidermolytic), junctional EB (JEB; lucidolytic), dystrophic EB (DEB; dermolytic), and Kindler syndrome (mixed levels of blistering) ^(1, 12). Blister formation occurs beneath the lamina densa within the papillary dermis in the skin of patients with DEB. Mutations in the *COL7A1* gene are responsible for DEB, which can be autosomal dominant or recessive (RDEB) depending on the type of mutations ⁽²¹⁾. The *COL7A1* gene encodes type VII collagen (COLVII) that is naturally secreted into the extracellular space by dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. These collagen molecules then assemble into the anchoring fibrils, a major component of the dermal-epidermal junction (DEJ) responsible for the adhesion between the epidermis and the dermis ⁽⁷⁾. DEB is characterized by abnormalities of anchoring fibrils, which are absent, reduced in number or malformed. Patients with RDEB can display other symptoms than blistering and fragility of the skin and mucous membranes; their hands and feet can be deformed, and they can suffer from anemia, malnutrition and growth retardation. The development of squamous cell carcinoma in areas subjected to intense blistering is a common trait in RDEB patients after their third decade. There is no cure for RDEB, and only palliative treatments restricted to individual wounds are currently offered to patients ⁽¹⁾.

Several experimental strategies for RDEB have been tested in preclinical studies and in patients that include protein therapy, cell therapy (fibroblasts, mesenchymal stromal cells and hematopoietic stem cells), and gene therapy ^(9, 10, 13, 28, 31, 32, 36, 40-42). The latter approach was also used to treat successfully one JEB patient; keratinocytes obtained from the patient own skin were cultured in vitro and transduced with a retroviral vector containing the *LAMB3* gene that encodes a subunit of laminin 332. After expansion of the corrected cells, cultured epidermal sheets were successfully transplanted on the patient's legs. Absence of blistering was observed long-term, suggesting that this strategy could be applied to other EB types, like RDEB ^(10, 28).

Compared to the *LAMB3* cDNA, the large size of the *COL7A1* cDNA (8.9 kb) has limited the generation of high-titer retroviral vectors from stable retrovirus producer cells ^(8, 17, 37). Recombinant

retroviruses can incorporate heterologous envelope glycoproteins at their surface, and this process known as pseudotyping is used to increase viral infectivity and/or modify vector tropism. High-titer retroviral packaging cell lines derived from 293Vec cells have been recently constructed in our laboratory. They release viral particles pseudotyped with the amphotropic (Ampho), the baboon endogenous virus (Baev), the gibbon ape leukemia virus (Galv) and the RD114 envelopes ^(15, 16). In this study, we have investigated the potential of GFP and COL7A1 vectors produced from these new packaging cell lines for the transduction of human keratinocytes and fibroblasts. We have also tested in this setting a 12-amino acid peptide, EF-C, derived from the HIV-1 envelope glycoprotein that was shown to be more potent than the commonly used polycation polybrene for increasing the transduction of fibroblasts and macrophages ^(29, 43).

A bilayered skin substitute with both, a dermis and an epidermis, could significantly improve the outcome of a graft in RDEB patients in term of resistance and mechanical properties. Furthermore, if the COL7A1 gene is introduced in fibroblasts as well as in keratinocytes, COLVII production at the DEJ should be optimal. These skin substitutes can be produced with a variety of methods based on the addition of biomaterials, synthetic materials or exogenous extracellular matrix ^(3, 4, 6, 38). In our laboratory, we have developed a bilayered tissue-engineered skin (TES) produced by the self-assembly approach in which the cells produce and organize their own extracellular matrix ^(24, 33, 34). TES have been successfully used to treat ulcers and burn patients ^(11, 27).

In this study, we have investigated the use of retroviral vectors produced from the 293Vec packaging cell lines for their ability to transduce fibroblasts and keratinocytes in presence of the peptide EF-C. We have also investigated for the first time the potential of transduced cells to produce and organize COLVII at the DEJ of TESs produced by the self-assembly approach of tissue-engineering.

2.2.3 Material and Methods

The study was approved by the institutional animal care and use committee and by the institutional committee for the protection of human subjects. The procedures followed were in accordance with the Helsinki Declaration of 1975.

2.2.3.1 Plasmids

The GFP retroviral plasmid was derived from GFP3 and contained a hygromycin resistance gene (Hygror) followed by an encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry site sequence linked to the GFP gene. Both genes were under the control of the Moloney murine leukemia virus (MoMLV) long terminal repeat sequences (LTR) ⁽³⁵⁾. The *pLZRS-HACOL7A1* retroviral plasmid containing a human influenza hemagglutinin (HA)-tagged full-length human *COL7A1* gene under the control of the MoMLV LTR was kindly provided by Alfred Lane ⁽³⁷⁾.

2.2.3.2 Cell culture

HT-1080 cells, 293T cells, the retrovirus parental packaging cell lines 293Vec-Ampho, 293Vec-Baev, 293Vec-Galv and 293Vec-RD114 ^(15, 16), and their derivatives containing the GFP vector and the *HA-COL7A1* vector were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Wisent, St-Bruno, Canada) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, HyClone, Logan, UT) and 1% penicillin/streptomycin. The retrovirus producer cell lines were generated by infection with VSV-G pseudotyped recombinant retroviruses produced by transient transfection of 293T cells. The 293Vec-Ampho-*HA-COL7A1* cells were 20% positive as assessed by immunofluorescence. Producer cells infected with the GFP virus were subsequently selected in hygromycin at 200 µg/ml, and the retrovirus producer cells were 99% GFP positive as assessed by the fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis.

Human fibroblasts and keratinocytes were obtained from mammary surgery of healthy adult donors after informed consent. Fibroblasts and keratinocytes were isolated by the two-step thermolysin and trypsin method and were cryopreserved as described previously ^(14, 26). Fibroblasts were thawed and cultured at passage 3 to 4 in DMEM containing 10% fetal calf serum and antibiotics. Keratinocytes were thawed and cultured at passage 1 in keratinocyte medium (3:1 mixture of the DMEM and Ham's F12 medium (Invitrogen, Burlington, Canada) supplemented with 5% FCS, insulin, hydrocortisone, isoproterenol (Sandoz Canada Inc.), epidermal growth factor (EGF), and antibiotics. For all experiences, keratinocytes were co-cultured with irradiated human feeder layers (iHFL) as previously described ⁽⁵⁾. At each passage, cell number, and the average cell size were analyzed with a Beckman Coulter. Growth rates were calculated using the following formula ⁽²⁶⁾:

$$\text{Population doubling} = \frac{\log (\text{number of cells obtained}/\text{number of cells seeded})}{\log 2}$$

2.2.3.3 Retroviral infection

GFP viral titers were determined by scoring positive target cells by FACS analysis. Briefly, HT-1080 cells were inoculated at a density of 10^5 cells per well in 24-well plates and cultured in 1 ml of medium overnight. The medium from each well was replaced with 1 ml of serial dilutions of virus supernatants in a 1 ml final volume containing 8 $\mu\text{g/ml}$ polybrene. Forty-eight hours later, cells were trypsinized and analyzed for GFP fluorescence by FACS. For the *HA-COL7A1* vector, HT-1080 cells were infected in 6-well plates and positive cells for HA were measured by immunofluorescence. Vector titers were calculated as follows: $\text{Titer} = \frac{F \times \text{Cinf}}{V} \times D$, where F is the percentage of GFP or HA positive cells, determined by flow cytometry or immunofluorescence; Cinf is the total number of target cells at the time of infection; V is the viral volume applied; and D is the virus dilution factor. Infections resulting in 2-20% of GFP or HA positive cells were considered for titer calculation based on the linear range of the assay. Titers obtained for the 4 pseudotyped GFP viruses were 2×10^7 infectious viral particles (ivp)/ml. The titer for the 293Vec-Ampho-*HA-COL7A1* was 1.8×10^5 ivp/ml.

The infectivity of the 4 GFP pseudotyped retroviruses in presence of polybrene and EF-C (Genscript, Piscataway Township, NJ) was assessed by infecting normal fibroblasts or keratinocytes plated at a density of 13,000 cells/cm² in 12-well plates. Fibroblasts were incubated for two hours and keratinocytes for four hours at 37°C at 8% CO₂. Then, fibroblasts were transduced at a multiplicity of infection (MOI) of 0.3 and keratinocytes at a MOI of 1 in the presence of 8 $\mu\text{g/ml}$ of polybrene or 10 $\mu\text{g/ml}$ of EF-C peptide. Transduction efficiency was evaluated by FACS analysis. The transduction with the *HA-COL7A1* vector was done similarly to the GFP viruses but in T75 cm² flask at a MOI of 0.36. The expression of *HA-COL7A1* was assessed by immunofluorescence.

2.2.3.4 Tissue-engineered skin

The tissue-engineered skin method used here derives from the self-assembled skin substitute method referred to as “SASS-4” in Larouche et al ⁽²³⁾. TES were produced with different combinations of transduced cells at MOI 0.36 and untransduced fibroblasts and keratinocytes. Briefly,

12,000 fibroblasts/cm² at P5 transduced or not were cultured for 26 days in a fibroblast medium supplemented with 50 mg/ml ascorbic acid (Sigma Chemicals) until the production of a tissue sheet. Passage 2 keratinocytes transduced or not were seeded at a density of 200,000 cells/cm² on one of the two sheets and were submerged in the keratinocyte medium supplemented with 50 mg/ml ascorbic acid for four days. Then, keratinocytes/fibroblasts sheets were superimposed over the fibroblast-derived tissue sheet to produce the TES. TES were cultured at the air–liquid interface in keratinocyte medium 50 mg/ml ascorbic acid without EGF for 21 days.

2.2.3.5 Fluorescence-activated cell sorting, immunofluorescence and histological analysis

GFP expression in transduced cultured cells was assessed by FACS analysis. HT-1080 cells, fibroblasts and keratinocytes were trypsinized 72 hrs after infection and analyzed for GFP expression. Fluorescence was measured with a Coulter EPICS XL-MCL flow cytometer and Expo32 software (Beckman Coulter, Brea, CA) or with a FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

HA-COLVII expression in transduced cultured cells and in retrovirus producer cells was assessed by immunofluorescence. HT-1080 cells, 293Vec-Ampho-HA-COL7A1 cells, keratinocytes and fibroblasts were cultured in 6-well plates until they reached sub-confluence. Cells were fixed with methanol, or 4% paraformaldehyde followed by 0.2% Triton X-100. Next, cells were incubated with a primary mouse monoclonal antibody raised against HA (1:500) (clone HA.11; Biolegend, San Diego, CA) followed by an Alexa488-conjugated goat anti-mouse (1:1000) (Invitrogen) and nuclei were colored with Hoechst reagent 33258 (Sigma Chemicals).

For immunodetection in TES, biopsies were embedded in Tissue-Tek OCT Compound (Sakura Finetek, Torrance, CA) and frozen in liquid nitrogen. Immunofluorescence assays for transgene expression and markers were performed on 5-mm thick cryosections permeabilized with cold acetone with the following antibodies: mouse monoclonal anti-HA (clone HA.11), rabbit polyclonal anti-human collagen IV (1:400) (Abcam, Cambridge, MA), mouse monoclonal anti-K10 (1:200) (clone RKSE60; Cedarlane, Canada), rabbit polyclonal anti-K14 (1:1600) (Cedarlane, Canada), mouse anti-human Ki67 (1:800) (BD Biosciences, Canada), rabbit anti-human-loricrin (1:240) (Covance, Dedham, MA) and rabbit anti-human K19 (1:200) (LOEX, Canada). The following

secondary antibodies were used: Alexa-488-conjugated goat anti-mouse and Alexa-594-conjugated goat anti-rabbit.

For histological analysis, biopsies from TES were fixed in Histochoice (Amresco, Solon, OH) and embedded in paraffin. Microtome sections (5-mm-thick) were stained with Haematoxylin and Eosin.

2.2.3.6 Statistical analysis

All analyses were performed in R (v3.3.0; RStudio v0.99.465)⁽⁴⁴⁾. The level of significance for all tests was set at $p < 0.05$. Results were compared in the same experimental plan. Models were fitted using the nlme package⁽⁴⁵⁾. For doubling rate of controls, data was analyzed with one-way linear mixed models with treatment as a fixed factor and cell population as a random factor. Percentage of GFP-positive cells was analyzed with two-way linear mixed models with both pseudotyped vectors and transduction enhancers as fixed factors and cell population as a random factor. Normality of residuals (verified by visual assessment of qq-plots) was achieved by data transformation. Homoscedasticity (verified by visual assessment of fitted data ~ residuals) was accounted for by the addition of appropriate weights when necessary. Once assumptions were met, the best fit as described by the smallest Akaike criterion was selected. When models were significant ($p < 0.05$), Tukey post-hoc tests were performed (multcomp package, version v1.4-0)⁽⁴⁶⁾ and significant pair-wise comparisons ($p < 0.05$) were reported. Statistical power was calculated with the nlmeU package (v0.70-3)⁽⁴⁷⁾.

2.2.4 Results

2.2.4.1 Efficient transduction of human fibroblasts and keratinocytes with vectors produced from 293Vec packaging cell lines in presence of the EF-C peptide

It is admitted that retroviral vectors pseudotyped with the RD114 and Galv envelopes are highly efficient to transduce cells from hematopoietic origins ^(16, 20, 22). In this study, one of our objectives was to discriminate which envelope between Ampho, Baev, Galv and RD114 would be the most efficient for the transduction of human fibroblasts and keratinocytes. In addition to these four different envelopes, we have investigated the potential of the EF-C peptide as a transduction enhancer of fibroblasts and keratinocytes. High-titer recombinant GFP retroviruses produced from the 4 stable packaging cell lines were used to infect fibroblasts at a MOI of 0.3 and keratinocytes at a MOI of 1 in the presence of EF-C or polybrene. Fibroblasts were better transduced with the Ampho vector as compared to the 3 other pseudotyped viruses. In the presence of polybrene, the percentage of GFP positive cells was 10.1% with the Ampho vector, and 7.9%, 6.4% and 6.1% with the Baev, Galv and RD114 viruses, respectively. A similar trend was observed with the EF-C peptide with 32.3% transduction achieved with the Ampho vector as compared to 25.3%, 22.3% and 23.4% with the Baev, Galv and RD114 viruses, respectively (Fig. 2.1A). For the keratinocytes, the Baev pseudotyped was slightly less efficient than the other vectors. In presence of polybrene, 32.6% of keratinocytes were transduced with the Baev vector compared to 44.7%, 40.9% and 42.5% with the Ampho, Galv and RD114 vectors, respectively. With the EF-C peptide, 47.5% of keratinocytes were GFP positive with the Baev vector and 58.4%, 54.8% and 55.9% with the Ampho, Galv and RD114 vectors, respectively (Fig. 2.1B).

