



HAL
open science

**Nouveaux modèles d'étude de la Granulomatose
Septique Chronique grâce aux cellules souches
pluripotentes induites – Application au développement
de la thérapie protéique**

Julie Brault

► **To cite this version:**

Julie Brault. Nouveaux modèles d'étude de la Granulomatose Septique Chronique grâce aux cellules souches pluripotentes induites – Application au développement de la thérapie protéique. Biologie cellulaire. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT: 2015GREAS020 . tel-01472816

HAL Id: tel-01472816

<https://theses.hal.science/tel-01472816>

Submitted on 21 Feb 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biotechnologie, instrumentation, signal et imagerie pour la biologie, la médecine et l'environnement**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Julie BRAULT

Thèse dirigée par **Madame le Docteur Marie José STASIA**
Co-encadrée par **Monsieur le Professeur Karl-Heinz KRAUSE**

Préparée au sein du **Laboratoire TIMC-IMAG, Equipe TheREx, UMR CNRS 5525**
Dans l'**École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement (EDISCE)**

Nouveaux modèles d'étude de la Granulomatose Septique Chronique grâce aux cellules souches pluripotentes induites – Application au développement de la thérapie protéique

Thèse soutenue publiquement le **17 Décembre 2015**,
devant le jury composé de :

M. le Professeur Jean-Luc LENORMAND

PU, Grenoble, Président

M. le Professeur Hubert DE VERNEUIL

PU-PH, Bordeaux, Rapporteur

M. le Professeur Oliver NUSSE

PU, Paris, Rapporteur

M. le Docteur Jean-François MAYOL

Chief Scientific Officer, Archamps, Examineur

M. le Professeur Karl-Heinz KRAUSE

PU-PH, Genève, Co-encadrant

Mme le Docteur Marie José STASIA

MCU-PH, Grenoble, Directeur de thèse

M. le Docteur Jean-Paul BRION

PH, Grenoble, Invité



Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du Centre Diagnostic et Recherche sur la Granulomatose Septique Chronique (CDiReC) au CHU de Grenoble et de l'équipe TheREx, sous la responsabilité du **Dr Marie José Stasia**. Je tiens à la remercier chaleureusement car sans elle, rien n'aurait été possible. Depuis 4 ans, ses conseils, sa patience et sa capacité à toujours voir le meilleur côté quand je perds mon optimisme m'ont permis de réaliser ce travail et de grandir en tant que chercheuse. Je n'oublie pas non plus ses qualités personnelles que j'apprécie beaucoup. Merci de la chance que vous m'avez donné de participer à ce projet passionnant.

Je remercie très chaleureusement le **Pr Karl-Heinz Krause** d'avoir co-encadré ce travail. Ses conseils nous ont été très précieux pour donner de nouvelles perspectives à ce travail. Grâce à lui et toute son équipe, j'ai découvert l'univers des cellules iPS et je les en remercie.

Je tiens à remercier le **Pr Jean-Luc Lenormand** de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ma Thèse de Science et également pour ses conseils sur le projet de thérapie protéique.

Je remercie très sincèrement le **Pr Hubert De Verneuil** et le **Pr Oliver Nüsse** d'avoir accepté la charge d'être rapporteurs de ce manuscrit. Je leur suis reconnaissante du privilège qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce travail.

Je remercie le **Dr Jean-François Mayol** d'avoir accepté d'être membre du jury et pour son implication dans ce projet, notamment pour ses conseils pour la cytométrie en flux et les souris humanisées. J'en profite également pour remercier toute son équipe à Archamps pour leur accueil toujours chaleureux et leur aide.

Je remercie le **Dr Jean-Paul Brion** qui m'a fait l'honneur pour la seconde fois de participer à mon jury de Thèse, cette fois-ci en tant qu'invité. J'espère que nous continuerons à collaborer sur ce projet dans les années à venir.

Un grand merci à toutes les personnes qui ont participé à ce projet, notamment le Dr Tomo Saric (Université de Cologne, Allemagne) pour la reprogrammation des cellules iPS, les Dr Véronique Satre et Charles Coutton (Laboratoire de Génétique Chromosomique, CHU de Grenoble) pour les analyses génétiques, et Didier Grunwald (CEA) pour les analyses de microscopie confocale.

Merci au Dr Sandra Cortès et Guillaume Vaganay de Synthelis pour leur motivation à fabriquer des protéoliposomes ! J'espère que nous arriverons à finaliser ce travail et, qui sait, un jour on pourra peut-être traiter des patients avec cette thérapie...

Je remercie les Pr Benoît Polack et Bertrand Toussaint de m'avoir accueillie dans l'équipe de recherche TheREx et également pour leur soutien puisque grâce à eux j'ai eu la chance de poursuivre ma Thèse tout en étant Assistante Hospitalo-Universitaire au sein du CHU de Grenoble dans l'Unité Médicale Biochimie des Enzymes et des Protéines. Je suis très honorée de la confiance que vous m'avez témoignée.

Il est à présent temps de remercier ceux qui ont été présents au jour le jour, prêts à m'apporter leur aide, leur soutien, ou des gâteaux pour redonner le moral... Je veux bien entendu parler du labo CDireC : Michèle, Cécile, Lila, Sylvain, Erwan, Pascal, Charlotte, et les nombreux stagiaires... Grâce à vous je me sens parfaitement à ma place ici et je ne voudrais être nulle part ailleurs... J'ai une pensée particulière pour Erwan qui a été un second efficace et très agréable pendant plus de 3 ans avant de partir voguer vers d'autres rivages. Je vous remercie tous pour votre gentillesse et tout ce que vous m'avez appris, et je garderai toujours un merveilleux souvenir de ces années passées à vos côtés...

Merci à tous les membres du BEP : biologistes, techniciens et aides labo qui sont également présents au quotidien et partagent leur bonne humeur. Il a été très agréable de travailler avec vous que ce soit pour le côté hospitalier ou recherche. Je suis très contente d'avoir pu partager ces moments avec vous tous.

Plus loins dans l'espace (Jean Roget ou la pièce de culture cellulaire à côté...), les autres membres de l'équipe TheREx m'ont également apporté leur aide sous forme de conseils de manip, de partage de moments de doutes ou d'admiration sur les cellules iPS ou des séances d'irradiation (je veux notamment citer le Dr David Laurin, Lionel et Benjamin de ProTiPS), un petit verre dans un bar... Un très grand merci au Pr Sophie Park et au Dr Mathieu Meunier pour leur collaboration dans le projet des souris humanisées.

Ils sont tellement nombreux à m'avoir soutenue toutes ces années qu'il faudrait plusieurs pages pour tous les citer... non, en fait j'ai surtout peur d'oublier quelqu'un... cf ma thèse de pharma ;-)

Merci à tous pour les moments de détente, les week-end, les soirées, les cinés,... et pour me supporter quand je parle de mes petites cellules iPS !!

A ma famille qui croit en moi et surtout à mes parents qui m'ont permis d'être celle que je suis et là où je suis aujourd'hui...

A Pierre, qui a vécu cette thèse à mes côtés jour après jour...

Sommaire

Liste des abréviations	1
Listes des figures.....	3
Liste des tableaux	5
Avant-propos.....	6
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	7
CHAPITRE I – La Granulomatose Septique Chronique.....	7
1. Le complexe NADPH oxydase des cellules phagocytaires.....	7
1.1. Les cellules phagocytaires neutrophiles et macrophages.....	7
1.2. Le complexe NADPH oxydase phagocytaire	9
2. La Granulomatose Septique Chronique	13
2.1. Généralités	13
2.2. Génétique.....	14
2.3. Physiopathologie	15
2.4. Le diagnostic de la CGD	17
2.5. Les traitements actuels de la CGD.....	18
2.6. Les modèles cellulaires et animaux de la CGD	22
CHAPITRE II - Les cellules souches iPS, un outil pour la modélisation physiopathologique cellulaire et animale	24
1. Généralités sur les cellules souches pluripotentes induites (iPS)	24
1.1. La reprogrammation en cellules iPS.....	25
1.2. La culture des cellules iPS.....	31
1.3. La caractérisation des cellules iPS	32
1.4. Les applications des cellules souches iPS	33
2. Production de cellules souches/progénéiteurs hématopoïétiques à partir de cellules iPS.....	37
2.1. Les cellules souches hématopoïétiques	37

2.2.	Production de progéniteurs CD34 ⁺ humains à partir de cellules souches pluripotentes humaines (hPSCs)	44
3.	La modélisation physiopathologique de la CGD grâce aux cellules iPS.....	47
3.1.	Production de neutrophiles et macrophages à partir des cellules souches ES et iPS	47
3.2.	Production de neutrophiles et macrophages modélisant la CGD	51
4.	Les souris humanisées	53
4.1.	Humanisation du système immunitaire	54
4.2.	Applications des souris avec un système immunitaire humanisé.....	57
4.3.	Souris avec un système immunitaire humain grâce aux hPSCs	58
CHAPITRE III - La thérapie protéique : vectorisation de protéines membranaires grâce aux protéoliposomes.....		62
1.	Les protéines membranaires chez l'Homme	62
2.	Les systèmes d'expression cellulaires	63
2.1.	Choix du système d'expression : procaryote ou eucaryote ?	63
2.2.	Production de protéines membranaires en systèmes d'expression cellulaires.....	65
3.	Les systèmes d'expression acellulaires	66
3.1.	Description des systèmes d'expression acellulaires.....	67
3.2.	Optimisations de la production des protéines recombinantes.....	69
3.3.	Production de protéines membranaires en systèmes d'expression acellulaires.....	70
4.	Les protéoliposomes : obtention, caractérisation et applications.....	72
4.1.	Obtention des protéoliposomes.....	72
4.2.	Liposomes utilisés.....	73
4.3.	Caractérisation des protéoliposomes.....	76
4.4.	Principales applications des protéoliposomes	78
OBJECTIFS DE LA THESE		81
REVUE SUR LES DESORDRES GENETIQUES ASSOCIES A LA DEFICIENCE EN FRO		82
TRAVAUX DE RECHERCHE.....		85
	Présentation de l'article 1	85

Présentation de l'article 2	88
Génération de souris humanisées à partir de cellules iPS	111
Introduction du travail.....	111
Résultats	113
Matériel et Méthodes	136
Discussion/perspectives	139
CONCLUSION	143
BIBLIOGRAPHIE.....	145
LISTE DES COMMUNICATIONS.....	1788

Liste des abréviations

AA	Acide Ascorbique
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AGM	Aorte - Gonades - Mesonephros
ARN	Acide Ribonucléique
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
BFU	<i>Burst-Forming Unit</i>
BMP4	<i>Bone Morphogenetic Protein-4</i>
CFC	<i>Colony-Forming Cells</i>
CFU	<i>Colony-Forming Unit</i>
CGD	Granulomatose Septique Chronique
CGH	Hybridation Génomique Comparative
CRIPSR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CSH	Cellules Souches Hématopoïétiques
CSPH	Cellules Souches/Progéniteurs Hématopoïétiques
DHR	Dihydrorhodamine
EBs	corps embryoïdes
ES	Cellules souches embryonnaires
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
fMLP	formyl- Méthionine-Leucyl-Phénylalanine
FRO	Formes Réactives de l'Oxygène
FT	Facteurs de Transcription
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
GTP	Guanosine triphosphate
GVHD	Maladie du greffon contre l'hôte
HIS	<i>Humanized Immune System</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
hPSCs	Cellules souches pluripotentes humaines
IFN	Interféron
IL	Interleukine
iPS	Cellules souches pluripotentes induites
kDa	kiloDalton
KO	<i>Knock-Out</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LTC-IC	<i>Long-Term Culture-Initiating Cells</i>
M-CSF	<i>Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
MEFs	Fibroblastes embryonnaires de souris
MGG	May-Grünwald-Giemsa
MO	Moelle osseuse
MPO	Myéloperoxydase
MPT	Modification post-traductionnelle
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NBT	NitroBleu de Tétrazolium

NCF	<i>Neutrophil Cytosolic Factor</i>
NETs	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NOD	<i>Non-Obese Diabetic</i>
NTP	Nucléotides triphosphates
OSKM	Oct3/4, Sox2, Klf4 et c-Myc
OSNL	Oct4, Sox2, Nanog et Lin28
PEG	PolyEthylène Glycol
PCR	Réaction en Chaîne par Polymérase
PM	Poids Moléculaire
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acétate
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SCID	<i>Severe Combined ImmunoDeficiency</i>
SSEA	<i>Stage Specific Embryonic Antigen</i>
SIN	<i>Self-Inactivating</i>
SRC	<i>Scid-Repopulating Cells</i>
TPO	Thrombopoïétine
TALEN	<i>Transcription Activator-Like Effector Nuclease</i>
TGF	<i>Tumor Growth Factor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRA	<i>Tumor Related Antigen</i>
VEGF	<i>Vascular-Endothelial Growth Factor</i>
WT	<i>Wild-Type</i>
ZFN	<i>Zinc Finger Nuclease</i>
ZOPS	Zymosan opsonisé