The most important results of these experiments are that the EF-C peptide was a much better transduction enhancer than polybrene. EF-C was able to increase the transduction efficiency of fibroblasts with all 4 pseudotyped by 3 to 4 folds. For the keratinocytes, the transduction rate was increased by 30 to 45% with EF-C over the polybrene condition. We could then conclude that the EF-C peptide outperformed polybrene as a transduction enhancer.

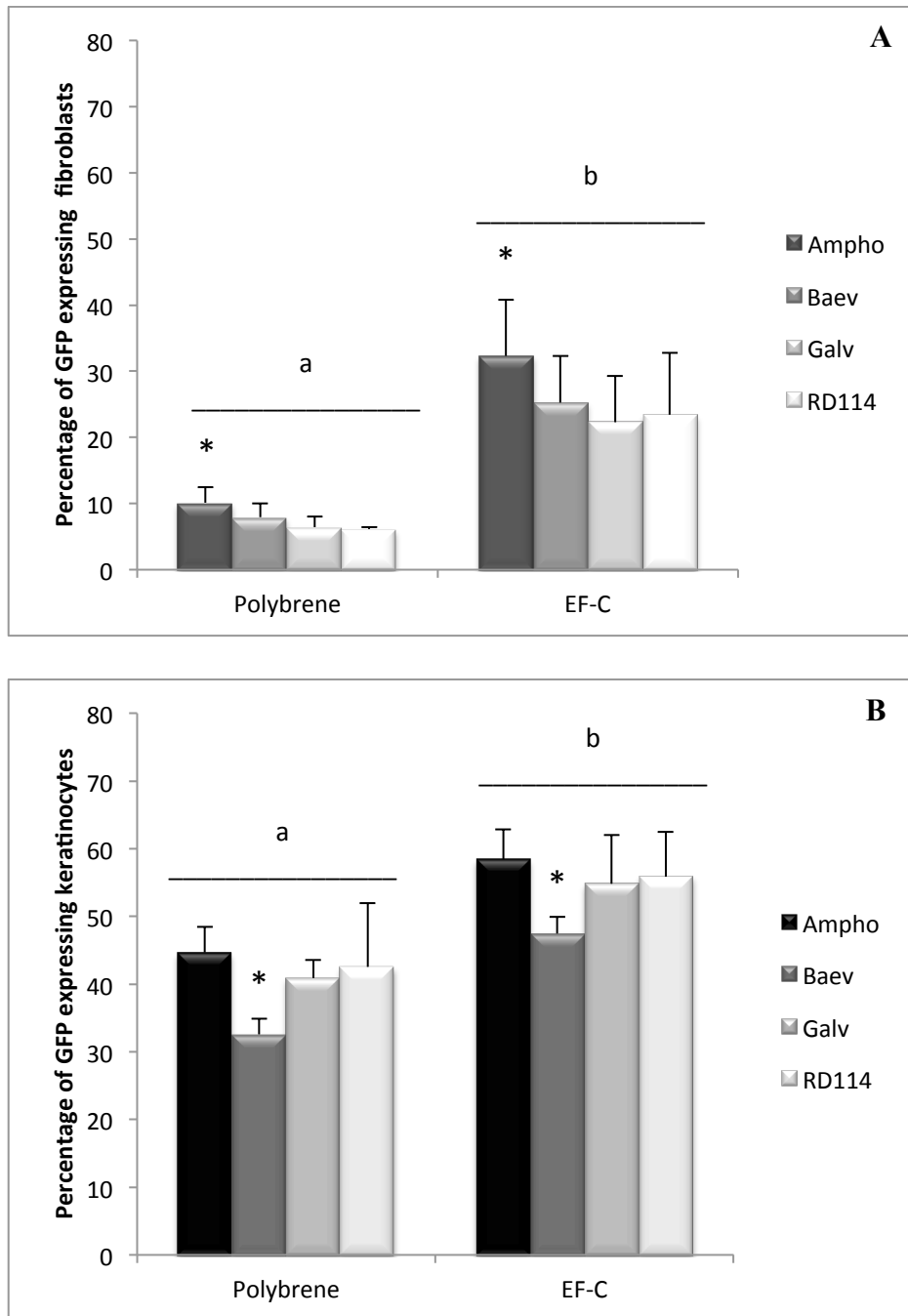


Figure 2.1. Analysis of GFP expressing cells by flow cytometry. Effect of pseudotyped particles Ampho, Baev, Galv and RD114 on transduction of fibroblasts at MOI 0,3 (A) and keratinocytes at MOI 1 (B). Effect of the enhancers polybrene and EF-C peptide on transduction of fibroblasts (A) and keratinocytes (B). Two-way linear mixed models with vector and trasduction enhancer as fixed factors and fibroblast or keratinocyte population as random factor; Tukey posthoc tests (n=6). Data presented as means \pm SEM. Different letters (a;b) indicate statistically significant differences between transduction enhancers ($p < 0,05$) and (*) indicates statistically significant differences among pseudotyped particles.

2.2.4.2 Efficient retroviral delivery of the *COL7A1* gene to human fibroblasts and keratinocytes in the presence of EF-C

Stable retrovirus producer cells were generated by infecting the 293Vec-Ampho cells with a *HA-COL7A1* virus. The Ampho packaging cell line was chosen as the vector produced from these cells is more infectious than the other pseudotyped for infecting fibroblasts (Fig. 2.1A). The *COL7A1* cDNA of the vector is linked to a HA tag to allow the discrimination between the endogenous COLVII present in healthy donor cells and the protein expressed by the transgene. Stable producer cells were cultured until confluence when viral supernatant was harvested. Fibroblasts and keratinocytes were infected at a MOI of 0.36 and the expression of the transgene was assessed by immunofluorescence. As observed with the GFP vector, the EF-C peptide was a much better enhancer of transduction than polybrene. Fibroblasts were transduced at 19% in the presence of EF-C and only at 4% with polybrene. The difference was less striking with keratinocytes; 36% of cells were infected in the presence of EF-C versus 29% with polybrene (Fig. 2.2). These results indicate that the EF-C peptide improves significantly the retroviral delivery of the *COL7A1* gene to human fibroblasts and keratinocytes.

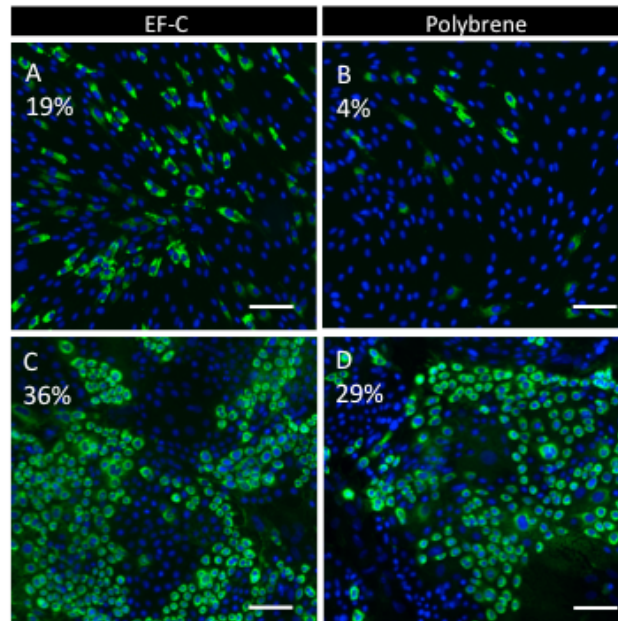


Figure 2.2. Expression of HA-COLVII in monocultured transduced cells. Wild-type fibroblasts transduced with 293Vec-Ampho-*HA-COL7A1* in the presence of EF-C peptide (A) or polybrene (B). Wild-type keratinocytes transduced with 293Vec-Ampho-*HA-COL7A1* in the presence of EF-C peptide (C) or polybrene (D). Cell immunolabeling with anti-HA antibody (green). Hoechst staining of cell nuclei (blue). Scale bar 100 μ m.

2.2.4.3 Transduced fibroblasts and keratinocytes self-assemble in tissue-engineered skin substitutes and express the exogenous collagen VII

Several three-dimensional skin models were produced with cells untransduced or transduced in the presence of EF-C or polybrene. Different TES were made from transduced (T) and untransduced (U) cells that contained keratinocytes-T/fibroblasts-T; keratinocyte-U/fibroblasts-T; keratinocytes-T/fibroblasts-U; keratinocytes-U/fibroblasts-U. HA-COLVII was detected at the DEJ in the skins that were constructed with transduced cells. HA-COLVII colocalized with collagen IV, an extracellular matrix protein that is normally present at the DEJ. A continuous intense deposit of HA-COLVII was observed in the TES that comprised both keratinocytes and fibroblasts that had been transduced in the presence of EF-C (Fig. 2.3A). The staining was continuous but less intense in TES containing only one transduced cell type (transduced fibroblasts (Fig. 2.3B) or transduced keratinocytes (Fig. 2.3C)). When the transductions were made in the presence of polybrene the staining was discontinued and less intense in the 3 conditions (Fig. 2.3D-2.3F). The expression of HA-COLVII was also detected in keratinocytes of all epidermal layers, as observed previously by others, possibly due to the LTR promoter ^(13, 37). There was no HA-COLVII detected in the control TES condition made with untransduced cells (Fig. 2.3G).

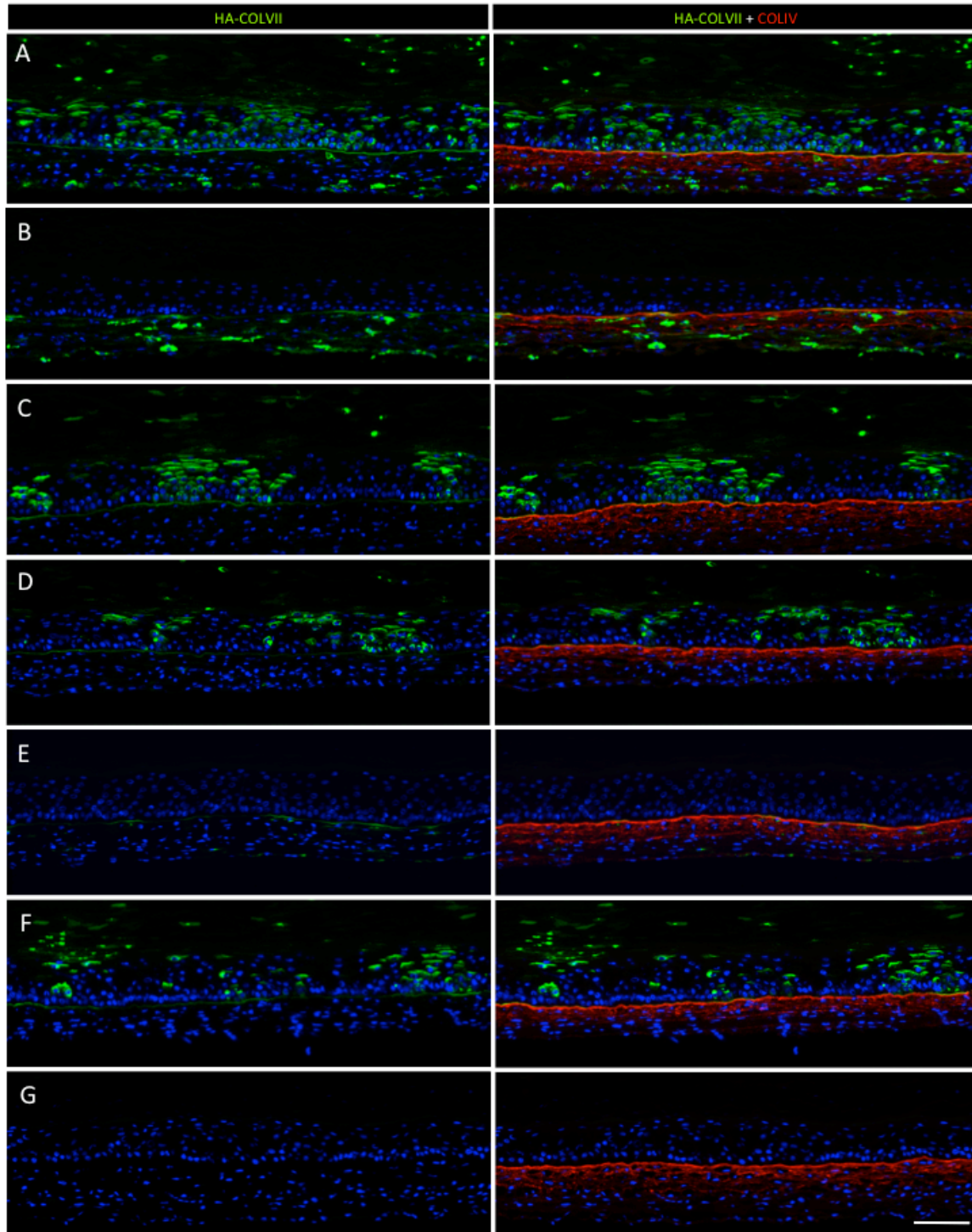


Figure 2.3. Production of HA-COLVII in tissue-engineered skin substitutes. Detection of HA-COLVII (green) by immunolabeling with anti-HA antibody. Immunolabeling of collagen type IV (right column, red). Hoechst staining of cell nuclei (blue). keratinocytes-T/fibroblasts-T (A, D); keratinocytes-U/fibroblasts-T (B, E); keratinocytes-T/fibroblasts-U (C, F). Keratinocytes-U/fibroblasts-U (G). Cells were transduced in the presence of EF-C (A-C) and polybrene (D-F). Note that conditions transduced in the presence of EF-C as enhancer express more HA-COLVII than in the presence of polybrene. A continuous line of HA-COLVII is observed in (A). Scale bar 100 μm .

2.2.4.4 Transduced keratinocyte stem cells are preserved in TES

Long-term expression of a transgene in keratinocytes will only be possible if stem cells are transduced. We took advantage of keratin 19 (K19) expression in keratinocyte stem cells ⁽²⁶⁾ to use this marker in order to investigate the presence of cells with a dual expression of HA-COLVII and K19. With both transduction enhancers, HA-COLVII can be detected in K19 positive cells present at the basal layer of the epidermis (Fig. 2.4). This result suggests that our transduction protocol can preserve the keratinocyte stem cells.

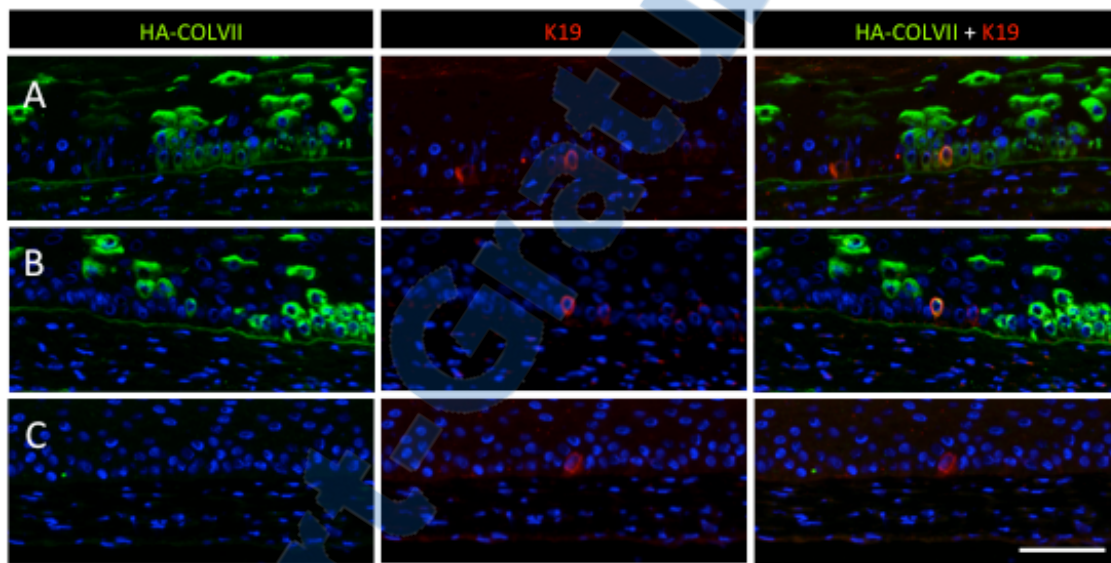


Figure 2.4. Detection of HA-COLVII and K19 in tissue-engineered skin substitutes. Immunolabeling of HA-COLVII with anti-HA antibody (green) and keratin 19 (K19, red). Hoechst staining of cell nuclei (blue). Keratinocytes-T/ fibroblastes-T transduced in the presence of EF-C (A) and polybrene (B); Keratinocytes-U/ Fibroblastes-U (C). Stem cells are transduced, as observed by de co-labeling with HA and K19. Scale bar 100 μ m.

2.2.4.5 The epidermal proliferation and differentiation profiles are conserved in TES made with transduced keratinocytes

Normal proliferation and differentiation patterns in TES are necessary for the maintenance of the skin homeostasis. Immunofluorescence results showed a similar expression pattern in TES produced with transduced cells and in the control produced with untransduced cells. The basal keratinocytes expressed the keratin 14 (K14) and the proliferation marker Ki67. Keratinocytes in

suprabasal layers expressed the differentiation marker keratin 10 (K10) whereas loricrin, a granulous layer marker, was present in higher suprabasal layers (Fig. 2.5A-F).

Histological analysis of TES using Hematoxylin-Eosin coloration confirmed the well-organized tissue structure produced by the self-assembling method with transduced or untransduced cells (Fig. 2.5G-I). This result indicates that the transduction process did not alter the cell proliferation and differentiation profiles of the epidermis.

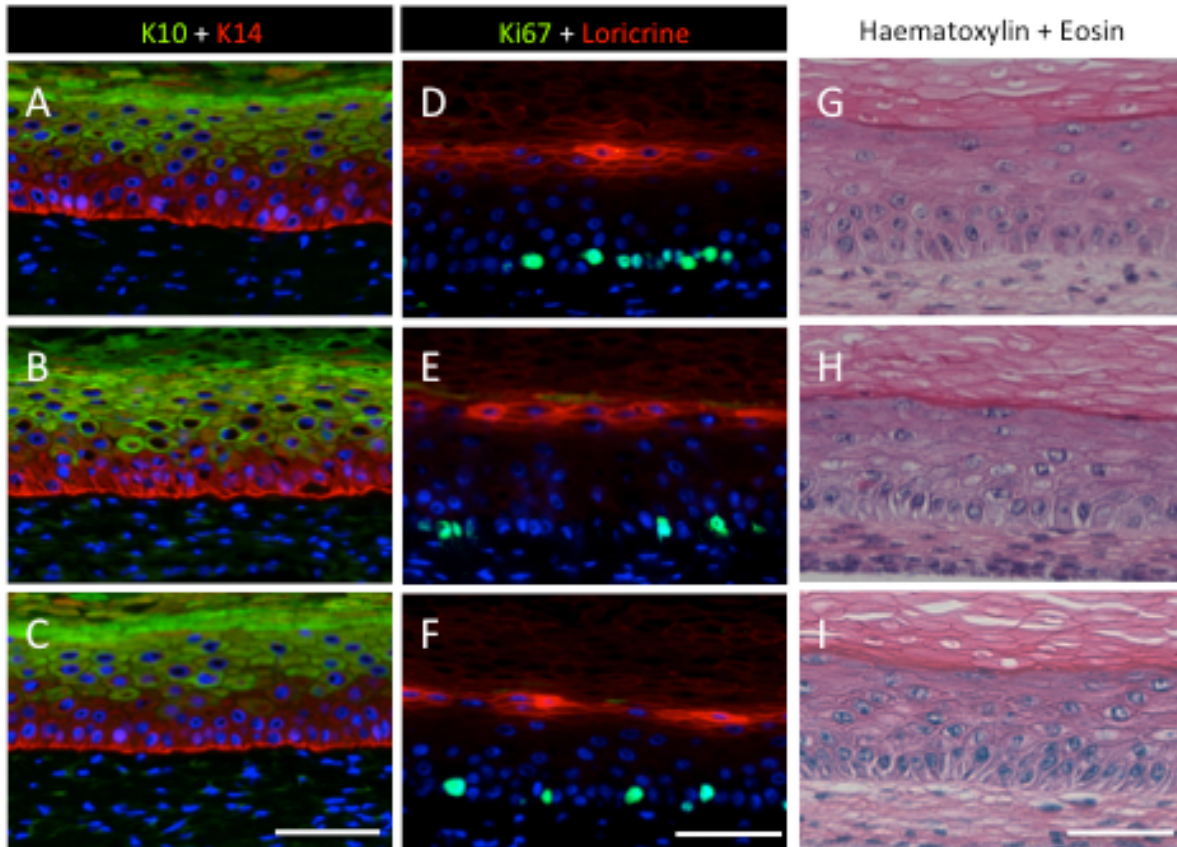


Figure 2.5 Differentiation profile of tissue-engineered skin substitutes. Double immunodetection of keratin 10 (K10, green) and keratin14 (K14, red) (A-C). Double immunodetection of the proliferation marker Ki67 (green) and the late differentiation marker loricrin (red) (D-F). Hoechst staining of cell nuclei (blue). Histological analysis of tissue-engineered skin (G, I). Keratinocytes/fibroblasts transduced in the presence of EF-C (A, D, G) and polybrene (B, E, H); untransduced keratinocytes/ untransduced fibroblasts (C, F, I). The differentiation profile in tissue-engineered skin produced with transduced cells is similar to reconstructed skin using non-treated cells. Scale bar 100 μ m.

2.2.5 Discussion

In this study, we have described an efficient method of retroviral gene transfer into human fibroblasts and keratinocytes using the EF-C peptide. We have also generated TES constructed with transduced keratinocytes and fibroblasts expressing exogenous collagen VII. Keratinocyte stem cells were transduced, and a continuous deposit of exogenous collagen was present at the DEJ when cells used to construct TES were transduced in the presence of EF-C.

The low transduction efficiency of target cells is a limiting factor in gene therapy applications that can be improved by different means. In the case of retroviral gene delivery, new versions of stable retrovirus packaging cell lines have been developed over the years. These newer versions of cells are safer and release recombinant retroviruses with higher titers compared with former versions. We have recently developed a set of 293-based retrovirus packaging cell lines that produce vectors with titers above 10^7 ivp/ml, like the GFP viruses used in this study. The transduction ability of GFP vectors pseudotyped with the Ampho, Baev, Galv and RD114 envelopes was assessed and we found that the Ampho vector was more infectious towards fibroblasts than the other vectors. With keratinocytes the Baev vector was less infectious than the other tested viruses.

The long size of the *COL7A1* cDNA has always hampered the generation of high-titer vectors. In our study, the titer obtained with the *HA-COL7A1* vector from a 293Vec-Ampho population was 2×10^5 ivp/ml. But as only 20% of the cells were *HA-COL7A1* positive, we could expect that the selection of isolated retrovirus producer clones would lead to titers above 10^6 ivp/ml. We intentionally did not select a retrovirus producer clone as the *HA-COL7A1* vector is not going to be used in the clinic. A codon-optimized version of the *COL7A1* cDNA in a self-inactivated (SIN) retroviral backbone is currently under development in our laboratory (Ghani et al., manuscript in preparation). Codon optimization is used to enhance the stability of the transcript that should lead to higher viral titers and transgene expression in transduced cells. Vectors that contain intact LTRs have contributed to the development of leukemias in the treatment of immune deficiencies by retroviral-mediated gene therapy (18, 19). It is now admitted that SIN retroviral vectors that contain a house-keeping promoter and with deleted LTRs are safer.

Fibronectin and retronectin have already been shown to enhance retroviral gene transfer to keratinocytes but the cost of the GMP grade retronectin or fibronectin as well as the increase in

manipulation steps limit the clinical development of such a gene therapy strategy for RDEB. One alternative is to use a less complex molecule that could be added at the same time with the vector without further manipulations. The EF-C peptide could be such a molecule; it has the ability to self-assemble into nanofibrils and to increase retroviral transduction of primary human blood cells (peripheral blood lymphocytes, macrophages and hematopoietic stem cells). In our study, we found that EF-C was able to increase gene transfer in fibroblasts by 2 to 4-fold with the GFP vector (Fig. 2.1A) and by 5-fold with the *HA-COL7A1* vector when compared to the polybrene condition (Fig. 2.2C-D). A 1.5-fold increase in keratinocyte transduction was obtained with EF-C, but as the infection values were high and not in the linear range the difference are most likely more than 2-fold.

Stable expression of COLVII in grafted skin is required for long-term effect of the treatment in RDEB patients. This is only possible if the transgene integrates the genome of cells that permanently reside in the tissue. As demonstrated in our study (Fig. 2.3) and by others ^(17, 39) transduced fibroblasts produced COLVII, which is relocated at DEJ, but maintenance of transduced fibroblasts in a reconstructed skin over time remains to be determined. However, we observed the presence of K19-expressing keratinocytes and HA-COLVII in a subset of basal cells of TES ⁽²⁶⁾ suggesting that keratinocyte stem cells were transduced (Fig.2.4). Moreover, histological and immunofluorescent analyses of TES confirmed that the transduction process that we used did not affect the proliferation and differentiation profiles of TES. The self-assembly method generates highly functional and mechanically stable TES that is suitable for the permanent closure of full-thickness skin injuries in human patients ^(11, 27). We believe that our TES genetically modified to correct RDEB has the potential to provide a permanent local treatment to patients suffering from this disease.

In conclusion, our results indicate that the TESs produced by the self-assembly approach using the optimized method of transduction of fibroblasts and keratinocytes provide a microenvironment supporting the establishment of stem cells. Thus, we conclude that this approach is very promising to offer a treatment to patients suffering from RDEB.

2.2.6 Acknowledgments

The authors would like to thank Israël Martel, Amélie Lavoie, Benjamin Goyer, Carolyne Bisson-Simard, Laurence Cantin-Warren, Rina Guignard and Manon Gaudreault for their technical

assistance. LG is the holder of the Canadian Research Chair on Stem Cell and Tissue Engineering from the CIHR. ADP is a recipient of scholarships from the Fondation du Grand défi Pierre Lavoie, Université Laval and CHU du Québec. Funding source: ThéCell

2.2.7 Conflicts of Interest

KG and MC are inventors on a patent that has been licensed to BioVec Pharma. KG and MC own equity in BioVec Pharma.