Listes des figures

Figure 1. Les processus de phagocytose et de production de dérivés toxiques de l'oxygène responsables de la destruction des microorganismes pathogènes développés par les polynucléaires neutrophiles lors d'une infection	8
Figure 2. Le complexe NADPH oxydase au repos et après activation	10
Figure 3. Synthèse, maturation et adressage membranaire du <i>cytb</i> ₅₅₈ dans les neutrophiles.....	12
Figure 4. Les cellules souches chez l'Homme et leur degré de potence au cours du développement humain.....	24
Figure 5. La reprogrammation des fibroblastes en cellules souches pluripotentes induites.....	25
Figure 6. Les évènements séquentiels conduisant à la reprogrammation de cellules différenciées en cellules iPS.	26
Figure 7. Influence du type cellulaire de départ sur la « reprogrammabilité » en cellules iPS.....	27
Figure 8. Les vecteurs utilisés pour la reprogrammation des cellules somatiques humaines en cellules iPS	29
Figure 9. Les applications des cellules iPS humaines.	33
Figure 10. La niche hématopoïétique et l'hématopoïèse	38
Figure 11. Evolution des marqueurs des cellules souches et du potentiel hématopoïétique au cours de l'hématopoïèse.....	41
Figure 12. Principe général des protocoles de différenciation hématopoïétique des cellules souches iPS humaines en neutrophiles et macrophages	48
Figure 13. Les modalités de génération de souris possédant un système immunitaire humain.....	56
Figure 14. Les protéines membranaires chez l'Homme : périphériques et intégrales	62
Figure 15. Les organismes procaryotes et eucaryotes d'expression cellulaire les plus fréquemment utilisés pour la production de protéines recombinantes	63
Figure 16. Les types de systèmes (traductionnel seul ou couplé) et les techniques de production (batch ou <i>continuous exchange cell-free</i> , CECF) en système acellulaire.....	69
Figure 17. La synthèse de protéines membranaires en système acellulaire en présence de différentes sources de lipides.	71
Figure 18. Les principaux lipides utilisés dans la composition des liposomes conventionnels.....	74
Figure 19. La classification des liposomes selon leur taille et leur lamellarité	74
Figure 20. La classification des liposomes selon leur composition et leur application.....	75
Figure 21. Formation des corps embryoïdes et analyse phénotypique et fonctionnelle après 16 jours de culture en présence de cytokines.....	113

Figure 22. Influence des cytokines et de la durée de culture sur la différenciation hématopoïétique dans le système de coculture iPS/OP9.	116
Figure 23. Analyse phénotypique par cytométrie en flux des tératomes iPS à 6 semaines de croissance.	122
Figure 24. Développement des tératomes iPS dans des souris NOD/SCID et analyse phénotypique par cytométrie en flux des cellules issues de ces tératomes.	123
Figure 25. Formation de tératomes iPS/OP9 dans des souris NOD/SCID et analyse phénotypique par cytométrie en flux des cellules issues de ces tératomes	124
Figure 26. Analyse phénotypique par cytométrie en flux des cellules produites à J4, J6 et J8 de coculture iPS/OP9.	126
Figure 27. Analyse phénotypique et potentiel hématopoïétique (test CFC) des cellules issues des EBs J7, ou des EBs J7 cultivés pendant 7 à 14 jours sur les cellules OP9.	128
Figure 28. Analyse phénotypique et fonctionnelle <i>in vitro</i> des cellules CD34 ⁺ isolées à partir des cocultures iPS/OP9 ou MS-5 10 jours en milieu classique (avec sérum) ou sans sérum (milieu HSC et cytokines).	130
Figure 29. Analyse de la prise de greffe à 12 semaines dans le tibia injecté des souris injectées avec des cellules CD34 ⁺ issues des EBs J7 (panels hauts) ou iPS/OP9 J10 (panels bas).	132

Liste des tableaux

Tableau 1. Protocoles de production de neutrophiles à partir des cellules souches pluripotentes murines et humaines.....	49
Tableau 2. Protocoles de production de macrophages à partir des cellules souches pluripotentes murines et humaines.....	50
Tableau 3. Neutrophiles et macrophages modèles de CGD à partir de cellules iPS murines et humaines et développement de nouvelles stratégies de thérapie génique.....	51
Tableau 4. Comparaison des protocoles utilisés pour produire des souris humanisées à partir des cellules ES humaines et des cellules iPS murines et humaines.....	59
Tableau 5. Avantages et inconvénients des principaux systèmes d'expression cellulaires.....	64
Tableau 6. Avantages et inconvénients des principaux systèmes d'expression acellulaires.....	68
Tableau 7. Tableau récapitulatif des caractéristiques des 4 essais de transplantation réalisés.....	134

Avant-propos

Mon travail de thèse s'intéresse à la modélisation cellulaire et animale de la Granulomatose Septique Chronique grâce à la technologie des cellules souches pluripotentes induites afin de développer de nouvelles approches thérapeutiques, et notamment la thérapie protéique basée sur l'utilisation de protéoliposomes.

Le premier chapitre de ce mémoire présentera donc la Granulomatose Septique Chronique. Le mécanisme physiopathologique de cette pathologie ainsi que les traitements actuellement disponibles seront décrits brièvement. Différentes publications issues de mon travail de thèse seront introduites et discutées dans ce manuscrit. La première publication, faisant écho au premier chapitre de l'introduction, est une revue sur l'impact de la déficience de production des dérivés toxiques de l'oxygène en pathologie humaine et plus particulièrement celle due aux mutations géniques des membres de la famille des NADPH oxydases (O'Neill et al., 2015a).

Puis nous aborderons dans un second chapitre la technologie des cellules souches pluripotentes induites, technologie révolutionnaire qui a déjà permis de créer depuis 2006 des modèles cellulaires de maladies rares ou de maladies ne possédant pas préalablement de modèles physiopathologiques. Nous verrons plus en détail les techniques de différenciation hématopoïétique à partir des cellules souches pluripotentes ainsi que leur utilité pour la production de cellules matures neutrophiles et macrophages pour la modélisation physiopathologique de la CGD, et pour la génération de modèles murins dits « humanisés ».

Enfin, le troisième chapitre de cette introduction sera consacré aux protéoliposomes, un outil innovant pour « vectoriser » des protéines membranaires et, dans notre cas, utilisé dans un but thérapeutique. Nous verrons plus particulièrement les moyens de produire *in vitro* des protéines recombinantes, notamment membranaires, et les applications plus générales de ces protéoliposomes.

La partie travail expérimental de ma thèse sera composée de trois parties. La publication consacrée à la modélisation cellulaire de la CGD grâce à la technologie des cellules iPS sera présentée et discutée en première partie (Brault et al., 2014). Puis, une seconde partie sous forme d'un article en rédaction décrira les travaux portant sur la preuve de concept de la thérapie protéique de la CGD grâce aux protéoliposomes. Enfin, des résultats préliminaires correspondant à la production de cellules souches hématopoïétiques pour la génération de souris humanisées grâce aux cellules iPS clôtureront cette partie consacrée aux résultats.

Nous finirons par une conclusion de l'ensemble de ces résultats et par les perspectives futures de ce travail.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I – La Granulomatose Septique Chronique

1. Le complexe NADPH oxydase des cellules phagocytaires

Les phagocytes (neutrophiles, macrophages/neutrophiles, éosinophiles) sont les principaux acteurs de la réponse immunitaire innée non spécifique, et constituent la première ligne de défense de l'hôte contre les microorganismes.

1.1. Les cellules phagocytaires neutrophiles et macrophages

1.1.1. Les neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles représentent près de 50-70 % des leucocytes circulants et possèdent une demi-vie courte dans le sang (environ 5 jours) (Pillay et al., 2010). Près de 10^{11} neutrophiles sont produits par jour, et cette quantité peut s'élever à 10^{12} par jour lors d'une infection. Ils possèdent un noyau polylobé et un cytoplasme contenant quatre types de granules : les granules primaires (ou azurophiles) riches en myéloperoxydase, défensine, élastase, lysozyme..., les granules secondaires (ou spécifiques) contenant principalement de la lactoferrine mais également du cytochrome b_{558} ($cytb_{558}$) et d'autres composés antimicrobiens, les granules tertiaires contenant des métalloprotéases comme la gélatinase MMP9, et enfin les vésicules sécrétoires contenant des protéines/récepteurs destinées à l'expression membranaire (dont le $cytb_{558}$, CD11b, CD16...) ou d'autres molécules sécrétées dans le plasma (Borregaard and Cowland, 1997). Lors d'une infection de l'organisme humain, les pathogènes circulants vont être reconnus comme non-soi par le système immunitaire et donc être opsonisés par différentes molécules dont les immunoglobulines ou les dérivés du complément. Guidés par un gradient de concentration des chimioattractants libérés au site inflammatoire et infectieux [(peptides formylés (fMLP) relargués par les bactéries en destruction, (leucotriène (LT) B_4 , IL-8, fragments du complément C5a)], les neutrophiles circulants vont adhérer à l'endothélium vasculaire par l'intermédiaire d'intégrines. Aidés par une libération de protéases telles que la gélatinase à partir de leurs granules tertiaires, ils traversent la paroi vasculaire par diapédèse et migrent au site infectieux pour neutraliser les pathogènes. Les opsonines (IgG, dérivés du complément C3b) mais également les motifs PAMS (*pathogen-associated molecular pattern*) à la surface des agents pathogènes permettent leur reconnaissance par des récepteurs spécifiques des neutrophiles : récepteurs aux immunoglobulines, aux dérivés du complément et les TLR (*Toll-like receptors*) respectivement. Le processus de phagocytose est alors déclenché, permettant l'englobement intracellulaire des microorganismes (Figure 1). Les différentes granules migrent vers le phagosome avec des cinétiques différentes et forment un phagolysosome dans lequel ils déversent

les molécules lytiques responsables de la digestion du pathogène. Parallèlement à la phagocytose, le complexe NADPH oxydase membranaire est activé (comme nous le verrons plus loin) et produit des dérivés toxiques de l'oxygène également appelés formes réactives de l'oxygène (FRO) responsables de la mort du microorganisme (Mayadas et al., 2014). La formation de NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*) qui consistent en une décondensation de la chromatine associée à une libération d'ADN et de protéines granulaires dans le milieu extracellulaire, va participer également à la défense anti-infectieuse en piégeant et tuant les microorganismes (Brinkmann et al., 2004).

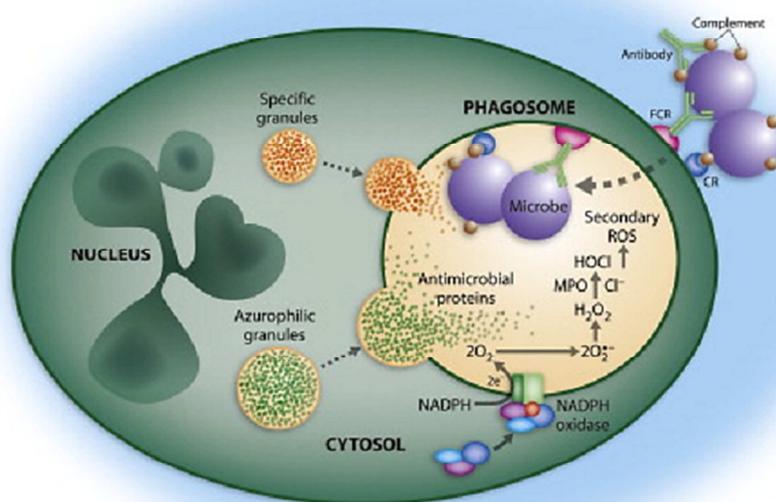


Figure 1. Les processus de phagocytose et de production de dérivés toxiques de l'oxygène responsables de la destruction des microorganismes pathogènes développés par les polynucléaires neutrophiles lors d'une infection. D'après (DeLeo et al., 2009).

1.1.2. Les macrophages

Les macrophages sont issus de la différenciation des monocytes du sang circulant dans les tissus. Ils possèdent une durée de vie de plusieurs mois, ce qui est primordial puisqu'ils permettent alors de protéger le patient d'un risque d'infection quand la production de neutrophiles est interrompue (chimiothérapie, médicaments, transplantation de moelle osseuse...). Comme les neutrophiles, les macrophages vont jouer un rôle important dans la défense immunitaire grâce à la phagocytose des pathogènes et la production de FRO, mais également la modulation de l'immunité par la sécrétion de cytokines, de chimiokines et par leur capacité à présenter l'antigène. De plus, ils vont pouvoir phagocyter les cellules apoptotiques de l'organisme, participant ainsi à la résolution de l'inflammation (Davies et al., 2013). Ils possèdent également une enzyme, la iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) responsable après induction par du LPS et IFN γ (interféron gamma) de la production de NO, dérivé toxique également antimicrobien mais aussi métabolite intermédiaire clé de la signalisation intracellulaire (MacMicking et al., 1997).

Il existe plusieurs types de macrophages : les macrophages M1 dits « activés classiquement », jouant un rôle majeur dans la réponse pro-inflammatoire, et les macrophages M2 dits « activés alternativement », possédant des fonctions immuno-modulatrices et favorisant le remodelage matriciel et la réparation tissulaire. Les macrophages peuvent être polarisés vers le type M1 à la suite d'une exposition à l'IFN γ , ou au TNF α (*tumor necrosis factor*) et LPS, ou vers le type M2 suite à l'exposition au M-CSF (*macrophage-colony stimulating factor*). Il existe 3 sous-types de macrophages M2 : M2a, M2b et M2c respectivement pro-fibrotiques, immunorégulateurs et immunosuppresseurs (Mantovani et al., 2004).

1.2 Le complexe NADPH oxydase phagocytaire

La famille des NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) oxydases chez l'Homme comprend 7 isoenzymes NOX/DUOX (NOX1-5, DUOX1 et DUOX2) qui sont exprimées dans de nombreux types cellulaires et tissus, et qui possèdent des mécanismes d'activation variés ainsi que des rôles biologiques physiologiques spécifiques. Ces enzymes NOX/DUOX sont, entre autres, impliquées dans des mécanismes de synthèse d'hormones, d'oncogénèse, des maladies du système nerveux central, du système cardiovasculaire et du métabolisme (Bedard and Krause, 2007; O'Neill et al., 2015b). Nous nous intéresserons ici uniquement à l'enzyme NADPH oxydase des cellules phagocytaires encore nouvellement appelée et de façon impropre NOX2.

1.2.1 Structure

La NADPH oxydase des phagocytes est un complexe enzymatique composé d'un élément protéique membranaire, le cytochrome b_{558} , élément redox du complexe, formé des deux sous-unités gp91^{phox} (ou NOX2) et p22^{phox}, et de facteurs cytosoliques p40^{phox}, p47^{phox} et p67^{phox} (*phox* = *phagocytic oxydase*) (Figure 2). Des petites protéines G Rac1 et Rac2 participent à la régulation de son activité. Ses différentes sous-unités sont sous forme dissociée dans les phagocytes au repos. Sous forme active, elle est responsable de la production d'anions superoxydes par réduction de l'oxygène moléculaire selon la réaction enzymatique suivante : $2 O_2 + NADPH \rightarrow 2 O_2^- + NADP^+ + H^+$ (Vignais, 2002).