2.2.8 References

- (1) Aumailley, M; Has, C; Tungal, L; Bruckner-Tuderman, L. Molecular basis of inherited skin-blistering disorders, and therapeutic implications. *Expert reviews in molecular medicine*. 2006;8(24):1-21.
- (2) Barrandon, Y; Grasset, N; Zaffalon, A; Gorostidi, F; Claudinot, S; Droz-Georget, SL, et al. Capturing epidermal stemness for regenerative medicine. *Seminars in cell & developmental biology*. 2012;23(8):937-44.
- (3) Bell, E; Ivarsson, B; Merrill, C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979;76(3):1274-8.
- (4) Berthod, F; Hayek, D; Damour, O; Collombel, C. Collagen synthesis by fibroblasts cultured within a collagen sponge. *Biomaterials*. 1993;14(10):749-54.
- (5) Bisson, F; Rochefort, E; Lavoie, A; Larouche, D; Zaniolo, K; Simard-Bisson, C, et al. Irradiated human dermal fibroblasts are as efficient as mouse fibroblasts as a feeder layer to improve human epidermal cell culture lifespan. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(3):4684-704.
- (6) Boyce, ST; Kagan, RJ; Greenhalgh, DG; Warner, P; Yakuboff, KP; Palmieri, T, et al. Cultured skin substitutes reduce requirements for harvesting of skin autograft for closure of excised, full-thickness burns. *J Trauma*. 2006;60(4):821-9.
- (7) Bruckner-Tuderman, L; Hopfner, B; Hammami-Hauasli, N. Biology of anchoring fibrils: lessons from dystrophic epidermolysis bullosa. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 1999;18(1):43-54.
- (8) Chen, M; Kasahara, N; Keene, DR; Chan, L; Hoeffler, WK; Finlay, D, et al. Restoration of type VII collagen expression and function in dystrophic epidermolysis bullosa. *Nature genetics*. 2002;32(4):670-5.

- (9) Conget, P; Rodriguez, F; Kramer, S; Allers, C; Simon, V; Palisson, F, et al. Replenishment of type VII collagen and re-epithelialization of chronically ulcerated skin after intradermal administration of allogeneic mesenchymal stromal cells in two patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Cytotherapy*. 2010;12(3):429-31.
- (10) De Rosa, L; Carulli, S; Cocchiarella, F; Quaglino, D; Enzo, E; Franchini, E, et al. Long-term stability and safety of transgenic cultured epidermal stem cells in gene therapy of junctional epidermolysis bullosa. *Stem cell reports*. 2014;2(1):1-8.
- (11) Duranceau L, GH, Bortoluzzi P, Moulin V, Auger FA, Germain L Successful grafting of novel autologous tissue-engineered skin substitutes (dermis and epidermis) on twelve burn patients. *J Burn Care Res* 2014;35:S121.
- (12) Fine, JD; Bruckner-Tuderman, L; Eady, RA; Bauer, EA; Bauer, JW; Has, C, et al. Inherited epidermolysis bullosa: updated recommendations on diagnosis and classification. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2014;70(6):1103-26.
- (13) Gache, Y; Baldeschi, C; Del Rio, M; Gagnoux-Palacios, L; Larcher, F; Lacour, JP, et al. Construction of skin equivalents for gene therapy of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Human gene therapy*. 2004;15(10):921-33.
- (14) Germain, L; Rouabhia, M; Guignard, R; Carrier, L; Bouvard, V; Auger, FA. Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*. 1993;19(2):99-104.
- (15) Ghani, K; Cottin, S; Kamen, A; Caruso, M. Generation of a high-titer packaging cell line for the production of retroviral vectors in suspension and serum-free media. *Gene therapy*. 2007;14(24):1705-11.
- (16) Ghani, K; Wang, X; de Campos-Lima, PO; Olszewska, M; Kamen, A; Riviere, I, et al. Efficient human hematopoietic cell transduction using RD114- and GALV-pseudotyped retroviral vectors produced in suspension and serum-free media. *Human gene therapy*. 2009;20(9):966-74.
- (17) Goto, M; Sawamura, D; Ito, K; Abe, M; Nishie, W; Sakai, K, et al. Fibroblasts show more potential as target cells than keratinocytes in COL7A1 gene therapy of dystrophic epidermolysis bullosa. *The Journal of investigative dermatology*. 2006;126(4):766-72.
- (18) Hacein-Bey-Abina, S; Garrigue, A; Wang, GP; Soulier, J; Lim, A; Morillon, E, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(9):3132-42.
- (19) Howe, SJ; Mansour, MR; Schwarzwaelder, K; Bartholomae, C; Hubank, M; Kempinski, H, et al. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(9):3143-50.
- (20) Kelly, PF; Vandergriff, J; Nathwani, A; Nienhuis, AW; Vanin, EF. Highly efficient gene transfer into cord blood nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency repopulating cells by oncoretroviral vector particles pseudotyped with the feline endogenous retrovirus (RD114) envelope protein. *Blood*. 2000;96(4):1206-14.

- (21) Kern, JS; Gruninger, G; Imsak, R; Muller, ML; Schumann, H; Kiritsi, D, et al. Forty-two novel COL7A1 mutations and the role of a frequent single nucleotide polymorphism in the MMP1 promoter in modulation of disease severity in a large European dystrophic epidermolysis bullosa cohort. *The British journal of dermatology*. 2009;161(5):1089-97.
- (22) Kiem, HP; Heyward, S; Winkler, A; Potter, J; Allen, JM; Miller, AD, et al. Gene transfer into marrow repopulating cells: comparison between amphotropic and gibbon ape leukemia virus pseudotyped retroviral vectors in a competitive repopulation assay in baboons. *Blood*. 1997;90(11):4638-45.
- (23) Larouche D, C-WL, Desgagné M, Guignard R, Martel I, Ayoub A, Lavoie A, Gauvin R, Auger FA, Moulin VJ, Germain L. Improved methods to produce self-assembled skin substitutes suitable for the permanent closure of full-thickness skin injuries. *BioResearch Open Access* In press.
- (24) Larouche, D; Lavoie, A; Proulx, S; Paquet, C; Carrier, P; Beauparlant, A, et al. [Regenerative medicine: stem cells, cellular and matricial interactions in the reconstruction of skin and cornea by tissue engineering]. *Pathologie-biologie*. 2009;57(4):299-308.
- (25) Larouche, D; Paquet, C; Fradette, J; Carrier, P; Auger, FA; Germain, L. Regeneration of skin and cornea by tissue engineering. *Methods in molecular biology*. 2009;482:233-56.
- (26) Lavoie, A; Fugere, C; Beauparlant, A; Goyer, B; Larouche, D; Paquet, C, et al. Human epithelial stem cells persist within tissue-engineered skin produced by the self-assembly approach. *Tissue engineering Part A*. 2013;19(7-8):1023-38.
- (27) Lavoie, AL, D; Goyer, B; Perreault, I; Genest, H; Duranceau, L; Moulin, V; Auger, A; Germain, L. Autologous tissue-engineered skin preserving epithelial stem cells applied to the permanent coverage of large burn wounds and to skin reconstruction. *JOURNAL OF TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE*. 2012;Volume: 6 Supplement: 1 (Special Issue: SI):93.
- (28) Mavilio, F; Pellegrini, G; Ferrari, S; Di Nunzio, F; Di Iorio, E; Recchia, A, et al. Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nature medicine*. 2006;12(12):1397-402.
- (29) Meier, C; Weil, T; Kirchhoff, F; Munch, J. Peptide nanofibrils as enhancers of retroviral gene transfer. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2014;6(5):438-51.
- (30) Michel, M; L'Heureux, N; Pouliot, R; Xu, W; Auger, FA; Germain, L. Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair. *In vitro cellular & developmental biology Animal*. 1999;35(6):318-26.
- (31) Murauer, EM; Koller, U; Pellegrini, G; De Luca, M; Bauer, JW. Advances in Gene/Cell Therapy in Epidermolysis Bullosa. *The Keio journal of medicine*. 2015;64(2):21-5.
- (32) Nagy, N; Almaani, N; Tanaka, A; Lai-Cheong, JE; Techanukul, T; Mellerio, JE, et al. HB-EGF induces COL7A1 expression in keratinocytes and fibroblasts: possible mechanism underlying allogeneic fibroblast therapy in recessive dystrophic epidermolysis Bullosa. *The Journal of investigative dermatology*. 2011;131(8):1771-4.
- (33) Pouliot, R; Larouche, D; Auger, FA; Juhasz, J; Xu, W; Li, H, et al. Reconstructed human skin produced in vitro and grafted on athymic mice. *Transplantation*. 2002;73(11):1751-7.

- (34) Proulx, S; Fradette, J; Gauvin, R; Larouche, D; Germain, L. Stem cells of the skin and cornea: their clinical applications in regenerative medicine. *Current opinion in organ transplantation*. 2011;16(1):83-9.
- (35) Qiao, J; Roy, V; Girard, MH; Caruso, M. High translation efficiency is mediated by the encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry sites if the natural sequence surrounding the eleventh AUG is retained. *Human gene therapy*. 2002;13(7):881-7.
- (36) Remington, J; Wang, X; Hou, Y; Zhou, H; Burnett, J; Muirhead, T, et al. Injection of recombinant human type VII collagen corrects the disease phenotype in a murine model of dystrophic epidermolysis bullosa. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2009;17(1):26-33.
- (37) Siprashvili, Z; Nguyen, NT; Bezchinsky, MY; Marinkovich, MP; Lane, AT; Khavari, PA. Long-term type VII collagen restoration to human epidermolysis bullosa skin tissue. *Human gene therapy*. 2010;21(10):1299-310.
- (38) Sun, BK; Siprashvili, Z; Khavari, PA. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. *Science*. 2014;346(6212):941-5.
- (39) Titeux, M; Pendaries, V; Zanta-Boussif, MA; Decha, A; Pironon, N; Tonasso, L, et al. SIN retroviral vectors expressing COL7A1 under human promoters for ex vivo gene therapy of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2010;18(8):1509-18.
- (40) Wagner, JE; Ishida-Yamamoto, A; McGrath, JA; Hordinsky, M; Keene, DR; Woodley, DT, et al. Bone marrow transplantation for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *The New England journal of medicine*. 2010;363(7):629-39.
- (41) Wang, X; Ghasri, P; Amir, M; Hwang, B; Hou, Y; Khalili, M, et al. Topical application of recombinant type VII collagen incorporates into the dermal-epidermal junction and promotes wound closure. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2013;21(7):1335-44.
- (42) Wong, T; Gammon, L; Liu, L; Mellerio, JE; Dopping-Hepenstal, PJ; Pacy, J, et al. Potential of fibroblast cell therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *The Journal of investigative dermatology*. 2008;128(9):2179-89.
- (43) Yalamanova, M; Meier, C; Shaytan, AK; Vas, V; Bertoncini, CW; Arnold, F, et al. Peptide nanofibrils boost retroviral gene transfer and provide a rapid means for concentrating viruses. *Nat Nanotechnol*. 2013;8(2):130-6.
- (44) R Core Team (2016) R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- (45) Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S. Sarkar, D., R Core Team, 2015. nlme: Linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1-120, URL: <http://CRAN.R-project.org/package=nlme>.
- (46) Hothorn, T., Bretz, F., Westfall, P., 2008. Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical Journal* 50(3), 346-363, URL: <http://CRAN.R-project.org/package=multcomp>.

- (47) Galecki, A., Burzykowski, T., 2013. Linear mixed-effects models using R: A step-by-step approach. First edition. Springer, New York, URL:<http://CRAN.R-project.org/package=nlmeU>.

Chapitre 3 : Discussion, perspectives et conclusion

Dans le cadre de mon projet, un premier pas a été franchi dans le développement d'un traitement pour l'EBDR en utilisant la peau reconstruite par la méthode d'auto-assemblage mise au point au LOEX (140) à l'aide de fibroblastes et de kératinocytes modifiés génétiquement. En effet, nous avons réussi à introduire le gène *HA-COL7A1* dans des fibroblastes et des kératinocytes provenant de sujets normaux. Les peaux reconstruites à partir d'une combinaison de fibroblastes et de kératinocytes non transduits ou transduits avec le gène *HA-COL7A1* ont présenté un profil de différenciation similaire aux peaux reconstruites contrôles lors des analyses histologiques et immunohistochimiques. Nous avons également observé que le collagène de type VII portant l'étiquette HA s'intégrait tel qu'attendu au niveau de la jonction dermo-épidermique des peaux reconstruites, comme le collagène natif. L'avantage de la stratégie que nous avons utilisée est la possibilité de corriger le gène défectueux *ex vivo* de fibroblastes et de kératinocytes provenant d'un patient atteint d'EBDR, puis d'utiliser ces cellules pour fabriquer des peaux reconstruites qui pourraient être greffées pour traiter les régions les plus exposées aux décollements de l'épiderme du patient, améliorant ainsi sa qualité de vie.

Nos travaux s'ajoutent à d'autres démontrant la faisabilité d'utiliser la thérapie génique associée au génie tissulaire pour traiter l'EBDR (39, 40, 44, 92-96). Les deux principales particularités de notre étude sont d'avoir réussi à utiliser une faible MOI pour transduire le gène *HA-COL7A1* dans des fibroblastes et des kératinocytes, ainsi que d'avoir utilisé les cellules transduites pour produire la peau reconstruite par la méthode d'auto-assemblage développée au LOEX. Nous avons donc démontré la faisabilité de ce concept.

Un aspect de mes travaux qui a fortement contribué au succès des résultats obtenus dans ce projet est l'optimisation de la technique de transduction des fibroblastes et des kératinocytes. En effet, à l'aide du facilitateur de transduction EF-C et une MOI de 0.36 nous avons réussi à obtenir une nette amélioration des taux de transduction du gène *HA-COL7A1* dans les fibroblastes, soit 19%, contre 4% avec l'utilisation du polybrène. À cette même MOI, l'EF-C et le polybrène ont permis un bon taux de transduction des kératinocytes, soit respectivement 36% et 29% (Figure 2.2.). Par comparaison, les autres études ont utilisé des MOI beaucoup plus élevées et ont donc obtenu des taux plus élevés de transduction. Siprashvili et ses collègues ont obtenu un taux de transduction de

93% pour des kératinocytes transduits avec un vecteur rétroviral contenant le gène *COL7A1* à une MOI comprise entre 10 à 15. Les taux de transduction obtenus par Titeux et ses collaborateurs lors d'une double transduction avec un vecteur rétroviral SIN utilisé pour transduire des fibroblastes et des kératinocytes ont été de 70% et 60%, respectivement, à un MOI de 20.

Il est intéressant de souligner qu'il est possible d'avoir un dépôt homogène du collagène de type VII tel que détecté par le marquage de l'étiquette HA le long de la jonction dermo-épidermique des peaux reconstruites même avec un taux de transduction inférieur à 40%. Ces résultats suggèrent qu'il n'est pas nécessaire que tous les kératinocytes expriment le collagène de type VII pour obtenir un dépôt continu de collagène. Toutefois, des analyses supplémentaires devront être effectuées pour confirmer que ce dépôt est bien continu au sein de la jonction, par exemple par des analyses ultrastructurales en microscopie électronique à transmission à l'aide d'anticorps dirigés contre le l'étiquette HA.

L'autre particularité de mes travaux en comparaison aux autres études est l'utilisation de la peau reconstruite par auto-assemblage. Par rapport aux autres modèles de peau reconstruite par génie tissulaire, un des avantages importants de la méthode d'auto-assemblage est sa capacité de préserver les cellules souches de l'épiderme (9). Avec cette méthode, les fibroblastes produisent eux-mêmes la matrice extracellulaire sans l'addition d'autres matériaux exogènes. Ainsi, les interactions tridimensionnelles entre l'épiderme et le derme vont assurer la formation d'un tissu très similaire à la peau normale. Les fibroblastes du derme auto-assemblé vont aussi produire les molécules nécessaires pour maintenir la niche, c'est-à-dire l'environnement qui va favoriser la préservation des cellules souches épidermiques (9, 140, 141). De cette façon, la qualité du tissu formé, contenant un derme, un épiderme avec ces quatre couches bien définies et une membrane basilaire, est assurée. La présence d'une membrane basilaire est un facteur très important pour la préservation des cellules souches (6, 7, 9) avec un impact positif sur le maintien du tissu greffé. Ainsi, la présence de la membrane basilaire dans notre modèle a été un point primordial pour évaluer l'intégration appropriée du collagène de type VII.

Un des éléments clés dans la réussite de l'approche proposée dans mon projet est que la méthode de transduction cible les cellules souches épithéliales. En effet, la présence de cellules basales transduites et qui expriment la kératine 19, un marqueur des cellules souches (9), dans la

peau reconstruite après 21 jours de culture à l'interface air-liquide est très encourageante. Ceci indique que les cellules souches ont été transduites et conservées dans les peaux reconstruites.

Un fait intéressant que nous avons observé dans les peaux reconstruites est que les kératinocytes exprimant l'étiquette HA formaient des unités similaires aux EPU (unité épidermique de prolifération, acronyme de la terminologie anglaise *epidermal proliferation unit*) décrites en 1974 par l'équipe de Potten. Dans ce modèle, proposé pour expliquer l'homéostasie de l'épiderme chez la souris, une EPU est composée d'un kératinocyte souche en son centre qui est à l'origine d'environ dix kératinocytes au niveau de la couche basale. Les kératinocytes différenciés des couches suprabasales situés au-dessus font partie de la même EPU (150). Même si les études n'ont pas démontré la présence d'une structure aussi clairement organisée dans l'épiderme humain (151), il est possible que dans les peaux reconstruites les cellules se réorganisent en de telles unités de prolifération. Une façon de vérifier comment les cellules souches marquées avec l'étiquette HA s'organisent dans notre modèle de peau reconstruite humaine, serait d'utiliser l'essai de rétention-dilution du BrdU (5'-bromo-2'-deoxyuridine) (152), un agent qui s'incorpore à l'ADN lors de la division cellulaire. La méthode de rétention-dilution du BrdU permet de visualiser les cellules présentant un cycle de division cellulaire lent, un comportement attendu des cellules souches qui se retrouvent dans une niche appropriée. Ainsi, un triple marquage permettant de visualiser l'étiquette HA, le BrdU et la kératine 19 dans la peau reconstruite par microscopie confocale pourrait démontrer si les cellules sont quiescentes au centre des structures similaires à l'EPU. De plus, des essais de greffe des peaux reconstruites modifiées génétiquement pourront confirmer la présence de cellules souches ayant incorporé le transgène par la régénération du tissu à long terme et le maintien de la production du collagène de type VII.

Le vecteur rétroviral utilisé dans mes expériences contenait un promoteur viral, le LTR. Le fait que l'étiquette HA ait été détectée dans les kératinocytes des couches suprabasales des peaux reconstruites, tel qu'observé dans la figure 2.3., peut suggérer que l'expression du gène introduit est plus importante que son niveau physiologique car le collagène de type VII n'est normalement pas détecté dans les kératinocytes. Ces observations sont en ligne avec celles du groupe qui a utilisé ce vecteur initialement (94) ainsi que le groupe de Gache, qui a utilisé le promoteur LTR pour transduire le gène *COL7A1* dans des kératinocytes (39). Ceci soulève la question à savoir si l'étiquette HA détectée était liée à une forme non mature du collagène de type VII, si les cellules différenciées ont continué à produire du collagène de type VII lié à l'étiquette HA dû à la présence du promoteur viral

LTR, ou si la protéine produite en trop grande quantité est restée dans le cytoplasme des kératinocytes durant leur différenciation. Cette dernière hypothèse est soutenue par l'observation de l'étiquette HA dans les cornéocytes qui sont reconnus comme étant métaboliquement inactifs (3). Une façon de vérifier si c'est le cas serait d'utiliser la technique d'hybridation *in situ* pour détecter la présence de l'ARN messager du gène *HA-COL7A1* dans les couches suprabasales d'une coupe histologique de peau reconstruite, associée à une immunofluorescence de la forme mature du collagène de type VII.

Puisqu'il a été rapporté que des niveaux supraphysiologiques de collagène augmentaient les risques de fibrose (17) et de carcinome (35), il faudra déterminer le taux de production du collagène de type VII dans les peaux reconstruites faites à partir des cellules de patients EBDR corrigées afin d'assurer que le niveau physiologique du collagène de type VII n'a pas été dépassé et que la quantité de la protéine est suffisante pour former les fibrilles d'ancrage. Pour s'y faire, des méthodes de type ELISA ou Western Blot pourraient être utilisées. Toutefois, avec les cellules saines telles qu'utilisées à cette étape de notre projet, cette évaluation pourrait nous amener à des résultats biaisés, car la cellule produit encore le collagène de type VII endogène et la possibilité d'un effet de rétroaction induisant la diminution de la production du collagène de type VII portant l'étiquette HA et du collagène de type VII endogène est méconnue.

Selon les conditions expérimentales testées dans le cadre de mon projet, les kératinocytes ont été plus facilement transduits que les fibroblastes. Les vecteurs rétroviraux utilisés dans mon projet ont été produits à partir des cellules d'encapsidation provenant d'une population cellulaire et non d'un clone. Dans ces conditions, des vecteurs ne contenant pas le gène *HA-COL7A1* étaient probablement présents et ont pu compétitionner avec les vecteurs contenant le gène *HA-COL7A1* pour la liaison aux récepteurs des cellules cibles. La sélection clonale de cellules productrices de virus permettra d'obtenir des titres beaucoup plus élevés.

Goto et collaborateurs ont proposé que les fibroblastes étaient de meilleurs cibles que les kératinocytes pour la thérapie génique *ex vivo*, car ils sont plus faciles à cultiver et plus robustes à transduire. Le groupe a observé également que l'expression du gène *COL7A1* mesurée par la quantité d'ARN dans la peau normale humaine est plus élevée dans l'épiderme que dans le derme (92). Dans nos conditions, les kératinocytes ont été transduits et cultivés plus efficacement. Lors de la production des peaux reconstruites par la méthode d'auto-assemblage, les conditions dans

lesquelles nous avons observé en immunofluorescence une accumulation (figure 2.3) plus importante de collagène de type VII à la jonction dermo-épidermique sont celles transduites avec l'EF-C. De plus, la condition kératinocytes transduits / fibroblastes transduits a été la plus efficace, suivi de la condition kératinocytes transduits / fibroblastes non traités et pour finir la condition kératinocytes non traités / fibroblastes transduits. Quoique la meilleure condition observée fût celle où les kératinocytes et les fibroblastes étaient tous deux transduits, il est possible d'envisager de ne transduire que les kératinocytes pour la production des peaux reconstruites, puisque nos conditions parviennent à cibler les kératinocytes souches. De plus, les kératinocytes provenant d'un ou de plusieurs clones de kératinocytes transduits qui produisent correctement le collagène de type VII pourraient être utilisés pour fabriquer les peaux reconstruites (111, 112). De cette façon, les manipulations cellulaires pourraient être réduites, puisqu'il ne serait pas nécessaire d'effectuer l'évaluation de la sécurité d'insertion du transgène sur les fibroblastes. Même si les fibroblastes transduits sont en mesure de fournir le collagène de type VII à la jonction dermo-épidermique, le maintien de fibroblastes produisant du collagène de type VII dans une peau reconstruite au fil du temps reste à déterminer. Bien qu'une thérapie génique ciblant les kératinocytes souches permettrait la correction permanente de la maladie, la transduction du gène *COL7A1* dans les kératinocytes en phase d'amplification transitoire et les fibroblastes pourrait aussi être utile. En effet, ces cellules pourraient fournir du collagène de type VII au début de la formation de la peau reconstruite et contribuer à l'adhésion dermo-épidermique jusqu'à la stabilisation du nouveau tissu formé.

À la différence de nous, qui avons utilisé des kératinocytes et des fibroblastes normaux, le groupe de Goto a utilisé des systèmes rétroviraux pour transduire des kératinocytes et des fibroblastes provenant d'un patient affecté par une variante de l'EBDR causée par des mutations nulles dans le gène *COL7A1*. Lorsque les peaux reconstruites produites par différentes combinaisons de cellules transduites ont été transplantées chez des rats nus, la combinaison des kératinocytes non traités / fibroblastes transduits a montré une plus grande accumulation de collagène de type VII à la jonction dermo-épidermique que la combinaison de kératinocytes transduits / fibroblastes non traités. Néanmoins, des fibrilles d'ancrage contenant le collagène de type VII étaient présentes dans les deux combinaisons (92). Il est possible que la plus faible accumulation de collagène de type VII observée dans la condition kératinocytes transduits / fibroblastes non traités soit due au fait que les conditions de transduction des kératinocytes n'aient pas ciblé efficacement les cellules souches. Ces résultats doivent donc être interprétés avec prudence, car la transduction

et la conservation des cellules souches n'ont pas été analysées dans ces tissus reconstruits. L'autre différence importante par rapport à notre méthode de transduction est que les auteurs ont utilisé une période d'incubation du vecteur avec les cellules de 24 heures comparativement à six heures dans notre cas. Cette période de six heures a été choisie suite à une étude préliminaire effectuée par notre groupe, où nous avons observé davantage de paraclones suite à l'incubation des kératinocytes pendant 24 heures avec les vecteurs tandis que des holoclones transduits ont été observés lorsque la période d'incubation était réduite à six heures. Ces résultats suggèrent que des conditions de transduction inadéquates favorisent la différenciation des kératinocytes. Ainsi, un taux maximal de transduction des kératinocytes pourrait sembler optimal, mais s'il induit la différenciation des cellules, la production à long terme du collagène de type VII dans les peaux reconstruites sera compromise s'il n'y a pas de cellules souches transduites. La présence de cellules souches transduites dans notre modèle est donc une force de notre méthode.

Le facilitateur de transduction est un autre facteur pouvant influencer la différenciation des kératinocytes. Effectivement, lors de notre étude sur la comparaison de l'effet des facilitateurs de transduction sur la prolifération cellulaire, nous avons observé que le peptide EF-C affectait moins le taux de prolifération des kératinocytes que le polybrène, en plus d'augmenter l'efficacité de transduction des fibroblastes et des kératinocytes (données non présentées). Une autre étude a rapporté les effets négatifs du polybrène sur la prolifération cellulaire (153). Il est connu que les nanofibrilles d'EF-C restent longtemps liées aux cellules et selon les auteurs, les nanofibrilles vont probablement être dégradées dans l'espace intra ou extracellulaire (97). Des observations effectuées au sein de notre laboratoire ont suggéré qu'en culture monocouche, le fait de décoller les cellules à la trypsine après la transduction enlève les facilitateurs de transduction liés aux cellules comme les nanofibrilles d'EF-C. Puisque nos cellules sont détachées à la trypsine avant d'être utilisées pour produire les peaux reconstruites, cela réduit les craintes par rapport à la présence de nanofibrilles d'EF-C dans les peaux reconstruites. Néanmoins, il faudra analyser s'il reste des nanofibrilles d'EF-C dans les tissus reconstruits, par exemple par la technique de microscopie à force atomique (97), et évaluer si la présence de nanofibrilles d'EF-C dans les tissus, le cas échéant, représente un risque pour la santé du patient.

Considérant les risques associés à l'utilisation des promoteurs viraux comme le LTR (106), la prochaine étape pour la poursuite de mon projet serait de transduire le gène *COL7A1* dans des kératinocytes et des fibroblastes en utilisant les conditions que nous avons optimisées ainsi qu'un

vecteur plus sécuritaire. Ainsi, des fibroblastes et des kératinocytes normaux, ces derniers cultivés en monocouche sur une couche nourricière humaine (145), seraient transduits en présence du facilitateur de transduction EF-C pendant six heures d'incubation, avec un vecteur SIN contenant un promoteur physiologique pour contrôler le gène *COL7A1* exogène. Le vecteur SIN est plus sécuritaire, car il a été démontré que son pouvoir activateur de gènes était plus faible qu'avec un vecteur standard (106). La quantification du collagène de type VII produit devra être évaluée et comparée à ces mêmes paramètres de la peau normale humaine. Ces résultats pourront fournir plus d'information par rapport au taux de transduction minimal nécessaire pour que le dépôt du collagène de type VII à la jonction dermo-épidermique soit efficace. Par la suite, le même genre d'expériences que celles effectuées dans le cadre de mon projet, telles que l'essai pour évaluer l'efficacité de formation des colonies (CFE) (données non présentées), la production de peau reconstruite humaine combinée à des analyses histologiques, immunohistochimiques pourront être effectuées. De plus, des analyses ultrastructurales par microscopie électronique à transmission combinées à des marquages à l'aide d'anticorps couplés à l'or dirigés contre l'étiquette HA permettront de confirmer l'intégration du collagène de type VII sous forme de fibrilles d'ancrage.