- Le cytochrome b_{558}

La sous-unité NOX2 constitue la sous-unité β (ou chaîne lourde) du cytochrome b_{558} (*cytb₅₅₈*). C'est une protéine fortement glycosylée de 570 acides aminés (PM : 65,3 kDa) composée de 6 hélices transmembranaires situées du côté amino-terminal comportant 2 sites extracellulaires de glycosylation (boucles C et E), de 2 boucles B et D intra-cytoplasmiques, et d'une queue cytosolique carboxy-terminale hydrophile contenant les sites potentiels de fixation du FAD (Flavine Adénine

Dinucléotide) et du NADPH (Figure 2) (Segal et al., 1992; Taylor et al., 1993). Les deux hèmes, liés à 4 histidines situées dans le 3^{ème} (résidus 101 et 115) et le 5^{ème} passage transmembranaire (résidus 209 et 222), sont essentiels au passage électronique du FAD vers l'O₂ extracellulaire (Biberstine-Kinkade et al., 2001).

La sous-unité α du *cytb*₅₅₈, p22^{phox} (ou chaîne légère), est une protéine non glycosylée de 195 acides aminés (PM : 22 kDa). Comme NOX2, sa structure n'est à ce jour pas complètement élucidée. Elle serait formée d'une région N-terminale avec des régions hydrophobes permettant son ancrage dans la membrane plasmique mais le nombre de passages transmembranaires (2 à 4) reste incertain (Burritt et al., 1998; Dahan et al., 2002; Groemping and Rittinger, 2005). Nous avons choisi de faire figurer 2 passages transmembranaires sur la Figure 2. Son expression n'est pas exclusivement restreinte aux cellules phagocytaires puisqu'on la retrouve dans de nombreux tissus associée à d'autres NOX (Bedard et Krause 2007).

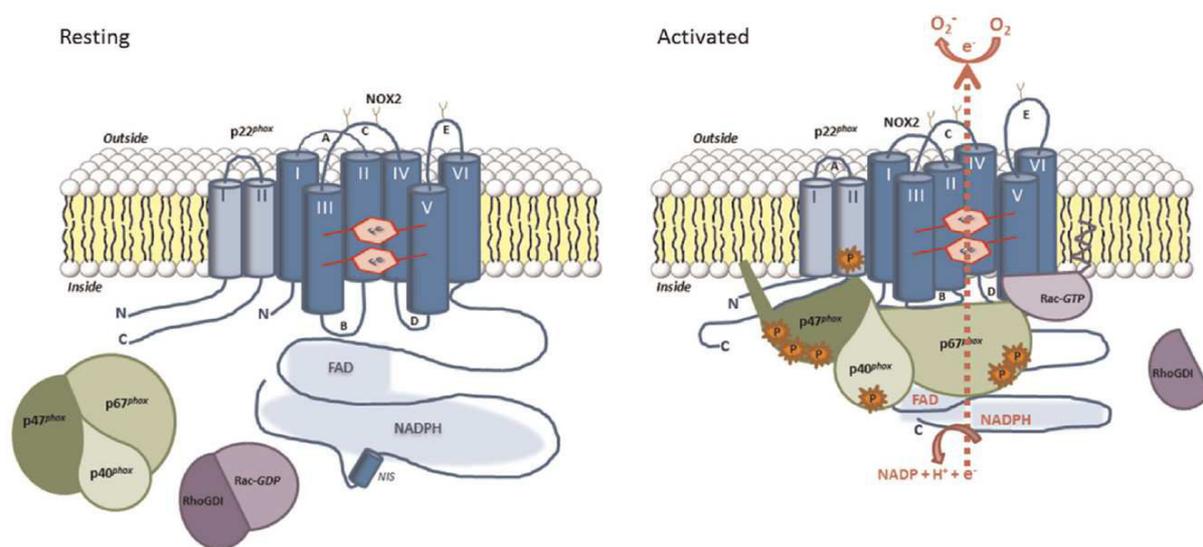


Figure 2. Le complexe NADPH oxydase au repos et après activation. D'après (O'Neill et al., 2015b)

Le *cytb*₅₅₈ doit son nom à ses propriétés spectrales spécifiques. Il peut être détecté et quantifié par son spectre différentiel à partir d'un extrait soluble membranaire. Ce spectre présente deux principaux pics d'absorption aux longueurs d'onde 426 nm et 558 nm (Batot et al., 1998; Stasia et al., 2003). Le *cytb*₅₅₈ a été appelé à l'origine flavocytochrome *b*₂₄₅ à cause des potentiels redox des deux hèmes à -225 mV et -265 mV, résultant en un potentiel moyen de -245 mV à pH 7 (Cross et al., 1995).

▪ Les facteurs cytosoliques

La sous-unité p47^{phox} est une protéine de 390 acides aminés (PM : 44,7 kDa) qui possède un domaine C-terminal riche en résidus arginine et sérine avec 11 sites potentiels de phosphorylation (Volpp et al., 1989). Sous-unité organisatrice, elle permet la migration du complexe cytoplasmique p47^{phox}-

p40^{phox}-p67^{phox} jusqu'au cytb₅₅₈ après activation de la NADPH oxydase (Figure 2) (El-Benna et al., 2009; Marcoux et al., 2010).

La sous-unité p67^{phox} est une protéine de 526 acides aminés (PM : 59,8 kDa) contenant au niveau de sa partie N-terminale un domaine interagissant avec Rac, et également des domaines d'interaction avec p40^{phox}, p47^{phox} et le cytb₅₅₈ (Figure 2) (Dang et al., 2011; Grizot et al., 2001a; Nisimoto et al., 1997; Volpp et al., 1988). Elle est considérée comme « l'activateur » du complexe NADPH oxydase (Han et al., 1998; Paclat et al., 2000).

Dernière sous-unité identifiée (Wientjes et al., 1993), p40^{phox} est une protéine de 339 acides aminés (PM : 39 kDa) interagissant faiblement avec p47^{phox} et p67^{phox} (Figure 2), et dont la fonction régulatrice (activatrice ou inhibitrice) est toujours controversée (Matute et al., 2005).

Rac1/2 appartient à la sous-famille Rho au sein de la superfamille Ras des petites protéines (environ 21 kDa) liant le GTP sous leur forme active (Grizot et al., 2001b). Le cytosol des neutrophiles contient principalement Rac2 (> 96 %). Rac1/2 est nécessaire à la fonction de la NADPH oxydase et se lie exclusivement à p67^{phox} (Sarfstain et al., 2004). L'activation du complexe NADPH oxydase nécessite sa dissociation de rhoGDI au niveau du cytosol et sa liaison au GTP (Figure 2) (Knaus et al., 1991).

1.2.2 La synthèse et la maturation du cytochrome *b*₅₅₈

L'expression de NOX2 dans les neutrophiles est dépendante de la synthèse concomitante de la protéine p22^{phox} et inversement (Parkos et al., 1989). La synthèse des deux sous-unités du cytb₅₅₈ est donc nécessaire pour leur stabilisation mutuelle au niveau de la membrane (Beaumel et al., 2014). Le déroulement normal de l'ensemble des étapes de synthèse et de maturation de NOX2 et p22^{phox} (Figure 3) permet d'obtenir un cytb₅₅₈ membranaire fonctionnel essentiel à l'activité du complexe NADPH oxydase et indispensable pour une réponse immunitaire innée efficace.

La sous-unité NOX2 est tout d'abord synthétisée dans le réticulum endoplasmique sous la forme d'un précurseur non glycosylé de 55-58 kDa environ qui est immédiatement partiellement glycosylé pour donner le précurseur p65^{phox} possédant des chaînes latérales riches en mannose (Figure 3) (Porter et al., 1994). Puis, grâce aux 4 histidines 101, 115, 209 et 222 l'incorporation de deux hèmes par coordination est possible, phénomène indispensable à l'association de p65^{phox}-p22^{phox} (Biberstine-Kinkade et al., 2001). Les monomères p65^{phox} et p22^{phox} non associés seraient très instables et rapidement dégradés par le protéasome (DeLeo et al., 2000). Après incorporation des hèmes et formation du dimère, celui-ci est alors dirigé vers l'appareil de Golgi où NOX2 subit une N-glycosylation au niveau des résidus asparagine Asn¹³², Asn¹⁴⁹, Asn²⁴⁰ (Wallach and Segal, 1997). Les polysaccharides impliqués sont majoritairement du galactose et du N-acétylglucosamine (Harper et al., 1985). Il a été montré que la N-glycosylation n'est pas nécessaire au repliement correct de la

protéine, à son association avec $p22^{phox}$, à son insertion dans la membrane, ni à la génération d'anions superoxydes (Kleinberg et al., 1989; Paclet et al., 2001a).

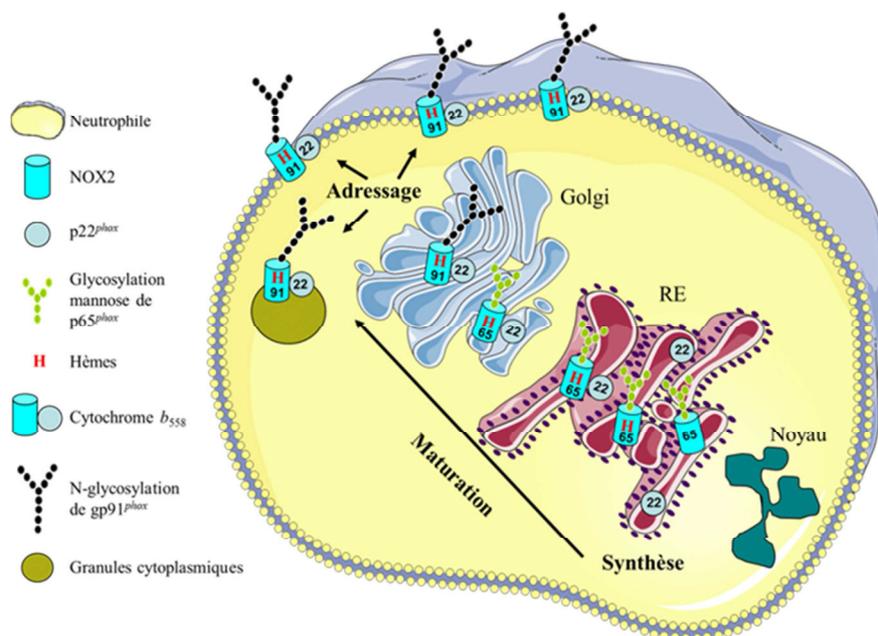


Figure 3. Synthèse, maturation et adressage membranaire du $cytb_{558}$ dans les neutrophiles. D'après le Manuscrit de soutenance du diplôme EPHE de Sylvain Beaumel (TheREx/TIMC, UMR CNRS 5525).

1.1.3. Activation du complexe NADPH oxydase et production de FRO

Dans les cellules au repos, le complexe NADPH oxydase inactif est dissocié et les protéines $p67^{phox}$, $p47^{phox}$ et $p40^{phox}$ forment un complexe dans le cytosol (Figure 2). Lors de la reconnaissance spécifique d'un pathogène ou autre agent stimulant par la cellule phagocytaire, le déclenchement d'une cascade de signalisation intracellulaire conduit à la phosphorylation des facteurs cytosoliques induisant un changement conformationnel. Ils migrent alors vers la membrane plasmique, ou la membrane de la vacuole de phagocytose, pour s'associer au $cytb_{558}$ et former le complexe NADPH oxydase actif (Figure 2) (Segal et al., 2000). Après assemblage du complexe, un transfert électronique du NADPH vers l'oxygène moléculaire est alors possible. Le NADPH cytoplasmique est oxydé en $NADP^+$ au niveau de la queue cytosolique de NOX2 avec transfert de deux électrons vers le FAD puis vers les deux hèmes (liant chacun un atome de fer), et enfin vers l' O_2 qui est réduit en anion superoxyde O_2^- (Figure 2).

La consommation intense d'oxygène associée à cette activation, appelée « burst oxydatif » ou « explosion respiratoire », va conduire à la génération d'une quantité importante d' O_2^- (100 fois plus qu'au repos), un oxydant avec une activité microbicide modérée. Cet anion superoxyde constitue le point de départ de la synthèse des FRO hautement toxiques pour le pathogène. Ainsi, il peut être transformé, soit spontanément soit par la superoxyde dismutase, en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 qui, à son tour, peut être transformé par la myéloperoxydase (MPO) des granules azurophiles en acide

hypochloreux HOCl très toxique (Figure 1). D'autres métabolites peuvent être produits tels que le radical hydroxyle HO[•] hautement réactif ainsi que des oxydants pro-inflammatoires comme l'anion peroxy-nitrite ONOO⁻, le nitryl chloride NO₂Cl et le NO₂⁻. Pour réguler ce système et éviter l'accumulation de dérivés toxiques de l'oxygène dans la cellule comme le peroxyde d'hydrogène, il y a intervention d'enzymes de détoxification comme la catalase qui le réduit en O₂ et en H₂O, et la glutathion peroxydase (Segal et al., 2000).