En thérapie génique, il est important de connaître l'endroit où le gène nouvellement introduit a été intégré pour s'assurer qu'aucune mutation délétère n'a été créée ou que des gènes importants pour l'homéostasie cellulaire n'aient pas été inactivés. Lors de la transduction des cellules par le vecteur rétroviral le nouveau gène s'intègre d'une façon presque aléatoire dans le génome cellulaire. La caractérisation du lieu d'insertion du gène est alors difficile et c'est pour cette raison que des groupes travaillent sur la reconstruction des tissus à partir d'un seul clone issu d'une cellule souche transduite (112). Il faudra déterminer si la peau reconstruite faite à partir des cellules issues d'un seul holoclon aura les caractéristiques équivalentes à la peau reconstruite faite à partir du protocole standard (141). Pour la poursuite du projet, ceci pourrait être évalué en ensemençant sur des dermes reconstruits les kératinocytes transduits issus d'un seul holoclon et en évaluant la maturation des peaux reconstruites résultantes *in vitro* ou *in vivo*, soit après la greffe sur la souris athymique.

Enfin, la dernière étape sera de s'assurer qu'il est possible de transduire le gène d'intérêt au sein des cellules pathologiques, c'est-à-dire celles de patients atteints d'EBDR. Ainsi, les cellules provenant des patients portant l'EBDR seront transduites selon les conditions optimisées et les peaux reconstruites produites seront greffées sur des souris athymiques. La mise à l'épreuve de la résistance de la jonction dermo-épidermique pourra être effectuée en appliquant un stress

mécanique sur la peau reconstruite avant ou après la greffe, par exemple à l'aide d'un ruban adhésif collé et décollé à maintes reprises. Les caractéristiques à long terme des peaux reconstruites greffées et la capacité d'auto-renouvellement de l'épithélium seront évaluées par les techniques décrites ci-dessus (9, 140).

En conclusion, la mise au point de la méthode de transduction des fibroblastes et des kératinocytes avec des conditions de culture adéquates a favorisé la transduction efficace du gène *COL7A1* portant une étiquette HA dans ces cellules tout en ciblant les cellules épithéliales souches. Ainsi, lors de la production des peaux reconstruites par la méthode d'auto-assemblage avec différentes combinaisons des cellules transduites ou non, le collagène de type VII portant l'étiquette HA nouvellement produit a été intégré à la jonction dermo-épidermique des peaux reconstruites. Les analyses histologiques ainsi que la détection de marqueurs de différenciation de la peau par immunofluorescence ont démontré que la qualité des tissus formés était similaire à celle des tissus reconstruits avec des cellules non modifiées génétiquement. Ainsi, l'utilisation de la thérapie génique pour introduire le gène *COL7A1* dans les cellules des patients porteurs de l'EBDR qui serviront à produire de peaux reconstruites à partir de ces cellules a le potentiel de fournir un traitement qui permettra de diminuer ou de faire disparaître la maladie de façon permanente dans les régions greffées permettant ainsi d'améliorer la qualité de vie des patients atteints d'EBDR.

Références

1. Prost-Squarcioni C. Histologie de la peau et des follicules pileux. *Médecine Science* 2006;11:131-7.
2. Boulais N, Misery L. The epidermis: a sensory tissue. *European journal of dermatology : EJD*. 2008;18(2):119-27.
3. Fuchs E. Skin stem cells: rising to the surface. *The Journal of cell biology*. 2008;180(2):273-84.
4. Schaefer HR, T E. Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger ed. Basel 1996. 310 pages p.
5. staff. Bc. Epidermis. In: 2014 MgoBM, editor. *Wikijournal of Medicine* 2014.
6. Fuchs E, Horsley V. More than one way to skin. *Genes & development*. 2008;22(8):976-85.
7. Lavoie A. Localisation, quantification, dynamique et organisation des cellules souches épithéliales cutanées humaines in situ et in vitro. Québec: Université Laval; 2009.
8. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology*. 2000;182(3):311-22.
9. Lavoie A, Fugere C, Beauparlant A, Goyer B, Larouche D, Paquet C, Desgagne M, Sauve S, Robitaille H, Dunnwald M, Kim DH, Pouliot R, Fradette J, Germain L. Human epithelial stem cells persist within tissue-engineered skin produced by the self-assembly approach. *Tissue engineering Part A*. 2013;19(7-8):1023-38.
10. Driskell RR, Watt FM. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. *Trends in cell biology*. 2015;25(2):92-9.
11. Has C, Nystrom A. Epidermal Basement Membrane in Health and Disease. *Curr Top Membr*. 2015;76:117-70.
12. Piaciski A, Larouche D, Bisson F, Ghani K, Caruso M, Germain L. Strategies integrating gene therapy and tissue engineering into the development of treatments for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. . In: Mullins H, editor. *Epidermolysis Bullosa (EB) : Prevalence, Clinical Manifestations and Management Dermatology - Laboratory and Clinical Research*. New York: Nova Publisher inc. ; 2016.
13. Marinkovich MP, Keene DR, Rimberg CS, Burgeson RE. Cellular origin of the dermal-epidermal basement membrane. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 1993;197(4):255-67.
14. Kahari VM, Peltonen J, Chen YQ, Uitto J. Differential modulation of basement membrane gene expression in human fibrosarcoma HT-1080 cells by transforming growth factor-beta 1. Enhanced type IV collagen and fibronectin gene expression correlates with altered culture phenotype of the cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1991;64(6):807-18.
15. Konig A, Bruckner-Tuderman L. Transforming growth factor-beta stimulates collagen VII expression by cutaneous cells in vitro. *The Journal of cell biology*. 1992;117(3):679-85.
16. Aumailley M, Has C, Tunggal L, Bruckner-Tuderman L. Molecular basis of inherited skin-blistering disorders, and therapeutic implications. *Expert reviews in molecular medicine*. 2006;8(24):1-21.
17. Perdoni C, Osborn MJ, Tolar J. Gene editing toward the use of autologous therapies in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2015.

18. McGrath JA, Ishida-Yamamoto A, O'Grady A, Leigh IM, Eady RA. Structural variations in anchoring fibrils in dystrophic epidermolysis bullosa: correlation with type VII collagen expression. *The Journal of investigative dermatology*. 1993;100(4):366-72.
19. Chung HJ, Uitto J. Type VII collagen: the anchoring fibril protein at fault in dystrophic epidermolysis bullosa. *Dermatologic clinics*. 2010;28(1):93-105.
20. Bruckner-Tuderman L, Hopfner B, Hammami-Hauasli N. Biology of anchoring fibrils: lessons from dystrophic epidermolysis bullosa. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 1999;18(1):43-54.
21. Woodley DT, Chen M. Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa: Advances in the Laboratory Leading to New Therapies. *The Journal of investigative dermatology*. 2015;135(7):1705-7.
22. Burgeson RE. Type VII collagen, anchoring fibrils, and epidermolysis bullosa. *The Journal of investigative dermatology*. 1993;101(3):252-5.
23. Fine JD, Eady RA, Bauer EA, Bauer JW, Bruckner-Tuderman L, Heagerty A, Hintner H, Hovnanian A, Jonkman MF, Leigh I, McGrath JA, Mellerio JE, Murrell DF, Shimizu H, Uitto J, Vahlquist A, Woodley D, Zambruno G. The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): Report of the Third International Consensus Meeting on Diagnosis and Classification of EB. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2008;58(6):931-50.
24. Pope E, Lara-Corrales I, Mellerio JE, Martinez AE, Sibbald C, Sibbald RG. Epidermolysis bullosa and chronic wounds: a model for wound bed preparation of fragile skin. *Adv Skin Wound Care*. 2013;26(4):177-88; quiz 89-90.
25. Pope E. Epidermolysis bullosa care in Canada. *Dermatologic clinics*. 2010;28(2):391-2, xiii.
26. Fine JD, Bruckner-Tuderman L, Eady RA, Bauer EA, Bauer JW, Has C, Heagerty A, Hintner H, Hovnanian A, Jonkman MF, Leigh I, Marinkovich MP, Martinez AE, McGrath JA, Mellerio JE, Moss C, Murrell DF, Shimizu H, Uitto J, Woodley D, Zambruno G. Inherited epidermolysis bullosa: updated recommendations on diagnosis and classification. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2014;70(6):1103-26.
27. Carulli S, Contin R, De Rosa L, Pellegrini G, De Luca M. The long and winding road that leads to a cure for epidermolysis bullosa. *Regenerative medicine*. 2013;8(4):467-81.
28. Woodley DT, Hou Y, Martin S, Li W, Chen M. Characterization of molecular mechanisms underlying mutations in dystrophic epidermolysis bullosa using site-directed mutagenesis. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(26):17838-45.
29. Vanden Oever MJ, Tolar J. Advances in understanding and treating dystrophic epidermolysis bullosa. *F1000prime reports*. 2014;6:35.
30. Wertheim-Tysarowska K, Sobczynska-Tomaszewska A, Kowalewski C, Skronski M, Swieckowski G, Kutkowska-Kazmierczak A, Wozniak K, Bal J. The COL7A1 mutation database. *Human mutation*. 2012;33(2):327-31.
31. van den Akker PC, Jonkman MF, Rengaw T, Bruckner-Tuderman L, Has C, Bauer JW, Klaussegger A, Zambruno G, Castiglia D, Mellerio JE, McGrath JA, van Essen AJ, Hofstra RM, Swertz MA. The international dystrophic epidermolysis bullosa patient registry: an online database of dystrophic epidermolysis bullosa patients and their COL7A1 mutations. *Human mutation*. 2011;32(10):1100-7.
32. Wang X, Ghasri P, Amir M, Hwang B, Hou Y, Khalili M, Lin A, Keene D, Uitto J, Woodley DT, Chen M. Topical application of recombinant type VII collagen incorporates into the dermal-epidermal junction and promotes wound closure. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2013;21(7):1335-44.

33. Cutlar L, Greiser U, Wang W. Gene therapy: pursuing restoration of dermal adhesion in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Experimental dermatology*. 2014;23(1):1-6.
34. Reed WB, College J, Jr., Francis MJ, Zachariae H, Mohs F, Sher MA, Sneddon IB. Epidermolysis bullosa dystrophica with epidermal neoplasms. *Archives of dermatology*. 1974;110(6):894-902.
35. Pourreyron C, Chen M, McGrath JA, Salas-Alanis JC, South AP, Leigh IM. High levels of type VII collagen expression in recessive dystrophic epidermolysis bullosa cutaneous squamous cell carcinoma keratinocytes increases PI3K and MAPK signalling, cell migration and invasion. *The British journal of dermatology*. 2014;170(6):1256-65.
36. Fine JD, Johnson LB, Weiner M, Li KP, Suchindran C. Epidermolysis bullosa and the risk of life-threatening cancers: the National EB Registry experience, 1986-2006. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2009;60(2):203-11.
37. Hoste E, Arwert EN, Lal R, South AP, Salas-Alanis JC, Murrell DF, Donati G, Watt FM. Innate sensing of microbial products promotes wound-induced skin cancer. *Nature communications*. 2015;6:5932.
38. Chen M, Kasahara N, Keene DR, Chan L, Hoeffler WK, Finlay D, Barcova M, Cannon PM, Mazurek C, Woodley DT. Restoration of type VII collagen expression and function in dystrophic epidermolysis bullosa. *Nature genetics*. 2002;32(4):670-5.
39. Gache Y, Baldeschi C, Del Rio M, Gagnoux-Palacios L, Larcher F, Lacour JP, Meneguzzi G. Construction of skin equivalents for gene therapy of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Human gene therapy*. 2004;15(10):921-33.
40. Murauer EM, Gache Y, Gratz IK, Klausegger A, Muss W, Gruber C, Meneguzzi G, Hintner H, Bauer JW. Functional correction of type VII collagen expression in dystrophic epidermolysis bullosa. *The Journal of investigative dermatology*. 2011;131(1):74-83.
41. Ahmad RC, Bruckner AL. A survey of epidermolysis bullosa care in the United States and Canada. *Pediatric dermatology*. 2014;31(2):169-75.
42. Grocott P, Blackwell R, Weir H, Pillay E. Living in dressings and bandages: findings from workshops with people with Epidermolysis bullosa. *International wound journal*. 2013;10(3):274-84.
43. Cogan J, Weinstein J, Wang X, Hou Y, Martin S, South AP, Woodley DT, Chen M. Aminoglycosides restore full-length type VII collagen by overcoming premature termination codons: therapeutic implications for dystrophic epidermolysis bullosa. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2014;22(10):1741-52.
44. Titeux M, Pendaries V, Zanta-Boussif MA, Decha A, Pironon N, Tonasso L, Mejia JE, Brice A, Danos O, Hovnanian A. SIN retroviral vectors expressing COL7A1 under human promoters for ex vivo gene therapy of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2010;18(8):1509-18.
45. Paulitschke V, Gerner C, Hofstatter E, Mohr T, Mayer RL, Pehamberger H, Kunstfeld R. Proteome profiling of keratinocytes transforming to malignancy. *Electrophoresis*. 2015;36(4):564-76.
46. Kern JS, Loeckermann S, Fritsch A, Hausser I, Roth W, Magin TM, Mack C, Muller ML, Paul O, Ruther P, Bruckner-Tuderman L. Mechanisms of fibroblast cell therapy for dystrophic epidermolysis bullosa: high stability of collagen VII favors long-term skin integrity. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2009;17(9):1605-15.
47. Murauer EM, Koller U, Pellegrini G, De Luca M, Bauer JW. Advances in Gene/Cell Therapy in Epidermolysis Bullosa. *The Keio journal of medicine*. 2015;64(2):21-5.