2. La Granulomatose Septique Chronique

2.1. Généralités

La Granulomatose septique chronique (CGD) est une immunodéficience héréditaire orpheline touchant l'immunité innée et dont les premiers cas ont été rapportés en 1954 chez des jeunes garçons souffrant d'infections récurrentes (Janeway et al., 1954). Cette pathologie a été pour la première fois étudiée par Berendes, Bridges et Good en 1957 et décrite comme une maladie granulomateuse fatale de l'enfance avant 10 ans (Berendes et al., 1957). Elle était définie alors comme un syndrome clinique distinct composé d'une combinaison d'infections récurrentes suppuratives graves, avec formation de granulomes (donnant son nom à cette pathologie) et autres complications inflammatoires (Bridges et al., 1959). Quelques années plus tard, il a été montré qu'il s'agissait d'une maladie des cellules phagocytaires (polynucléaires neutrophiles, éosinophiles, monocytes/macrophages...) impliquées dans la réponse immunitaire non spécifique de l'hôte et causée par le dysfonctionnement du complexe enzymatique NADPH oxydase présent dans ces cellules (Holland, 2010). L'absence de production de FRO microbicides est alors responsable de l'inefficacité des cellules phagocytaires à détruire les agents infectieux, d'où l'apparition d'un tableau clinique sévère qui sera décrit plus loin. De plus, les patients atteints de CGD sont incapables de former des NETs car ce phénomène est dépendant de la NADPH oxydase (Fuchs et al., 2007). La fréquence de cette pathologie est estimée entre 1/200 000 et 1/250 000 naissances par an (van den Berg et al., 2009; Winkelstein et al., 2000) mais peut varier selon les pays et les pratiques ethniques (intermariages). Depuis quelques années, les avancées dans le diagnostic et les traitements de cette pathologie ont permis d'améliorer l'espérance de vie de ces patients (Kang and Malech, 2009; Roos and de Boer, 2014; Seger, 2010a).

2.2. Génétique

La CGD peut être causée par des mutations dans l'un des 5 gènes codant pour les différentes sous-unités du complexe NADPH oxydase. La majorité de ces mutations conduisent à l'absence de la protéine par défaut de synthèse de l'ARNm ou par instabilité de la protéine mutée (tronquée ou malformée). Il existe deux modes de transmission de la maladie : lié à l'X ou autosomique récessif.

2.2.1. La transmission liée à l'X (CGDX)

Représentant 70 % des cas, la CGDX est la forme la plus fréquemment retrouvée (Roos et al., 2010a). Elle est due à des mutations affectant le gène *CYBB* localisé sur le bras court du chromosome X (Xp21.1), composé de 13 exons, et codant pour la sous-unité NOX2 (Royer-Pokora et al., 1986). Comme toutes les pathologies touchant le chromosome X, seuls les garçons sont malades, les femmes étant « vectrices ». Des mutations *de novo* apparaissent dans environ 10 % des cas (Segal et al., 2000).

Il existe trois formes variantes de CGDX selon le taux d'expression de NOX2. La forme CGDX⁰, dans laquelle les deux sous-unités NOX2 et p22^{phox} du *cytb*₅₅₈ sont absentes, est la forme la plus classiquement retrouvée. Des variants très rares de la maladie, CGDX⁺ et CGDX⁻, peuvent également être diagnostiqués (Defendi et al., 2009; O'Neill et al., 2015b; Stasia and Li, 2008). Dans la forme CGDX⁺, la sous-unité NOX2 est produite en quantité normale mais sous forme inactive. A l'inverse, dans la forme CGDX⁻, NOX2 est fonctionnelle mais sous-exprimée, cela pouvant résulter de mutations faux-sens à l'origine d'une perte de la conformation stable de NOX2 ou, plus rarement, de mutations dans le promoteur du gène *CYBB* (Beaumel et al., 2014).

2.2.2. La transmission autosomique récessive (CGDAR)

Il existe quatre formes selon le gène affecté : *NCF1*, *NCF2*, *NCF4* (*NCF* = *neutrophil cytosolic factor*) ou *CYBA* codant respectivement p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} et p22^{phox} (Roos et al., 2010b). Plus rares (30 % des cas de CGD), elles touchent des patients des deux sexes et nécessitent une mutation bi-allélique transmise par chacun des deux parents. C'est pourquoi une consanguinité parentale est souvent observée dans les formes AR (Bakri et al., 2009; Holland, 2010).

Les mutations sur le gène *NCF1*, gène situé sur le bras long du chromosome 7 (7q11.23) et composé de 9 exons (Chanock et al., 2000), sont responsables de la majorité des CGD autosomiques récessives (CDGAR) (environ 20-25 %). Une délétion GT (Δ GT) au début de l'exon 2 est responsable de 95 % des CGDAR47⁰. Elle est causée par des événements recombinautoires avec deux pseudogènes (Ψ *NCF1*) très proches, et elle va entraîner un décalage du cadre de lecture conduisant à l'apparition d'un codon stop prématuré (Görlach et al., 1997).

Situé sur le bras long du chromosome 1q25, le gène *NCF2* codant pour p67^{phox} est composé de 16 exons (Kenney et al., 1993). La forme CGDAR67 représente moins de 5 % des cas de CGD.

La protéine p22^{phox} est codée par le gène *CYBA* localisé sur le bras long du chromosome 16 (16q24) et formé de 6 exons (Dinauer et al., 1990). Moins de 5 % des patients CGD sont touchés par cette forme.

Un seul cas de mutation touchant le gène *NCF4* codant pour p40^{phox} a été rapporté en 2009 (Matute et al., 2009). Ce gène *NCF4* comporte 10 exons et est localisé sur le bras long du chromosome 22 (22q13) (Zhan et al., 1996).

Bien qu'il ne s'agisse pas à proprement parler d'une vraie CGD, deux patients portant une même mutation dominante dans le gène codant la petite protéine Rac2 ont développé un syndrome d'immunodéficience sévère, prouvant bien l'importance de ce composant dans l'activité de l'enzyme NADPH oxydase (Accetta et al., 2011; Ambruso et al., 2000; Williams et al., 2000).

2.3. Physiopathologie

Les patients atteints de CGD vont souffrir généralement avant l'âge de 2 ans d'infections graves à répétition causées par des agents pathogènes opportunistes, associées à des manifestations inflammatoires et avec une très grande diversité des organes atteints. Les formes CGDX, avec un taux de mortalité de 3-5 % par an, sont généralement plus sévères que les formes de transmission autosomique récessive (van den Berg et al., 2009; Kang and Malech, 2009). Il existe des formes découvertes à l'âge adulte (Liese et al., 1996; Cathébras et al., 2001). Il s'agit généralement de formes autosomiques récessives affectant la protéine p47^{phox} (Kuhns et al., 2010) ou des formes liées à l'X de type X⁻ avec une légère production d'anions superoxydes (Stasia and Li, 2008). A cause du rôle important de la sous-unité p67^{phox} dans le fonctionnement du complexe NADPH oxydase, les patients présentant une déficience de cette protéine semblent avoir une mortalité plus élevée que les formes p47^{phox} (van den Berg et al., 2009) qui, elles, ont un taux de mortalité de 1-2 % par an (Roos, 1994). Quelle que soit l'anomalie en cause, il a été montré que la sévérité des complications est liée à la présence ou non d'une activité NADPH oxydase résiduelle qui peut donc servir à prédire la survie des patients CGD (Kuhns et al., 2010).

Les manifestations infectieuses sont induites spécifiquement par des bactéries et des agents fongiques « catalase positive » (qui dégradent l'H₂O₂). Les principaux agents bactériens rencontrés sont *Staphylococcus aureus*, des entérobactéries (*Salmonella*), *Nocardia* spp., *Serratia marcescens*, *Burkholderia cepacia*... Cinquante pour cent des infections retrouvées chez les patients CGD sont d'origine fongique. Les champignons du genre *Aspergillus* sont responsables de 33 % de ces

infections fongiques, avec un fort taux de mortalité s'élevant à 30-40 %, et les champignons du genre *Candida* spp. d'environ 6 % des cas (van den Berg et al., 2009).

Le tableau clinique, complexe avec des atteintes multiviscérales, est très hétérogène d'un patient à l'autre tant dans l'expression que dans la gravité. Des infections pulmonaires sont présentes dans près de 70 % des cas : aspergilloses pulmonaires invasives dues à *Aspergillus* spp. chez 1/3 des patients, représentant la première cause de décès des patients CGD, mais également pneumonies dues à *B. cepacia*, *S. aureus*, *Nocardia* spp. La peau est le second site le plus fréquent d'infections : abcès, acné ou lésions eczématiformes principalement dus à *S. aureus*. Des BCGites apparaissent dans environ 8 % des cas après vaccination par le Bacille Calmette-Guérin (BCG) (van den Berg et al., 2009). Des atteintes des ganglions lymphoïdes (lymphadénites) sont souvent dues à *S. aureus*, mais il existe également des formes de lymphadénites nécrosantes graves causées par *Granulibacter bethesdensis*, un pathogène émergent récemment identifié (Greenberg et al., 2006; López et al., 2008). Des abcès récurrents du foie dus à *S. aureus* dans 90 % des cas surviennent chez 35 % des patients (Holland, 2010). Enfin, des infections osseuses, des septicémies, ou d'autres atteintes comme des sinusites, otites, abcès dentaires, infections neuroméningées (bien que rares) peuvent également être retrouvées (van den Berg et al., 2009).

Ces infections bactériennes et fongiques sévères et répétitives s'accompagnent d'une réponse inflammatoire persistante dérégulée et surtout exagérée, entraînant des manifestations cliniques telles qu'ulcérations de la peau, colites, formation de granulomes (50 % des patients), maladies auto-immunes... Les foyers inflammatoires de type granulomateux sont formés de cellules géantes, multinucléées, résultant de la fusion de macrophages ayant phagocyté des bactéries mais ne les ont pas détruites. Ils ont généralement une taille de quelques millimètres mais peuvent parfois être plus importants, évoquant un tableau pseudotumoral. Ils sont même parfois suffisamment larges pour provoquer des obstructions, notamment dans le tractus gastro-intestinal et plus rarement dans le système génito-urinaire ou la rétine (Holland, 2010). Les manifestations auto-immunes observées chez les patients CGD sont de type lupus érythémateux systémique, lupus discoïde, thrombocytopénie idiopathique, ou maladie inflammatoire de l'intestin (1/3 des patients) pouvant être confondue avec une maladie de Crohn (Seger, 2010b).

Les femmes vectrices de la forme CGDX ne présentent généralement pas de manifestations infectieuses sévères lorsque leur activité NADPH oxydase est normale (20 à 80 % d'activité). Cependant, des manifestations auto-immunes de type lupus sont fréquemment retrouvées, ou également des stomatites aphteuses, des rashes photosensitifs, des manifestations intestinales (Battersby et al., 2013). Dans des cas extrêmement rares, lorsqu'il y a une inactivation importante du

chromosome X sain chez certaines mères vectrices, les manifestations cliniques peuvent être très sévères (Wolach et al., 2005). A l'inverse, les porteurs des formes CGDAR sont asymptomatiques.

2.4. Le diagnostic de la CGD

2.4.1. Diagnostic fonctionnel

La confirmation du diagnostic de la CGD est réalisée par mesure de l'activité NADPH oxydase des neutrophiles purifiés à partir d'un prélèvement de sang total. Il repose sur des tests mesurant l'activité de la NADPH oxydase des neutrophiles activés par différents agents solubles (phorbol-12-myristate-13-acétate (PMA), fMLP) ou particuliers (zymosan, billes de latex, *S. aureus* opsonisé...).

Le test le plus ancien est le test de réduction du nitrobleu de tétrazolium (NBT) sur lame. La production d'anions superoxyde après activation de la NADPH oxydase va réduire le NBT de couleur jaune en un précipité insoluble de formazan pourpre/noir. La proportion de neutrophiles ayant réduit ou non le NBT est alors déterminée. Actuellement, l'oxydation de la sonde dihydrorhodamine 123 (DHR123) fluorescente par la production de H₂O₂, mesurée par cytométrie de flux, tend à remplacer l'utilisation du test de réduction du NBT car cette technique plus rapide nécessite un nombre très faible de cellules et est aussi quantitative. Ces deux tests permettent de poser immédiatement le diagnostic de CGD et également de détecter les femmes vectrices de la forme CGDX (2 populations distinctes de phagocytes : l'une possédant une oxydase positive et l'autre avec une oxydase négative) (Ochs and Igo, 1973; Vowells et al., 1995). Le test DHR permet en plus de suivre efficacement le chimérisme après transplantation de moelle osseuse (CSH) (Kim et al., 2013).

2.4.2. Diagnostic biochimique

Le diagnostic de la forme de CGD repose sur l'identification de la protéine mutée manquante. Ce diagnostic a longtemps été réalisé par immunodétection (Western Blot) grâce à des anticorps spécifiquement dirigés contre les différentes protéines du complexe oxydase (Stasia et al., 2009), mais de nouvelles techniques de diagnostic, notamment par cytométrie en flux, permettent de détecter plus rapidement les sous-unités de la NADPH oxydase dans les neutrophiles (Defendi et al., 2009; Wada et al., 2013; Yamauchi et al., 2001).

2.4.3. Diagnostic génétique

Les tests fonctionnels et biochimiques décrits ci-dessus permettent la détermination de la sous-unité déficiente et orientent donc vers le gène impliqué. La recherche de la mutation responsable peut alors se faire sur l'ADNc voire directement sur l'ADNg après PCR et séquençage. Identifier la mutation n'est pas nécessaire pour la prise en charge du patient mais permet d'identifier les porteurs apparentés (formes AR) ainsi que les femmes vectrices (forme CGDX), est utile au conseil génétique

dispensé à la famille par le médecin et permet aussi de proposer un diagnostic prénatal lors d'une future grossesse.

Il existe d'autres techniques permettant d'analyser la présence du *cytb₅₅₈* et l'activité du complexe NADPH oxydase mais celles-ci seront abordées dans la présentation de l'Article 1 (Brault et al., 2014).

2.5. Les traitements actuels de la CGD

La prise en charge thérapeutique est la même quelle que soit la forme de CGD. Elle repose sur une chimioprophylaxie antimicrobienne tout au long de la vie et nécessite une bonne compliance des patients, associée au traitement des infections aiguës. Depuis le 1^{er} cas décrit en 1954, les prophylaxies antibiotique et antifongique associées ou non à un traitement par interféron gamma ont permis d'améliorer la survie des patients (Marciano et al., 2015; Martel et al., 2012). La transplantation de cellules CSH non modifiées issues de la moelle osseuse ou du sang de donneur sain reste actuellement le seul traitement curatif. Cependant il n'est pas sans danger dans un contexte d'infections en terrain inflammatoire (Szabolcs et al., 2010).

2.5.1. La chimioprophylaxie

Prophylaxie antibactérienne

La prophylaxie antibactérienne préconisée en 1^{ère} intention est l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole (TMP-SMX) car son spectre d'activité est actif contre la plupart des pathogènes bactériens fréquemment rencontrés (bactéries Gram + et -). Son utilisation a permis de réduire le taux d'infections bactériennes sévères d'au moins 50 % chez les patients CGD (Goldblatt, 2002; Seger, 2008).

Prophylaxie antifongique

Le médicament antifongique de choix est l'itraconazole (Stasia et al., 2009). La grande efficacité de l'itraconazole notamment contre les infections dues à *Aspergillus* spp. a permis de réduire l'incidence des infections fongiques aussi bien superficielles que plus graves comme les aspergilloses pulmonaires invasive (Gallin et al., 2003). Généralement bien toléré, il peut cependant être responsable d'insuffisance rénale progressive (cas pour un patient diagnostiqué à Grenoble et traité pendant plusieurs années). Depuis quelques années, des souches d'*A. fumigatus* résistantes aux azolés (itraconazole, voriconazole et sensibilité diminuée au posaconazole) ont émergé (Hodiamont et al., 2009; Sfaihi et al., 2013).

Interféron γ

Les premiers essais d'utilisation *in vitro* et *in vivo* de l'IFN γ ont montré que cette cytokine immunomodulatrice aux propriétés antivirale, antimicrobienne et antitumorale pouvait restaurer

partiellement l'activité de la NADPH oxydase et améliorer l'activité bactéricide des neutrophiles et monocytes circulants. Utilisée depuis les années 1990 par certaines équipes, son efficacité est encore controversée (Ezekowitz et al., 1988; International Chronic Granulomatous Disease Cooperative Study Group, 1991; Jackson et al., 2001; Woodman et al., 1992). Ainsi, en raison de ces résultats contradictoires, du coût et des modalités d'administration contraignantes, l'utilisation de l'IFN γ est proposée uniquement aux patients qui, malgré la prophylaxie antimicrobienne, développent des infections sévères (Seger, 2008; Stasia et al., 2009).

2.5.2. Traitement des épisodes infectieux aigus

Le traitement des infections aiguës au cours de la CGD repose sur l'antibiothérapie, les antifongiques, la chirurgie, l'utilisation de corticostéroïdes et, exceptionnellement, la transfusion granulocytaire.

Antibiothérapie

Initialement probabiliste, l'antibiothérapie doit être « agressive » et couvrir un large spectre de bactéries. La ciprofloxacine en intraveineux est ainsi l'antibiotique le plus utilisé en 1^{ère} ligne. Il peut être associé à la vancomycine ou à la teicoplanine pour assurer une meilleure couverture des cocci à gram +. Une fois l'agent infectieux identifié, le traitement est ajusté pour s'adapter aux résultats de l'antibiogramme (Goldblatt, 2002; Seger, 2008).

Antifongiques

En plus de son utilisation en prophylaxie, l'itraconazole est devenu le traitement antifongique de référence. Les triazolés de seconde génération (voriconazole, posaconazole et caspofungine) ont montré leur efficacité pour les infections fongiques invasives (notamment dues à *Aspergillus*) réfractaires aux traitements de référence (Goldblatt, 2002; Segal et al., 2005; Walsh et al., 2002).

Chirurgie

Des gestes chirurgicaux sont parfois nécessaires chez les patients CGD dans les cas d'obstruction ou de lésions granulomateuses et suppuratives, et notamment pour le drainage percutané et/ou l'excision chirurgicale d'abcès, comme par exemple les abcès du foie (Lublin et al., 2002).

Corticothérapie

Les corticostéroïdes comme la prednisolone permettent de maîtriser assez efficacement les désordres inflammatoires et complications obstructives rencontrés chez les patients CGD. Mais à long terme, ils peuvent entraîner des complications telles que retard de croissance, ostéoporose et risque infectieux (Holland, 2010). Dans certains cas d'abcès du foie récurrents et réfractaires à la chirurgie, la corticothérapie peut être la seule alternative (Leiding et al., 2012). En cas de colites réfractaires, la corticothérapie est associée à d'autres molécules comme l'azathioprine (Seger, 2010a; Zanditenas et al., 2004), la ciclosporine (Rosh et al., 1995; Segal et al., 2000) ou des inhibiteurs du

TNF α (thalidomide, anticorps monoclonaux bloquant le TNF α comme l'infliximab) (Deffert et al., 2011; Sokol et al., 2009).

Transfusion de globules blancs

Lors des 20 dernières années, de nombreux cas reportés dans la littérature ont montré l'intérêt de la transfusion de globules blancs dans le cas d'infections bactériennes et fongiques sévères mettant en jeu le pronostic vital et résistant aux traitements ainsi qu'à la chirurgie (Bielorai et al., 2000; Buescher and Gallin, 1982; Fanconi et al., 1985; Stasia et al., 2013). Ces transfusions sont généralement bien tolérées mais des effets secondaires peuvent apparaître (Stroncek et al., 1996). Le risque d'allo-immunisation (rencontré chez 78 % des patients) ainsi que la réaction de greffon contre l'hôte (GVHD) sont notamment à prendre en compte pour les patients susceptibles de recevoir dans le futur une transplantation de moelle osseuse allogénique (Heim et al., 2011). Cette thérapeutique controversée tend à disparaître mais peut cependant rester un traitement de dernier recours dans le cas où toutes les autres options thérapeutiques ont échoué.

2.5.3. Transplantation de moelle osseuse/cellules souches hématopoïétiques (CSH)

Depuis les 1^{ère} transplantations de moelle osseuse allogénique à partir de 1976 (Goudemand et al., 1976; Rappeport et al., 1982), les modalités des transplantations ont progressivement évolué et ont permis d'améliorer l'efficacité de la greffe. Plus de 100 transplantations ont ainsi été réalisées avec succès : la grande majorité d'entre elles avec des donneurs apparentés (issus de la même famille, généralement un membre de la fratrie) (Kang et al., 2011a) mais, depuis quelques années, des transplantations à partir de donneurs HLA-compatibles non apparentés ont également donné d'excellents résultats (Goździk et al., 2011; Güngör et al., 2005; Hasegawa et al., 2008; Martinez et al., 2012; Schuetz et al., 2007; Soncini et al., 2009), ainsi que la transplantation de cellules souches issues de sang de cordon après conditionnement myéloablatif ou réduit (Bhattacharya et al., 2003; Jaing et al., 2010; Lin et al., 2013; Mochizuki et al., 2009; Parikh et al., 2007; Tewari et al., 2012).

Le traitement conventionnel du receveur a longtemps été myéloablatif et reposait sur l'utilisation du busulfan à forte dose (Seger et al., 2002) mais cela entraînait une forte morbidité des patients CGD fragiles. Des études ont montré qu'un conditionnement réduit subablatif chez des patients CGD à haut risque était très efficace et donc prometteur (Güngör et al., 2005, 2014). La dernière étude de Güngör *et al.* a d'ailleurs montré un taux de survie de 93 % des patients avec un chimérisme stable sur un suivi de 21 mois, aucun évènement infectieux n'étant apparu pendant la période de suivi chez 89 % d'entre eux (Güngör et al., 2014).

Ainsi, la transplantation de CSH, qui était réservée dans le passé à des cas particulièrement sévères dans l'enfance et chez des patients pour lesquels il existe un donneur HLA-compatible, pourrait être

étendue à d'autres types de patients et réalisée dès que possible dans le but de prévenir les complications futures (Åhlin and Fasth, 2015).

2.5.4. Thérapie génique

Pour les patients réfractaires au traitement chimioprophylactique et pour lesquels il n'existe aucune compatibilité HLA, ne pouvant donc pas bénéficier de transplantation de CSH, la thérapie génique pourrait être une option thérapeutique intéressante. En effet, la CGD est une cible de choix pour cette thérapie : un seul gène est atteint, la cible est une cellule circulante exclusivement et non tissulaire, il existe des modèles cellulaires et animaux pour effectuer des essais précliniques, et la correction d'environ 1-5 % des phagocytes circulants est suffisante pour procurer une protection efficace (Kang and Malech, 2009).

Chez l'Homme, les trois premiers essais de phase I ont été réalisés aux USA à partir des années 1995 sans conditionnement de patients CGDX et CGDAR47 : des injections répétées de cellules CD34⁺ corrigées à l'aide d'un vecteur gammarétroviral ont montré un bénéfice clinique seulement transitoire (6 mois) et un taux faible de neutrophiles corrigés circulants (< 1 %) (Barese et al., 2004; Malech et al., 1997, 2004). Dans une étude menée entre 2000 et 2010 dans 5 centres, l'utilisation d'un conditionnement subablatif chez les patients a permis d'améliorer le taux de neutrophiles corrigés circulants (5-25 %) et donc de résoudre les infections, mais la présence de neutrophiles corrigés n'a été que transitoire (*silencing* du transgène) ; et plusieurs patients ont présenté un syndrome myélodysplasique avec monosomie 7 à cause de l'insertion du vecteur rétroviral dans des oncogènes (Bianchi et al., 2009; Grez et al., 2011; Kang et al., 2010, 2011b; Ott et al., 2006; Stein et al., 2010). La délétion de séquences *enhancers* du LTR (*Long terminal repeat*) a permis le développement de nouveaux vecteurs appelés SIN (*Self Inactivating Vector*) qui présentent un risque réduit d'insertion mutagénique ou de transactivation de proto-oncogènes, ainsi qu'une réduction du *silencing* du transgène. Ces nouveaux vecteurs, de type lentivirus (Naumann et al., 2007; Roesler et al., 2002; Santilli et al., 2011), gammarétrovirus (Stein et al., 2013) ou alpharétrovirus (Kaufmann et al., 2013), se sont révélés efficaces en phase préclinique de développement pour la correction prolongée des neutrophiles circulants. En parallèle, l'utilisation de « codons optimisés » permet également l'amélioration de l'expression de la protéine codée (NOX2 dans ce cas) (Kaufmann et al., 2013; Moreno-Carranza et al., 2009).

Ainsi, deux nouveaux essais cliniques de phase I/II sont actuellement en cours sur des patients CGDX. Le 1^{er} essai, se déroulant en Allemagne, réalise la correction génétique à l'aide d'un vecteur SIN gammarétroviral (NCT01906541). Le second essai est multicentrique (France, Allemagne, Angleterre et Suisse), coordonné par le Généthon et financé par le Consortium Européen Net4CGD (NCT01855685). La fin de ce second essai est prévue en 2017, et utilise un lentivirus SIN avec un

promoteur spécifiquement myéloïde pour restreindre l'expression du transgène uniquement aux cellules cibles des patients CGDX (Santilli et al., 2011; 2015).

L'obstacle majeur limitant le succès de la thérapie génique dans le cadre de la CGD est l'absence d'avantage sélectif de croissance des cellules corrigées qui leur permettrait de survivre et remplacer *in vivo* les cellules non corrigées (Stein et al., 2006). Mais de nombreuses pistes sont actuellement explorées pour maîtriser des risques mutagènes liées à l'utilisation de vecteurs viraux ainsi que pour améliorer la reconstitution d'un taux de neutrophiles fonctionnels suffisant pour assurer une protection du patient, et leur persistance à long terme chez celui-ci (Grez et al., 2011; Kang and Malech, 2012; Kaufmann et al., 2014). Cependant, bien que la thérapie génique soit novatrice et prometteuse, elle reste lourde à mettre en place, coûteuse et non dénuée de risques pour le patient.

2.6. Les modèles cellulaires et animaux de la CGD

2.6.1. Les modèles cellulaires

La lignée promyélocytaire PLB-985 a été établie en 1987 à partir de cellules du sang périphérique d'une patiente atteinte de leucémie aiguë myéloïde en phase de rechute. Les cellules PLB-985 sont des myélomonoblastes pouvant facilement être différenciés *in vitro* en neutrophiles ou en monocytes/macrophages matures par des agents chimiques inducteurs (Tucker et al., 1987), cette différenciation étant accompagnée d'une augmentation de l'expression des composants de la NADPH oxydase même si son activité est 10 fois moins importante que celle des neutrophiles (Pedruzzi et al., 2002). Même si morphologiquement les PLB-985 différenciés ressemblent à des neutrophiles, ils ne possèdent que les granules primaires azurophiles et ont un pouvoir de phagocytose relativement limité (Pivot-Pajot et al., 2010). Une lignée PLB-985 *knock-out* (KO) pour le gène *CYBB* a été créée en 1993 par l'équipe du Pr Mary Dinayer, ce qui permet ainsi de modéliser des pseudo-neutrophiles CGDX⁰ (Zhen et al., 1993) et d'étudier la relation structure-activité de l'enzyme NADPH oxydase (Debeurme et al., 2010; Picciocchi et al., 2011).

Les lymphocytes B possèdent une enzyme NADPH oxydase fonctionnelle capable de générer des anions superoxyde après activation même si cette activité est 100 fois plus faible que celle des neutrophiles (Maly et al., 1988). L'immortalisation des lymphocytes B de patients CGD par le virus d'Epstein Barr (EBV) a permis d'obtenir des lignées lymphoblastoïdes LB-EBV pérennes très utiles pour le diagnostic génétique de la CGD (Stasia et al., 2005), l'étude du *cytb*₅₅₈ (Palet et al., 2001a; Volkman et al., 1984) et les premiers essais de thérapie génique (Thrasher et al., 1992).

Des cellules CD34⁺ issues de la moelle osseuse ou du sang périphérique de patients CGDX, CGDAR22, CGDAR47 ou CGDAR67 ont été très utilisées pour les essais de thérapie génique visant à démontrer l'efficacité de la correction génétique. Les cellules phagocytaires matures (neutrophiles et

monocytes) différenciées *in vitro* à partir de ces cellules CD34⁺ corrigées sont fonctionnelles et produisent des anions superoxyde (Li et al., 1994; Sekhsaria et al., 1993; Weil et al., 1997).