48. Remington J, Wang X, Hou Y, Zhou H, Burnett J, Muirhead T, Uitto J, Keene DR, Woodley DT, Chen M. Injection of recombinant human type VII collagen corrects the disease phenotype in a murine model of dystrophic epidermolysis bullosa. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2009;17(1):26-33.
49. Woodley DT, Cogan J, Wang X, Hou Y, Haghighian C, Kudo G, Keene DR, Chen M. De novo anti-type VII collagen antibodies in patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *The Journal of investigative dermatology*. 2014;134(4):1138-40.
50. Tampoia M, Bonamonte D, Filoni A, Garofalo L, Morgese MG, Brunetti L, Di Giorgio C, Annicchiarico G. Prevalence of specific anti-skin autoantibodies in a cohort of patients with inherited epidermolysis bullosa. *Orphanet journal of rare diseases*. 2013;8:132.
51. Pendaries V, Gasc G, Titeux M, Leroux C, Vitezica ZG, Mejia JE, Decha A, Loiseau P, Bodemer C, Prost-Squarcioni C, Hovnanian A. Immune reactivity to type VII collagen: implications for gene therapy of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Gene therapy*. 2010;17(7):930-7.
52. McElroy SP, Nomura T, Torrie LS, Warbrick E, Gartner U, Wood G, McLean WH. A lack of premature termination codon read-through efficacy of PTC124 (Ataluren) in a diverse array of reporter assays. *PLoS biology*. 2013;11(6):e1001593.
53. <https://clinicaltrials.gov> [
54. Woodley DT, Keene DR, Atha T, Huang Y, Lipman K, Li W, Chen M. Injection of recombinant human type VII collagen restores collagen function in dystrophic epidermolysis bullosa. *Nature medicine*. 2004;10(7):693-5.
55. Woodley DT, Wang X, Amir M, Hwang B, Remington J, Hou Y, Uitto J, Keene D, Chen M. Intravenously injected recombinant human type VII collagen homes to skin wounds and restores skin integrity of dystrophic epidermolysis bullosa. *The Journal of investigative dermatology*. 2013;133(7):1910-3.
56. Hou Y, Guey LT, Wu T, Gao R, Cogan J, Wang X, Hong E, Ning WV, Keene D, Liu N, Huang Y, Kaftan C, Tangarone B, Quinones-Garcia I, Uitto J, Francone OL, Woodley DT, Chen M. Intravenously Administered Recombinant Human Type VII Collagen Derived from Chinese Hamster Ovary Cells Reverses the Disease Phenotype in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa Mice. *The Journal of investigative dermatology*. 2015;135(12):3060-7.
57. Bruckner-Tuderman L. Can type VII collagen injections cure dystrophic epidermolysis bullosa? *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2009;17(1):6-7.
58. Kuhl T, Mezger M, Hausser I, Guey LT, Handgretinger R, Bruckner-Tuderman L, Nystrom A. Collagen VII Half-Life at the Dermal-Epidermal Junction Zone: Implications for Mechanisms and Therapy of Genodermatoses. *The Journal of investigative dermatology*. 2016;136(6):1116-23.
59. South AP, Uitto J. Type VII Collagen Replacement Therapy in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa-How Much, How Often? *The Journal of investigative dermatology*. 2016;136(6):1079-81.
60. Hsu CK, Wang SP, Lee JY, McGrath JA. Treatment of hereditary epidermolysis bullosa: updates and future prospects. *American journal of clinical dermatology*. 2014;15(1):1-6.
61. Bruckner-Tuderman L, McGrath JA, Robinson EC, Uitto J. Progress in Epidermolysis bullosa research: summary of DEBRA International Research Conference 2012. *The Journal of investigative dermatology*. 2013;133(9):2121-6.
62. <http://www.asgct.org/general-public/educational-resources>.

63. Wong T, Gammon L, Liu L, Mellerio JE, Dopping-Hepenstal PJ, Pacy J, Elia G, Jeffery R, Leigh IM, Navsaria H, McGrath JA. Potential of fibroblast cell therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *The Journal of investigative dermatology*. 2008;128(9):2179-89.
64. Nagy N, Almaani N, Tanaka A, Lai-Cheong JE, Techanukul T, Mellerio JE, McGrath JA. HB-EGF induces COL7A1 expression in keratinocytes and fibroblasts: possible mechanism underlying allogeneic fibroblast therapy in recessive dystrophic epidermolysis Bullosa. *The Journal of investigative dermatology*. 2011;131(8):1771-4.
65. Uitto J, Christiano AM, McLean WH, McGrath JA. Novel molecular therapies for heritable skin disorders. *The Journal of investigative dermatology*. 2012;132(3 Pt 2):820-8.
66. Uitto J. Cell-based therapy for RDEB: how does it work? *The Journal of investigative dermatology*. 2011;131(8):1597-9.
67. Venugopal SS, Yan W, Frew JW, Cohn HI, Rhodes LM, Tran K, Melbourne W, Nelson JA, Sturm M, Fogarty J, Marinkovich MP, Igawa S, Ishida-Yamamoto A, Murrell DF. A phase II randomized vehicle-controlled trial of intradermal allogeneic fibroblasts for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2013;69(6):898-908 e7.
68. Petrof G, Martinez-Queipo M, Mellerio JE, Kemp P, McGrath JA. Fibroblast cell therapy enhances initial healing in recessive dystrophic epidermolysis bullosa wounds: results of a randomized, vehicle-controlled trial. *The British journal of dermatology*. 2013;169(5):1025-33.
69. Conget P, Rodriguez F, Kramer S, Allers C, Simon V, Palisson F, Gonzalez S, Yubero MJ. Replenishment of type VII collagen and re-epithelialization of chronically ulcerated skin after intradermal administration of allogeneic mesenchymal stromal cells in two patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Cytotherapy*. 2010;12(3):429-31.
70. Petrof G, Lwin SM, Martinez-Queipo M, Abdul-Wahab A, Tso S, Mellerio JE, Slaper-Cortenbach I, Boelens JJ, Tolar J, Veys P, Ofuya M, Peacock JL, Martinez AE, McGrath JA. Potential of Systemic Allogeneic Mesenchymal Stromal Cell Therapy for Children with Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *The Journal of investigative dermatology*. 2015;135(9):2319-21.
71. Wagner JE, Ishida-Yamamoto A, McGrath JA, Hordinsky M, Keene DR, Woodley DT, Chen M, Riddle MJ, Osborn MJ, Lund T, Dolan M, Blazar BR, Tolar J. Bone marrow transplantation for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *The New England journal of medicine*. 2010;363(7):629-39.
72. Tolar J, Wagner JE. Allogeneic blood and bone marrow cells for the treatment of severe epidermolysis bullosa: repair of the extracellular matrix. *Lancet*. 2013;382(9899):1214-23.
73. Kiritsi D, Garcia M, Brander R, Has C, Meijer R, Jose Escamez M, Kohlhasse J, van den Akker PC, Scheffer H, Jonkman MF, del Rio M, Bruckner-Tuderman L, Pasmooij AM. Mechanisms of natural gene therapy in dystrophic epidermolysis bullosa. *The Journal of investigative dermatology*. 2014;134(8):2097-104.
74. Tolar J, McGrath JA, Xia L, Riddle MJ, Lees CJ, Eide C, Keene DR, Liu L, Osborn MJ, Lund TC, Blazar BR, Wagner JE. Patient-specific naturally gene-reverted induced pluripotent stem cells in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *The Journal of investigative dermatology*. 2014;134(5):1246-54.
75. Wenzel D, Bayerl J, Nystrom A, Bruckner-Tuderman L, Meixner A, Penninger JM. Genetically corrected iPSCs as cell therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Science translational medicine*. 2014;6(264):264ra165.
76. Sebastiano V, Zhen HH, Haddad B, Bashkirova E, Melo SP, Wang P, Leung TL, Siprashvili Z, Tichy A, Li J, Ameen M, Hawkins J, Lee S, Li L, Schwertschko A, Bauer G, Lisowski L,

- Kay MA, Kim SK, Lane AT, Wernig M, Oro AE. Human COL7A1-corrected induced pluripotent stem cells for the treatment of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Science translational medicine*. 2014;6(264):264ra163.
77. Sun BK, Siprashvili Z, Khavari PA. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. *Science*. 2014;346(6212):941-5.
 78. Petrova A, Ilic D, McGrath JA. Stem cell therapies for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *The British journal of dermatology*. 2010;163(6):1149-56.
 79. Nevala-Plagemann C, Lee C, Tolar J. Placenta-based therapies for the treatment of epidermolysis bullosa. *Cytotherapy*. 2015;17(6):786-95.
 80. Robbins PD, Tahara H, Ghivizzani SC. Viral vectors for gene therapy. *Trends in biotechnology*. 1998;16(1):35-40.
 81. Rosenberg SA AP, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, Karson EM, Lotze MT, Yang JC, Topalian SL, et al. Gene transfer into humans - immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med* 1990; 30;323(9)::570-8.
 82. Ginn SL, Alexander IE, Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. *The journal of gene medicine*. 2013;15(2):65-77.
 83. Bennett J, Ashtari M, Wellman J, Marshall KA, Cyckowski LL, Chung DC, McCague S, Pierce EA, Chen Y, Bennicelli JL, Zhu X, Ying GS, Sun J, Wright JF, Auricchio A, Simonelli F, Shindler KS, Mingozzi F, High KA, Maguire AM. AAV2 gene therapy readministration in three adults with congenital blindness. *Science translational medicine*. 2012;4(120):120ra15.
 84. Maguire AM, High KA, Auricchio A, Wright JF, Pierce EA, Testa F, Mingozzi F, Bennicelli JL, Ying GS, Rossi S, Fulton A, Marshall KA, Banfi S, Chung DC, Morgan JI, Hauck B, Zeleniaia O, Zhu X, Raffini L, Coppieters F, De Baere E, Shindler KS, Volpe NJ, Surace EM, Acerra C, Lyubarsky A, Redmond TM, Stone E, Sun J, McDonnell JW, Leroy BP, Simonelli F, Bennett J. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*. 2009;374(9701):1597-605.
 85. Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, Rosales C, McIntosh J, Linch DC, Chowdary P, Riddell A, Pie AJ, Harrington C, O'Beirne J, Smith K, Pasi J, Glader B, Rustagi P, Ng CY, Kay MA, Zhou J, Spence Y, Morton CL, Allay J, Coleman J, Sleep S, Cunningham JM, Srivastava D, Basner-Tschakarjan E, Mingozzi F, High KA, Gray JT, Reiss UM, Nienhuis AW, Davidoff AM. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *The New England journal of medicine*. 2011;365(25):2357-65.
 86. Lheriteau E, Davidoff AM, Nathwani AC. Haemophilia gene therapy: Progress and challenges. *Blood Rev*. 2015;29(5):321-8.
 87. Mukherjee S, Thrasher AJ. Gene therapy for PIDs: progress, pitfalls and prospects. *Gene*. 2013;525(2):174-81.
 88. Ortiz-Urda S, Thyagarajan B, Keene DR, Lin Q, Calos MP, Khavari PA. PhiC31 integrase-mediated nonviral genetic correction of junctional epidermolysis bullosa. *Human gene therapy*. 2003;14(9):923-8.
 89. Ortiz-Urda S, Thyagarajan B, Keene DR, Lin Q, Fang M, Calos MP, Khavari PA. Stable nonviral genetic correction of inherited human skin disease. *Nature medicine*. 2002;8(10):1166-70.
 90. Ferrari S, Pellegrini G, Mavilio F, De Luca M. Gene therapy approaches for epidermolysis bullosa. *Clinics in dermatology*. 2005;23(4):430-6.
 91. Verma IM, Somia N. Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature*. 1997;389(6648):239-42.



92. Goto M, Sawamura D, Ito K, Abe M, Nishie W, Sakai K, Shibaki A, Akiyama M, Shimizu H. Fibroblasts show more potential as target cells than keratinocytes in COL7A1 gene therapy of dystrophic epidermolysis bullosa. *The Journal of investigative dermatology*. 2006;126(4):766-72.
93. Baldeschi C, Gache Y, Rattenholl A, Bouille P, Danos O, Ortonne JP, Bruckner-Tuderman L, Meneguzzi G. Genetic correction of canine dystrophic epidermolysis bullosa mediated by retroviral vectors. *Human molecular genetics*. 2003;12(15):1897-905.
94. Siprashvili Z, Nguyen NT, Bezchinsky MY, Marinkovich MP, Lane AT, Khavari PA. Long-term type VII collagen restoration to human epidermolysis bullosa skin tissue. *Human gene therapy*. 2010;21(10):1299-310.
95. Gache Y, Pin D, Gagnoux-Palacios L, Carozzo C, Meneguzzi G. Correction of dog dystrophic epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal autografts. *The Journal of investigative dermatology*. 2011;131(10):2069-78.
96. Woodley DT, Krueger GG, Jorgensen CM, Fairley JA, Atha T, Huang Y, Chan L, Keene DR, Chen M. Normal and gene-corrected dystrophic epidermolysis bullosa fibroblasts alone can produce type VII collagen at the basement membrane zone. *The Journal of investigative dermatology*. 2003;121(5):1021-8.
97. Meier C, Weil T, Kirchhoff F, Munch J. Peptide nanofibrils as enhancers of retroviral gene transfer. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2014;6(5):438-51.
98. Sanber KS, Knight SB, Stephen SL, Bailey R, Escors D, Minshull J, Santilli G, Thrasher AJ, Collins MK, Takeuchi Y. Construction of stable packaging cell lines for clinical lentiviral vector production. *Scientific reports*. 2015;5:9021.
99. Ghani K, Cottin S, Kamen A, Caruso M. Generation of a high-titer packaging cell line for the production of retroviral vectors in suspension and serum-free media. *Gene therapy*. 2007;14(24):1705-11.
100. Ghani K, Wang X, de Campos-Lima PO, Olszewska M, Kamen A, Riviere I, Caruso M. Efficient human hematopoietic cell transduction using RD114- and GALV-pseudotyped retroviral vectors produced in suspension and serum-free media. *Human gene therapy*. 2009;20(9):966-74.
101. Davis HE, Morgan JR, Yarmush ML. Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. *Biophys Chem*. 2002;97(2-3):159-72.
102. Cavazza A, Moiani A, Mavilio F. Mechanisms of retroviral integration and mutagenesis. *Human gene therapy*. 2013;24(2):119-31.
103. Bushman F, Lewinski M, Ciuffi A, Barr S, Leipzig J, Hannenhalli S, Hoffmann C. Genome-wide analysis of retroviral DNA integration. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(11):848-58.
104. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, Clappier E, Caccavelli L, Delabesse E, Beldjord K, Asnafi V, MacIntyre E, Dal Cortivo L, Radford I, Brousse N, Sigaux F, Moshous D, Hauer J, Borkhardt A, Belohradsky BH, Wintergerst U, Velez MC, Leiva L, Sorensen R, Wulffraat N, Blanche S, Bushman FD, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(9):3132-42.
105. Howe SJ, Mansour MR, Schwarzwaelder K, Bartholomae C, Hubank M, Kempinski H, Brugman MH, Pike-Overzet K, Chatters SJ, de Ridder D, Gilmour KC, Adams S, Thornhill SI, Parsley KL, Staal FJ, Gale RE, Linch DC, Bayford J, Brown L, Quaye M, Kinnon C, Ancliff P, Webb DK, Schmidt M, von Kalle C, Gaspar HB, Thrasher AJ. Insertional mutagenesis

- combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(9):3143-50.
106. Zychlinski D, Schambach A, Modlich U, Maetzig T, Meyer J, Grassman E, Mishra A, Baum C. Physiological promoters reduce the genotoxic risk of integrating gene vectors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2008;16(4):718-25.
 107. Wu X, Li Y, Crise B, Burgess SM. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science*. 2003;300(5626):1749-51.
 108. Jackow J, Titeux M, Portier S, Charbonnier S, Ganier C, Gaucher S, Hovnanian A. Gene-Corrected Fibroblast Therapy for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa using a Self-Inactivating COL7A1 Retroviral Vector. *The Journal of investigative dermatology*. 2016.
 109. Peking P, Koller U, Hainzl S, Kitzmueller S, Kocher T, Mayr E, Nystrom A, Lener T, Reichelt J, Bauer JW, Murauer EM. A Gene Gun-mediated Nonviral RNA trans-splicing Strategy for Col7a1 Repair. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2016;5:e287.
 110. Ridgway A, Agbanyo F, Wang J, Rosu-Myles M. Regulatory Oversight of Cell and Gene Therapy Products in Canada. *Advances in experimental medicine and biology*. 2015;871:49-71.
 111. Larcher F, Dellambra E, Rico L, Bondanza S, Murillas R, Cattoglio C, Mavilio F, Jorcano JL, Zambruno G, Del Rio M. Long-term engraftment of single genetically modified human epidermal holoclones enables safety pre-assessment of cutaneous gene therapy. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2007;15(9):1670-6.
 112. Droz-Georget Lathion S, Rochat A, Knott G, Recchia A, Martinet D, Benmohammed S, Grasset N, Zaffalon A, Besuchet Schmutz N, Savioz-Dayer E, Beckmann JS, Rougemont J, Mavilio F, Barrandon Y. A single epidermal stem cell strategy for safe ex vivo gene therapy. *EMBO molecular medicine*. 2015;7(4):380-93.
 113. Larcher F, Del Rio M. Innovative Therapeutic Strategies for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Actas dermo-sifiliograficas*. 2015;106(5):376-82.
 114. Tolar J, McGrath JA. The three-body problem of therapy with induced pluripotent stem cells. *Genome medicine*. 2015;7(1):15.
 115. Paques F, Duchateau P. Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy. *Current gene therapy*. 2007;7(1):49-66.
 116. Stoddard BL. Homing endonucleases: from microbial genetic invaders to reagents for targeted DNA modification. *Structure*. 2011;19(1):7-15.
 117. Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature reviews Genetics*. 2010;11(9):636-46.
 118. Osborn MJ, Starker CG, McElroy AN, Webber BR, Riddle MJ, Xia L, DeFeo AP, Gabriel R, Schmidt M, von Kalle C, Carlson DF, Maeder ML, Joung JK, Wagner JE, Voytas DF, Blazar BR, Tolar J. TALEN-based gene correction for epidermolysis bullosa. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2013;21(6):1151-9.
 119. Laufer BI, Singh SM. Strategies for precision modulation of gene expression by epigenome editing: an overview. *Epigenetics Chromatin*. 2015;8:34.
 120. Carroll D. Genome engineering with targetable nucleases. *Annual review of biochemistry*. 2014;83:409-39.
 121. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF, 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in biotechnology*. 2013;31(7):397-405.
 122. Chamorro C, Mencia A, Almarza D, Duarte B, Buning H, Sallach J, Hausser I, Del Rio M, Larcher F, Murillas R. Gene Editing for the Efficient Correction of a Recurrent COL7A1

- Mutation in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa Keratinocytes. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2016;5:e307.
123. Shinkuma S, Guo Z, Christiano AM. Site-specific genome editing for correction of induced pluripotent stem cells derived from dominant dystrophic epidermolysis bullosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(20):5676-81.
 124. Pellagatti A, Dolatshad H, Valletta S, Boulwood J. Application of CRISPR/Cas9 genome editing to the study and treatment of disease. *Arch Toxicol*. 2015;89(7):1023-34.
 125. Koo T, Lee J, Kim JS. Measuring and Reducing Off-Target Activities of Programmable Nucleases Including CRISPR-Cas9. *Molecules and cells*. 2015;38(6):475-81.
 126. Tolar J, Xia L, Riddle MJ, Lees CJ, Eide CR, McElmurry RT, Titeux M, Osborn MJ, Lund TC, Hovnanian A, Wagner JE, Blazar BR. Induced pluripotent stem cells from individuals with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *The Journal of investigative dermatology*. 2011;131(4):848-56.
 127. Boyce ST, Kagan RJ, Greenhalgh DG, Warner P, Yakuboff KP, Palmieri T, Warden GD. Cultured skin substitutes reduce requirements for harvesting of skin autograft for closure of excised, full-thickness burns. *J Trauma*. 2006;60(4):821-9.
 128. Scuderi N, Annibioletti T, Carlesimo B, Onesti MG. Clinical application of autologous three-cellular cultured skin substitutes based on esterified hyaluronic acid scaffold: our experience. *In vivo*. 2009;23(6):991-1003.
 129. Muffer S, Stark HJ, Amoros M, Falkowska-Hansen B, Boehnke K, Buhring HJ, Marme A, Bickenbach JR, Boukamp P. A stable niche supports long-term maintenance of human epidermal stem cells in organotypic cultures. *Stem cells*. 2008;26(10):2506-15.
 130. Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(8):2302-6.
 131. Germain LL, D.; Auger, F.A.; Fradette, J. Human Post-Natal Stem Cells in Organs Produced by Tissue Engineering for Clinical Applications. In: A. V. Faraday JTD, editor. *Progress in Stem Cell Applications*. New York: Nova Biomedical Books; 2008.
 132. Barrandon Y, Grasset N, Zaffalon A, Gorostidi F, Claudinot S, Droz-Georget SL, Nanba D, Rochat A. Capturing epidermal stemness for regenerative medicine. *Seminars in cell & developmental biology*. 2012;23(8):937-44.
 133. Bell E, Ivarsson B, Merrill C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979;76(3):1274-8.
 134. Bell E, Ehrlich HP, Buttle DJ, Nakatsuji T. Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science*. 1981;211(4486):1052-4.
 135. Berthod F, Hayek D, Damour O, Collombel C. Collagen synthesis by fibroblasts cultured within a collagen sponge. *Biomaterials*. 1993;14(10):749-54.
 136. Hansbrough JF, Morgan JL, Greenleaf GE, Bartel R. Composite grafts of human keratinocytes grown on a polyglactin mesh-cultured fibroblast dermal substitute function as a bilayer skin replacement in full-thickness wounds on athymic mice. *J Burn Care Rehabil*. 1993;14(5):485-94.
 137. Proulx S, Fradette J, Gauvin R, Larouche D, Germain L. Stem cells of the skin and cornea: their clinical applications in regenerative medicine. *Current opinion in organ transplantation*. 2011;16(1):83-9.
 138. Yannas IV, Lee E, Orgill DP, Skrabut EM, Murphy GF. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1989;86(3):933-7.
139. Michel M, L'Heureux N, Pouliot R, Xu W, Auger FA, Germain L. Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair. *In vitro cellular & developmental biology Animal*. 1999;35(6):318-26.
 140. Pouliot R, Larouche D, Auger FA, Juhasz J, Xu W, Li H, Germain L. Reconstructed human skin produced in vitro and grafted on athymic mice. *Transplantation*. 2002;73(11):1751-7.
 141. Larouche D, Paquet C, Fradette J, Carrier P, Auger FA, Germain L. Regeneration of skin and cornea by tissue engineering. *Methods in molecular biology*. 2009;482:233-56.
 142. De Luca M, Pellegrini G, Mavilio F. Gene therapy of inherited skin adhesion disorders: a critical overview. *The British journal of dermatology*. 2009;161(1):19-24.
 143. Mavilio F, Pellegrini G, Ferrari S, Di Nunzio F, Di Iorio E, Recchia A, Maruggi G, Ferrari G, Provasi E, Bonini C, Capurro S, Conti A, Magnoni C, Giannetti A, De Luca M. Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nature medicine*. 2006;12(12):1397-402.
 144. Donati G, Watt FM. Stem Cell Heterogeneity and Plasticity in Epithelia. *Cell stem cell*. 2015;16(5):465-76.
 145. Bisson F, Rochefort E, Lavoie A, Larouche D, Zaniolo K, Simard-Bisson C, Damour O, Auger FA, Guerin SL, Germain L. Irradiated human dermal fibroblasts are as efficient as mouse fibroblasts as a feeder layer to improve human epidermal cell culture lifespan. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(3):4684-704.
 146. Gerlach JC, Johnen C, McCoy E, Brautigam K, Plettig J, Corcos A. Autologous skin cell spray-transplantation for a deep dermal burn patient in an ambulant treatment room setting. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*. 2011;37(4):e19-23.
 147. Gerlach JC, Johnen C, Ottomann C, Brautigam K, Plettig J, Belfekroun C, Munch S, Hartmann B. Method for autologous single skin cell isolation for regenerative cell spray transplantation with non-cultured cells. *Int J Artif Organs*. 2011;34(3):271-9.
 148. Umegaki-Arao N, Pasmooij AM, Itoh M, Cerise JE, Guo Z, Levy B, Gostynski A, Rothman LR, Jonkman MF, Christiano AM. Induced pluripotent stem cells from human revertant keratinocytes for the treatment of epidermolysis bullosa. *Science translational medicine*. 2014;6(264):264ra164.
 149. De Rosa L, Carulli S, Cocchiarella F, Quaglino D, Enzo E, Franchini E, Giannetti A, De Santis G, Recchia A, Pellegrini G, De Luca M. Long-term stability and safety of transgenic cultured epidermal stem cells in gene therapy of junctional epidermolysis bullosa. *Stem cell reports*. 2014;2(1):1-8.
 150. Potten CS. The epidermal proliferative unit: the possible role of the central basal cell. *Cell and tissue kinetics*. 1974;7(1):77-88.
 151. Jones P, Simons BD. Epidermal homeostasis: do committed progenitors work while stem cells sleep? *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(1):82-8.
 152. Lavoie AL, D; Goyer, B; Perreault, I; Genest, H; Duranceau, L; Moulin, V; Auger, A; Germain, L. Autologous tissue-engineered skin preserving epithelial stem cells applied to the permanent coverage of large burn wounds and to skin reconstruction. *JOURNAL OF TISSUE ENGINEERING AND REGENERATIVE MEDICINE*. 2012;Volume: 6 Supplement: 1 (Special Issue: SI):93.
 153. Nanba D, Matsushita N, Toki F, Higashiyama S. Efficient expansion of human keratinocyte stem/progenitor cells carrying a transgene with lentiviral vector. *Stem cell research & therapy*. 2013;4(5):127.

Appendice 1. Strategies integrating gene therapy and tissue engineering into the development of treatments for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa

Chapter 5

**STRATEGIES INTEGRATING GENE THERAPY
AND TISSUE ENGINEERING INTO
THE DEVELOPMENT OF TREATMENTS
FOR RECESSIVE DYSTROPHIC
EPIDERMOLYSIS BULLOSA**

***Angela Dakiw Piaciski¹, Danielle Larouche¹,
Francis Bisson¹, Karim Ghani², Manuel Caruso²
and Lucie Germain¹***

¹Centre de Recherche en organogénèse expérimentale
de l'Université Laval/LOEX, Québec, Canada

²Centre de Recherche sur le cancer de l'Université Laval, Québec, Canada

^{1,2}Centre de Recherche du CHU de Québec-Université Laval,
Québec, Canada

ABSTRACT

Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa (RDEB) is a rare genetic disease caused by mutations in the *COL7A1* gene, which encodes for type VII collagen (COLVII). Secreted into the extracellular space by epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts, COLVII is the main component of anchoring fibrils joining hemidesmosomes of basal keratinocytes to the underlying extracellular matrix. This structure is

required for a functional dermal-epidermal junction and its absence leads to the detachment of the epidermis, and consequently to the formation of blisters. The phenotype of RDEB varies according to the *COL7A1* gene mutation and its severity can range from mild blistering to severe bulla formation, erosions, scarring and mutilations that can be fatal. The development of cutaneous squamous cell carcinoma is also frequent in severe phenotypes. Currently, there is no cure for RDEB.

In order to develop a treatment for this severe disease, different approaches to the delivery of functional COLVII and its relocation to the dermal-epidermal junction have been considered, such as the use of recombinant protein, cell therapy and gene therapy. Progress in tissue engineering now offers new possibilities, such as the integration of gene therapy into tissue-engineered skin using patient stem cells.

This article reviews the main therapies currently under development and focuses on recent advances in approaches combining gene therapy and tissue engineering for treating RDEB.