Cependant, tous les modèles cités restent un pâle modèle des cellules phagocytaires, surtout des neutrophiles (pseudo-neutrophiles), cellule sophistiquée de par la complexité de sa morphologie et de ses multiples fonctions.

2.6.2. Les modèles animaux

En 1995, l'équipe du Pr Mary Dinuer a généré un modèle murin CGDX par recombinaison homologue au niveau du gène *CYBB* sur le chromosome X des cellules souches embryonnaires murines (Pollock et al., 1995). Les souris mâles hémizygotés CGDX présentent un phénotype similaire à celui retrouvé chez les patients humains CGDX c'est-à-dire l'absence de la sous-unité NOX2, l'incapacité à produire des FRO et une susceptibilité accrue aux infections bactériennes et fongiques.

Des souris p47^{phox/-} ont également été développées en utilisant une technique basée, comme pour les souris NOX2^{-/-}, sur la recombinaison homologue (Jackson et al., 1995). Comme chez les patients CGDAR47, ces souris développent spontanément des infections sévères et leur réponse inflammatoire est excessive et dérégulée avec développement de granulomes aux sites d'infection.

Récemment créée par le laboratoire Jackson par insertion d'une mutation dans le gène *CYBA*, la lignée murine nmf333 représente le 1^{er} modèle animal de la forme CGDAR22 (Nakano et al., 2008). Ces souris présentent un phénotype particulier associant les signes cliniques de CGD et des anomalies sévères de l'équilibre. En effet, la protéine p22^{phox} est associée à NOX3 au niveau de l'oreille interne et impliquée dans la formation des cristaux d'otoconie indispensables à l'équilibre et à la coordination motrice et vestibulaire (Bánfi et al., 2004). La mutation dans le gène *CYBA* conduit à l'absence de p22^{phox} et donc du complexe NOX3/p22^{phox}. Le *cytb*₅₅₈ est également absent (pas de NOX2/p22^{phox}) résultant en un défaut de production d'anions superoxydes. Ce modèle a permis d'étudier la sensibilité à l'infection pulmonaire au pathogène *Burkholderia cepacia* (Nakano et al., 2008).

Ces modèles murins sont très utiles pour l'étude de la physiopathologie de la CGD lors d'infections par des pathogènes spécifiques ainsi que le développement de traitements comme la thérapie génique (Fernandez-Boyanapalli et al., 2010; Fujita et al., 2010; Zelazny et al., 2009). Cependant, à ce jour, aucun modèle animal mimant les formes génétiques CGDAR67 et CGDAR40 ne sont disponibles.

CHAPITRE II - Les cellules souches iPS, un outil pour la modélisation physiopathologique cellulaire et animale

1. Généralités sur les cellules souches pluripotentes induites (iPS)

Chez l'Homme, il existe différents types de cellules souches qui vont apparaître pendant le développement depuis l'embryon au stade 1 cellule jusqu'au stade adulte (Figure 4).

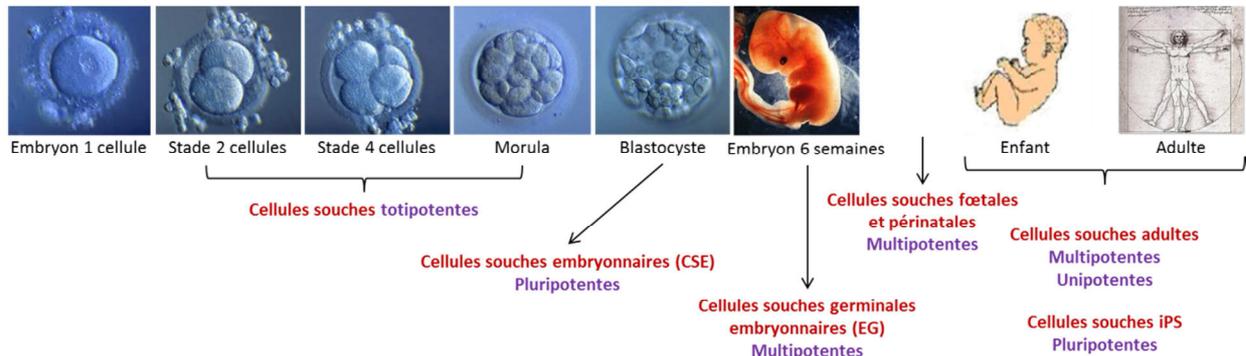


Figure 4. Les cellules souches chez l'Homme et leur degré de potence au cours du développement humain.

Les cellules souches sont définies par deux propriétés intrinsèques : leur capacité d'auto-renouvellement (en théorie à l'infini en restant à un stade indifférencié) et leur potentiel de différenciation ou degré de potence. On distingue quatre degrés de potence : la totipotence, la pluripotence, la multipotence et l'unipotence. La totipotence concerne uniquement les cellules issues des premières divisions de l'œuf fécondé (du stade 2 cellules au stade 8 cellules), c'est-à-dire jusqu'au 4^{ème} jour environ du développement embryonnaire. Ces cellules sont capables de donner naissance à des cellules des 3 feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme ou endoderme) ainsi qu'au tissu extra-embryonnaire (qui donnera les annexes embryonnaires, le cordon ombilical et le placenta) ; elles peuvent donc reformer un organisme entier. Contrairement aux cellules totipotentes, les cellules pluripotentes ne peuvent pas recréer un organisme entier. Elles pourront cependant se différencier en tous les types cellulaires de l'organisme (plus de 200, y compris les cellules germinales) dérivés de l'un des trois feuillets embryonnaires. Les cellules souches embryonnaires (CSE ou cellules ES) en sont l'exemple type (Thomson et al., 1998). De même, bien que pouvant donner différents types cellulaires, les cellules souches multipotentes sont déjà engagées dans une voie de différenciation au sein d'un lignage spécifique (par exemple les cellules souches hématopoïétique). Enfin, les cellules souches unipotentes peuvent proliférer mais en ne donnant qu'un seul type cellulaire, ce sont des progéniteurs.

La révolution des cellules souches iPS

Les cellules souches d'origine humaine (embryonnaires, fœtales, adultes) possèdent un intérêt thérapeutique considérable mais leur utilisation est limitée soit pour des raisons éthiques, immunologiques, oncologiques soit par la quantité de matériel disponible. C'est pourquoi, la « création » des cellules souches pluripotentes induites iPS (*induced pluripotent stem cells*) en 2006 par l'équipe japonaise du Pr Shinya Yamanaka (prix Nobel de Médecine 2012) a révolutionné le domaine des cellules souches. Cette équipe a montré que la surexpression de 4 facteurs de transcription (FT) (Oct3/4 également appelé Pou5f1, Sox2, Klf4 et c-Myc : cocktail OSKM) dans des fibroblastes murins puis humains permettait de les reprogrammer en cellules souches possédant les caractéristiques des cellules souches embryonnaires pluripotentes (Figure 5) (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007). En parallèle, l'équipe américaine de James Thomson a reprogrammé des fibroblastes humains en utilisant une combinaison alternative constituée des FT Oct4, Sox2, Nanog et Lin28 (cocktail OSNL) clonés dans un vecteur lentiviral (Yu et al., 2007).

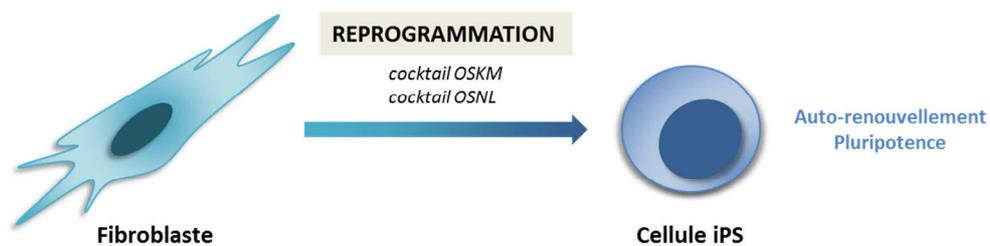


Figure 5. La reprogrammation des fibroblastes en cellules souches pluripotentes induites.

Il s'agit d'une révolution majeure dans le domaine des cellules souches car il est à présent possible de disposer de quantités illimitées de cellules souches pluripotentes capables de se différencier en n'importe quelle cellule de l'organisme, et cela de façon totalement éthique. De plus, lorsqu'elles sont reprogrammées à partir de cellules de patients portant une anomalie génétique particulière, les cellules iPS conservent cette anomalie. Cette nouvelle technologie permet donc d'envisager des avancées majeures dans les domaines de la médecine régénérative, de la modélisation physiopathologique, de la toxicologie et du screening toxicologique notamment. Leurs nombreuses applications seront présentées dans le Chapitre II.1.4.

1.1. La reprogrammation en cellules iPS

La technologie utilisée pour la génération de cellules iPS a bénéficié des avancées d'autres techniques de reprogrammation de cellules somatiques telles que le transfert nucléaire et la fusion cellulaire qui ont permis de comprendre le rôle prépondérant de certains gènes dans l'induction et le maintien de la pluripotence des cellules souches (Stadtfield and Hochedlinger, 2010).

1.1.1. Le mécanisme de reprogrammation

La réactivation de l'état de pluripotence dans des cellules différenciées met en jeu un réseau très complexe de régulation des mécanismes conduisant à la pluripotence. Ainsi, la reprogrammation des cellules somatiques en cellules souches pluripotentes requiert l'élimination des marques épigénétiques propres aux cellules somatiques et l'établissement de nouvelles marques caractéristiques de la pluripotence (modification de la chromatine et des méthylations de l'ADN) (Figure 6). Les FT apportés jouent un rôle prépondérant dans ce phénomène : ils vont en effet induire une transition mésenchymale-épithéliale (MET) des cellules somatiques ainsi que des modifications métaboliques, morphologiques, un échappement à l'arrêt du cycle cellulaire et une prolifération plus rapide (Papp and Plath, 2011). Puis, après réactivation du circuit de pluripotence, les cellules reprogrammées sont capables de s'auto-renouveler indépendamment des FT introduits. La réactivation de la télomérase lors de la reprogrammation permet également aux cellules de se diviser à l'infini sans raccourcissement de leurs télomères (Stadtfield et al., 2008).

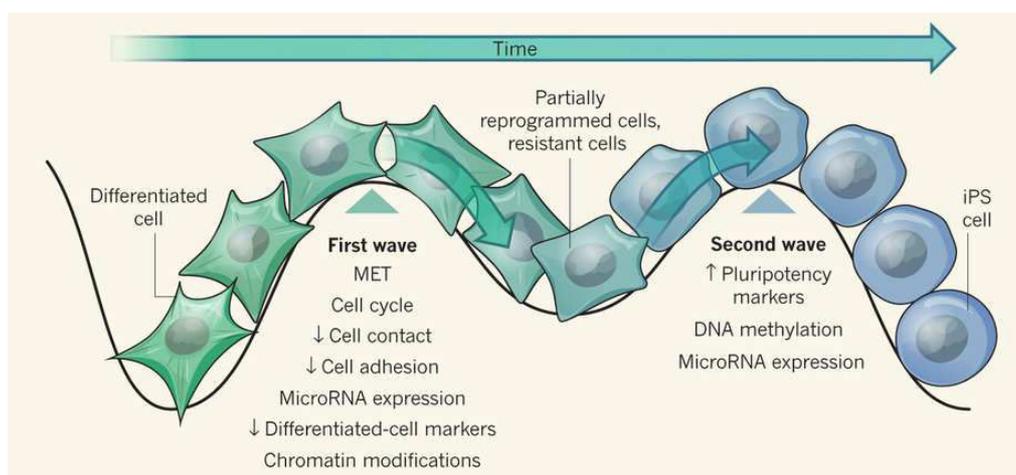


Figure 6. Les évènements séquentiels conduisant à la reprogrammation de cellules différenciées en cellules iPS. D'après (Sancho-Martinez and Izpisua Belmonte, 2013).

La reprogrammation est un processus lent qui nécessite plusieurs semaines et dont l'efficacité, la reproductibilité et la qualité des cellules iPS produites (pluripotence et capacité de différenciation) sont influencées par différents paramètres : le choix des cellules cibles, des FT, de la méthode de reprogrammation...

1.1.2. Les cellules d'origine

Les premières cellules reprogrammées étaient des fibroblastes murins et humains du fait de leur facilité d'obtention (biopsie de peau), d'amplification en culture et de reprogrammation en cellules iPS. Depuis, de nombreux autres types cellulaires ont été reprogrammés avec succès : des kératinocytes issus de cheveux, des cellules de cornée, du foie ou de l'estomac, des cellules

progénitrices neurales, des cellules sanguines dont les lymphocytes B, des cellules souches adipeuses (Stattfeld and Hochedlinger, 2010). Le type cellulaire et le stade de différenciation de la cellule d'origine influencent fortement la « reprogrammabilité » en cellules iPS (Figure 7). Par exemple, les kératinocytes humains sont plus rapidement et plus efficacement reprogrammés que les fibroblastes humains (Aasen et al., 2008), et l'efficacité de reprogrammation des progéniteurs hématopoïétiques est 300 fois supérieure à celle des cellules T ou B (Eminli et al., 2009). Le type cellulaire d'origine peut également influencer les propriétés fonctionnelles et moléculaires des cellules iPS générées, et cela à cause d'un phénomène de « mémoire épigénétique » (Kim et al., 2011).

Il est également nécessaire de prendre en compte l'âge du donneur, ses cellules pouvant porter des lésions génétiques potentiellement délétères pour une application clinique, ainsi que l'organe d'origine, la peau étant plus exposée et susceptible d'accumuler des mutations (Maherali and Hochedlinger, 2008). De même, pour un usage thérapeutique, il est préférable que les cellules d'origine soient facilement accessibles (sans geste invasif) et disponibles en grande quantité, tout en contenant le moins d'aberrations génétiques possible, le moins immunogéniques possible, faciles à reprogrammer et avec une bonne efficacité/rapidité.

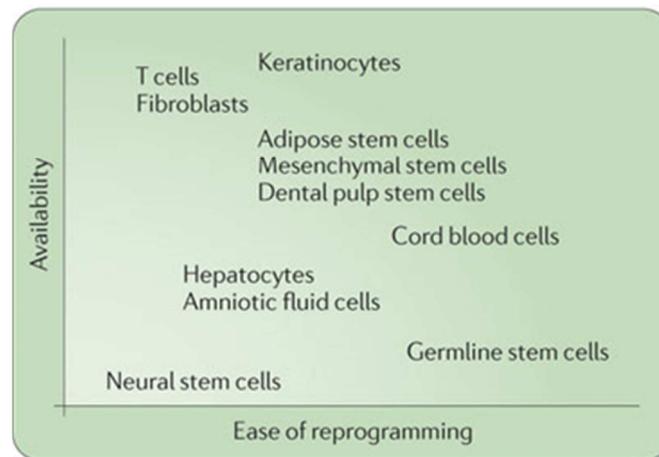


Figure 7. Influence du type cellulaire de départ sur la « reprogrammabilité » en cellules iPS. D'après (González et al., 2011).

1.1.3. Le cocktail de reprogrammation

- Les facteurs de transcription

Le cocktail de FT le plus largement utilisé est celui de l'équipe de S. Yamanaka (OSKM : Oct3/4, Sox2, Klf4 et c-Myc, ou « cocktail Yamanaka »). Mais l'utilisation de c-Myc est problématique puisque sa réactivation peut entraîner le développement de tumeurs (Okita et al., 2007). Il est possible de reprogrammer des fibroblastes murins et humains sans c-Myc mais l'efficacité de reprogrammation est significativement réduite et le délai de reprogrammation rallongé (Nakagawa et al., 2008). Différents cocktails de reprogrammation comme celui développé par l'équipe de J. Thomson (cocktail

OSNL) permettent également de générer des cellules iPS avec une efficacité comparable au « cocktail Yamanaka » (Yu et al., 2007). Il est possible de réduire le nombre de FT car certains types cellulaires sont plus facilement reprogrammables. Ainsi, des cellules iPS ont pu être produites à partir de cellules CD133⁺ issues de sang de cordon en utilisant uniquement les FT Oct4 et Sox2 (Giorgetti et al., 2009). A l'inverse, l'utilisation de 6 FT (OSKMNL) augmenterait l'efficacité de reprogrammation d'un facteur 10 et, grâce à ce cocktail, l'équipe de JM. Lemaître a reprogrammé avec succès des cellules sénescentes et a montré un rajeunissement, ouvrant ainsi une porte vers la lutte contre le vieillissement (Lapasset et al., 2011).

- Les petites molécules

Bien que le cocktail OSKM représente le protocole standard pour la reprogrammation, l'addition de petites molécules dans le milieu de culture permet d'augmenter significativement l'efficacité de reprogrammation, voire même de remplacer les FT (Jung et al., 2014; Lin and Wu, 2015). Ainsi, des molécules agissant sur les mécanismes épigénétiques de remodelage de la chromatine (acide valproïque ou trichostatine A) ou agissant sur la méthylation de l'ADN peuvent être utilisées. D'autres composés chimiques se sont révélés intéressants comme la thiazovivine, un inhibiteur de l'apoptose. La vitamine C par exemple, en diminuant la sénescence et en induisant la déméthylation de l'ADN notamment, promeut la transition des colonies pré-iPS vers un état complètement reprogrammé (Esteban et al., 2010). De même, le blocage de certaines voies de signalisation comme la voie p53/p21 (activée lors de l'induction de la reprogrammation) par des molécules chimiques, des siRNA ou des shRNA, augmente l'efficacité et accélère la cinétique de reprogrammation (Kawamura et al., 2009). Enfin, des molécules bloquant des voies de signalisation MEK/ERK (PD0325901), de la glycogène synthase kinase 3 (GSK-3) (CHIR99021) ou inhibant le TGFβ (SB431542) se sont révélées efficaces en combinaison avec d'autres molécules (Jung et al., 2014). Ainsi, en 2013, Hou *et al.* ont reprogrammé avec une efficacité de 0,2 % en 40 jours des cellules murines en cellules iPS en utilisant 7 composés chimiques, sans FT (Hou et al., 2013). Les cellules iPS créées par cette technique sont dites « induites chimiquement » (CiPS, *chemically induced pluripotent stem cells*). Cependant, pour l'instant, aucune obtention de cellules iPS humaines grâce à cette technique n'a été publiée.

Ces molécules, par leur facilité d'utilisation et l'absence de modification génétique permanente, représentent une aide précieuse pour la reprogrammation. Leur effet est souvent rapide et réversible, permettant une bonne régulation temporelle. Actuellement, c'est donc l'un des moyens les plus prometteurs pour générer des cellules iPS de grade clinique (Higuchi et al., 2015; Lin and Wu, 2015).

1.1.4. Les méthodes de reprogrammation

De nombreux vecteurs ont été développés depuis la première reprogrammation avec des rétrovirus en 2006 par l'équipe de S. Yamanaka. La Figure 8 présente les principales techniques actuelles de reprogrammation.

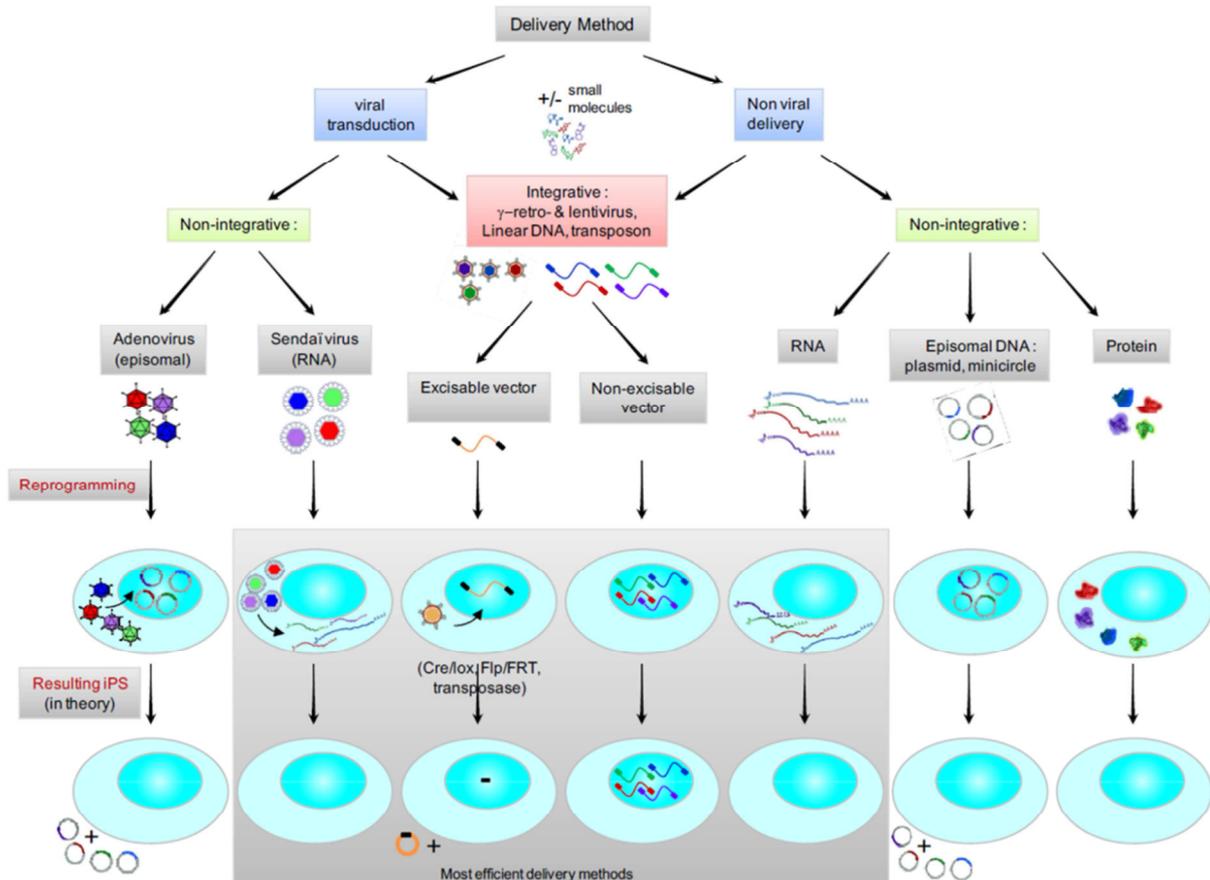


Figure 8. Les vecteurs utilisés pour la reprogrammation des cellules somatiques humaines en cellules iPS. D'après (Bayart and Cohen-Haguener, 2013).

▪ Les vecteurs viraux intégratifs

Historiquement, les premiers vecteurs utilisés pour apporter les facteurs de transcription étaient les rétrovirus et les lentivirus (Takahashi and Yamanaka, 2006; Yu et al., 2007). Mais, bien que très efficaces (0,01 à 1 % selon le vecteur et la cellule cible), ces vecteurs viraux intégratifs présentent un risque mutagène et de réactivation d'oncogènes du fait de leur insertion aléatoire dans le génome, limitant ainsi l'utilisation thérapeutique des cellules iPS reprogrammées avec ces vecteurs. Les efforts des chercheurs se sont alors tournés vers le développement de vecteurs viraux intégratifs excisibles grâce au système de recombinaison *Cre-loxP* (Kaji et al., 2009; Soldner et al., 2009) ou le système non viral transposon/transposase *piggyBac* ou *Sleeping Beauty* (Grabundzija et al., 2013; Kaji et al., 2009; Woltjen et al., 2009). Bien qu'efficaces, ces deux techniques peuvent laisser des fragments d'ADN ou induire des microdélétions au niveau du site d'excision (Figure 8).

- Les vecteurs viraux non intégratifs

Bien que des adénovirus aient été utilisés pour reprogrammer des cellules somatiques humaines (Zhou and Freed, 2009), la méthode virale actuellement la plus utilisée est le virus Sendai. Ce virus à ARN non intégratif réplique son génome exclusivement dans le cytoplasme de la cellule transfectée. Son efficacité de reprogrammation est comparable à celle des virus intégratifs (0,02-1 %) (Fusaki et al., 2009). L'expression du virus diminue progressivement au cours de de la culture (10 passages environ), mais dans le cas où des cellules iPS aient conservé le génome viral, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la protéine HN exprimée à la surface des cellules infectées permet de sélectionner négativement des cellules iPS « *virus-free* » (Nishishita et al., 2011).

- Les méthodes non virales

Les techniques apportant les facteurs de transcription sous forme d'ADN plasmidique, d'ARNm et sous forme de protéines recombinantes sont actuellement privilégiées pour produire des cellules iPS car elles sont non intégratives (Figure 8).

ADN plasmidique

Les vecteurs plasmidiques épisomaux dits « auto-réplicatifs » dérivés du virus d'Epstein Barr (oriP/EBNA1) sont actuellement les plus largement utilisés. L'épisome est un élément extra-chromosomique localisé dans le noyau de la cellule cible qui se réplique une seule fois par cycle cellulaire et, sous l'influence de sélection, il peut être maintenu à long terme sous forme épisomale dans près de 1 % des cellules initiales transfectées. Il ne nécessite donc pas de transfections répétées (Okita et al., 2011; Yu et al., 2009). L'efficacité de reprogrammation reste faible (0,001 %) mais il est possible d'associer des petites molécules pour l'améliorer. Leur principal avantage est que, en l'absence de sélection, le plasmide épisomal est progressivement éliminé des cellules iPS reprogrammées (en 7 passages environ).

ARNm

La reprogrammation par l'administration répétée journalière d'ARNm synthétiques est actuellement la technique la plus efficace (1-2 %), même si elle est contraignante, et avec une cinétique de reprogrammation supérieure aux protocoles utilisant des virus (Warren et al., 2010). De plus, l'utilisation d'ARNm permet d'éviter complètement le risque d'intégration génomique ou d'insertion mutagène. Il a même été montré qu'une seule transfection d'un ARNm synthétique polycistronique « auto-réplicatif » permettait l'expression des FT OSKM à un niveau élevé et constant (> 7 jours) pendant un nombre limité de divisions cellulaires (Yoshioka et al., 2013).

Protéines

Les FT apportés sous forme recombinante directement dans les cellules cibles grâce à l'utilisation d'un *cell penetrating peptide* (CPP) comme par exemple 11R, 9R et TAT, ont démontré leur capacité à générer des cellules iPS (Kim et al., 2009; Zhang et al., 2012; Zhou et al., 2009). Les cellules iPS obtenues par cette technique sont appelées *protein-induced pluripotent stem cells* (piPSCs). Cette méthode simple de reprogrammation à l'aide de protéines n'entraîne aucun risque de modifier génétiquement ou chimiquement le génome de la cellule cible. Cependant, plusieurs cycles de traitement sont nécessaires et la reprogrammation est lente et 100 à 1000 fois moins efficace que les méthodes virales intégratives (0,001 à 0,01 %) limitant ainsi son utilisation.

1.2. La culture des cellules iPS

Les cellules souches pluripotentes humaines (hPSCs) sont continuellement en équilibre entre auto-renouvellement et différenciation. Ainsi, il est nécessaire de parfaitement contrôler leurs conditions de culture pour permettre leur prolifération dans un état indifférencié. A l'origine, les hPSCs étaient cultivées sur des cellules nourricières d'origine murine : fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs), dérivés de fœtus de souris entre 12,5 et 14,5 jours de gestation, les plus employés actuellement, ou cellules STO immortalisées ; mais des cellules nourricières d'origine humaine peuvent également être utilisées (Unger et al., 2009). La prolifération de ces cellules nourricières doit être inactivée par irradiation ou traitement avec de la mitomycine C, tout en permettant l'expression et la sécrétion des facteurs indispensables au maintien de la culture des hPSCs. Divers facteurs de croissance ou additifs doivent être ajoutés dans le milieu de culture pour maintenir la pluripotence, comme le facteur de croissance bFGF (*basic fibroblast growth factor*) qui régule l'auto-renouvellement des hPSCs (Levenstein et al., 2006).

Cependant, une standardisation de la culture ainsi que l'utilisation de produits totalement définis et exempts de contaminants d'origine animale sont indispensables en vue d'une application en clinique (Lambhead et al., 2013). Des milieux de culture commerciaux parfaitement définis (mais coûteux) peuvent ainsi être associés à l'utilisation de substrats protéiques mimant la matrice extracellulaire comme le Matrigel™, le plus employé mais contenant des contaminants xénogéniques (Kleinman et al., 1986), ou des protéines recombinante comme le collagène IV, la vitronectine, la fibronectine et la laminine. Des substrats synthétiques de type polymères ou hydrogels ont également été développés pour la culture des hPSCs, ainsi que des systèmes 3D, mais leur utilisation est plus anecdotique.

1.3. La caractérisation des cellules iPS

Caractériser les cellules iPS est indispensable afin de sélectionner des lignées pluripotentes et ne présentant pas d'anomalies génétiques. Cette étape est d'autant plus importante si les cellules iPS sont destinées à une application clinique. Ainsi, le choix et le nombre des tests de caractérisation à mettre en œuvre sont fonction de l'application prévue. Les principaux tests utilisés sont présentés ci-dessous mais cette liste est loin d'être exhaustive (Martí et al., 2013; Stadtfeld and Hochedlinger, 2010).

Caractérisation morphologique

Les cellules iPS humaines possèdent les mêmes caractéristiques morphologiques que les cellules ES : elles prolifèrent sous forme de colonies rondes, composées de cellules possédant un noyau avec un large nucléole, et un cytoplasme peu abondant. Leur temps de doublement est similaire aux cellules ES (43-48h) et leur croissance est illimitée *in vitro* lorsque la culture est réalisée dans des conditions optimales (Takahashi et al., 2007).

Caractérisation phénotypique et fonctionnelle

Lors de la génération d'une nouvelle lignée iPS humaine, il est possible de sélectionner facilement des colonies complètement reprogrammées par leur activité alcaline phosphatase élevée. Puis, après amplification, l'une des premières étapes de caractérisation est de démontrer leur pluripotence. Celle-ci peut tout d'abord être confirmée par la mise en évidence de l'expression de marqueurs membranaires de pluripotence tels que SSEA (*stage specific embryonic antigen*)-3, SSEA-4, TRA (*tumor related antigen*)-1-60, TRA-1-81 ainsi que des facteurs de transcription nucléaires tels que Oct4, Sox2 et Nanog (Takahashi et al., 2007). L'étape suivante est de démontrer que les cellules iPS peuvent se différencier en des types cellulaires dérivés des trois lignées embryonnaires (mésoderme, ectoderme et endoderme). Cela peut être montré par des tests de différenciation *in vitro* et *in vivo* : les cellules souches pluripotentes sont en effet capables de former spontanément *in vitro* des structures 3D appelées corps embryoides (EBs, *embryoid bodies*), et de générer *in vivo* des tératomes après injection dans des souris immunodéficientes. Longtemps considéré comme le « gold standard » pour la caractérisation de nouvelles lignées de cellules iPS, la nécessité du test de formation de tératomes est actuellement débattue.

Caractérisation génétique

Des variations génétiques et épigénétiques ont été décrites dans les cellules iPS et certaines d'entre elles peuvent affecter les propriétés des cellules iPS et donc leur utilisation thérapeutique. L'un des tests les plus couramment employé pour les détecter est le caryotype et il doit être réalisé régulièrement pour vérifier l'absence d'acquisition d'anomalies au cours de la culture. En effet, il est

estimé qu'au moins 13 à 30 % des lignées iPS analysées développent des anomalies du caryotype au moins lors d'un passage. Dans plus de la moitié des cas, il s'agit de trisomie 12 (Taapken et al., 2011). Réalisée moins couramment mais pourtant très préconisée, la CGH array est une technique plus résolutive que le caryotype, permettant la détection de petits remaniements génétiques (Elliott et al., 2010).

D'autres analyses peuvent être réalisées comme la mise en évidence de la réactivation de la télomérase (Stadtfeld et al., 2008) et de l'inactivation des transgènes (quand utilisation de vecteurs intégratifs), ainsi que l'étude du profil d'expression épigénétique, génique, transcriptionnel ou protéomique (Pripuzova et al., 2015).

1.4. Les applications des cellules souches iPS

La « découverte » des cellules iPS a révolutionné le champ des cellules souches et apporté de nombreux espoirs en recherche. Leurs applications sont infinies, allant de la modélisation cellulaire physiopathologique à la médecine régénérative en passant par le screening pharmacologique et toxicologique (Figure 9).

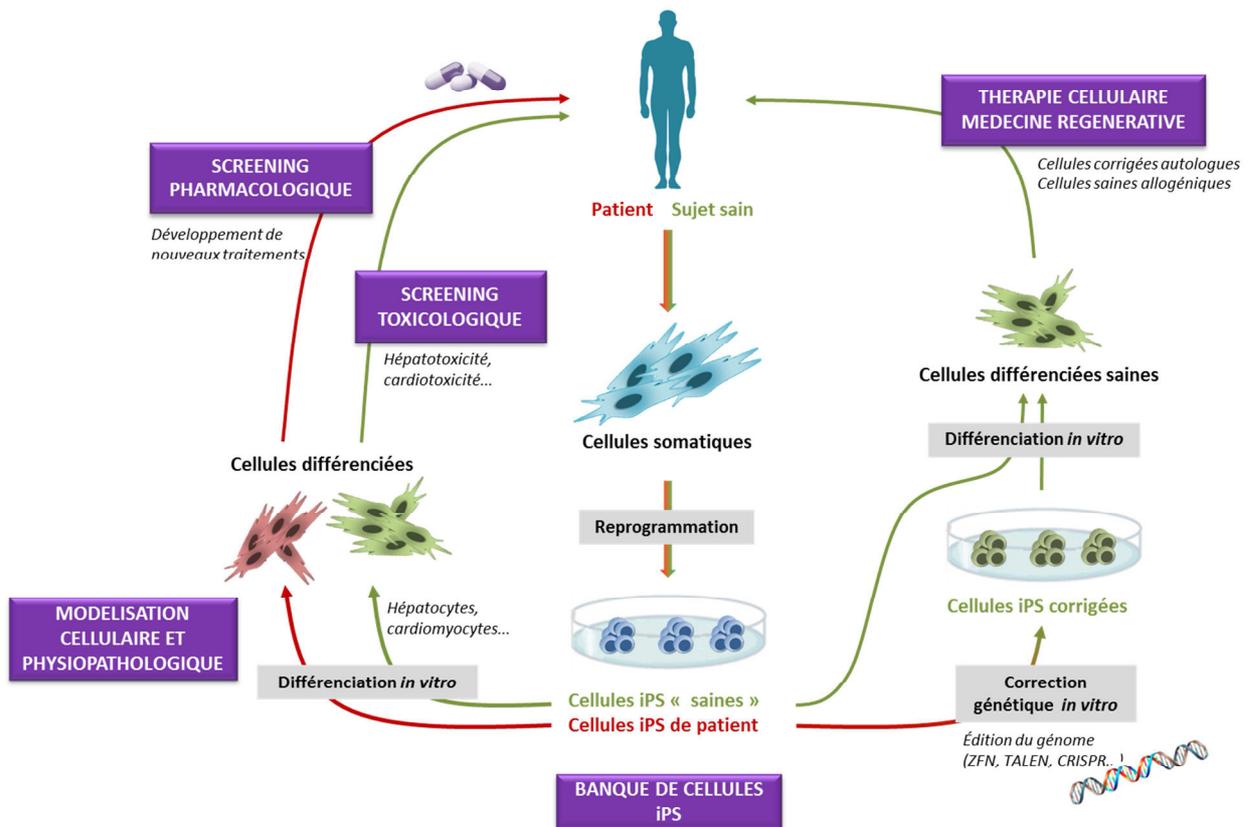


Figure 9. Les applications des cellules iPS humaines.

1.4.1.A partir de cellules iPS « saines »

Modélisation cellulaire

Les cellules iPS peuvent être théoriquement différenciées en tous les types cellulaires de l'organisme. Leur différenciation a été réalisée avec succès en cellules hématopoïétiques, cardiaques, neurales, hépatiques, épithélium pigmenté de la rétine et bien d'autres encore (Efthymiou et al., 2014). Grâce à leur similarité avec les cellules ES, les cellules iPS peuvent permettre d'étudier les mécanismes de différenciation mais également déterminer le rôle de certains gènes développementaux.

Thérapie cellulaire et médecine régénérative

Avec la mise au point de protocoles de différenciation reproductibles et efficaces, il semble possible d'obtenir des quantités potentiellement illimitées de cellules différenciées. La technologie des cellules iPS ouvre ainsi de nouvelles perspectives pour la génération de cellules transplantables autologues ou allogéniques afin de remplacer ou réparer les tissus endommagés par une lésion ou une maladie. Dans des maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson, des lésions de la moelle épinière, des pathologies métaboliques comme le diabète de type 1, des pathologies cardiaques ou hépatiques, des essais de transplantation chez des animaux modèles ont déjà donné des résultats très encourageants (Harding and Mirochnitchenko, 2014).

En Juillet 2013, le ministère japonais de la Santé a donné son accord pour débiter les premiers essais cliniques de médecine régénérative chez l'Homme à l'aide des cellules iPS. Un 1^{er} essai clinique conduit par la Fondation pour la Recherche Biomédicale et l'Innovation de Kobé (Institut RIKEN) a ainsi été réalisé en septembre 2013 sur une patiente atteinte de dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), qui est la première cause de cécité des plus de 55 ans dans les pays industrialisés. La question de la sécurité de l'utilisation des cellules iPS reste toutefois à résoudre puisque le risque de développement de tératome après transplantation chez les patients dû à la présence d'iPS résiduelles n'est pas négligeable. Afin de sélectionner des produits dérivés des cellules iPS utilisables en clinique, l'équipe du RIKEN a proposé des lignes directrices pour la réalisation des tests d'évaluation de la tumorigénicité (c'est-à-dire le potentiel de formation de tumeurs après transplantation chez l'animal, généralement la souris) (Kawamata et al., 2015).

L'utilité des cellules iPS dans le domaine de l'hématologie est également parfaitement démontrée, notamment en permettant la production de cellules matures comme les globules rouges (Kobari et al., 2012; Lapillonne et al., 2010) et les plaquettes en quantité quasi illimitée (Nakamura et al., 2014) à partir de cellules iPS humaines pour de la transfusion. En prenant en compte les principaux antigènes du système sanguin (Rh, Duffy, Kell...), Peyrard *et al.* ont déterminé que trois lignées iPS

seulement permettraient de couvrir 99 % des besoins transfusionnels en globules rouges de la population française (Peyrard et al., 2011).

Les cellules iPS pourraient également apporter une solution au problème de la pénurie d'organes pour la transplantation. Le 1er essai d'utilisation des cellules iPS pour générer des organes humains (pancréas, rein, foie et autres organes) dans des cochons pourrait bientôt être mené aux Etats-Unis par le Pr Nakauchi. Pour réaliser cela, il utilise la technique de la complémentation du blastocyste : son approche consiste à injecter des cellules iPS d'une espèce 1 dans un blastocyste d'une espèce 2 modifiée pour être déficiente en un organe donné, puis ces embryons chimériques sont réimplantés dans l'utérus d'une « mère porteuse » (Kobayashi et al., 2015; Matsunari et al., 2013). Mais ces nouvelles avancées technologiques, bien que porteuses d'espoirs pour pallier au manque d'organes, pourraient se heurter à des considérations éthiques...

Screening toxicologique

Plus de 40 % des drogues testées lors d'essais cliniques sont abandonnées à cause de l'apparition d'effets toxiques inattendus. Les cellules iPS différenciées ou non, saines ou spécifiques de pathologies, peuvent servir de modèles prédictifs *in vitro* pour évaluer la toxicité pré-clinique de nombreuses molécules ou nouveaux médicaments, notamment la cardiotoxicité, l'hépatotoxicité et même la tératogénicité (Anson et al., 2011). De plus, des panels de lignées cellulaires reproduisant la diversité génétique et épigénétique de la population peuvent permettre d'étudier l'influence de certains polymorphismes sur le métabolisme ou l'élimination de molécules/médicaments (Ulvestad et al., 2013).

1.4.2.A partir de cellules iPS issues de patients

Modélisation physiopathologique

Les chercheurs se sont très rapidement intéressés à la modélisation de maladies en utilisant des cellules somatiques issues de patients. Depuis les premières modélisations physiopathologiques réalisées en 2008, de nombreuses lignées iPS ont été produites aussi bien pour la modélisation de pathologies neurologiques, hématologiques, métaboliques, cardiovasculaires que des cancers (Robinton and Daley, 2012). Cette technologie permet ainsi de créer des modèles de pathologies pour lesquelles il n'existe pas ou peu de modèles cellulaires pertinents *in vitro*. Ils permettent ainsi d'étudier les mécanismes sous-jacents à une pathologie, d'identifier un phénotype particulier associé à celle-ci, développer de nouveaux traitements... C'est cette application qui nous intéresse dans ce travail et plus particulièrement la modélisation physiopathologique de la CGD, maladie touchant le système hématologique et immunitaire (cf Chapitre I).

Thérapie génique

Dans le cas de maladies constitutionnelles monogéniques, il est théoriquement possible de corriger l'anomalie génétique portée par les cellules iPS issues du patient, puis de les différencier en cellules d'intérêt et ensuite de les réintroduire chez le patient. La correction génétique peut être réalisée par l'utilisation de vecteurs viraux intégratifs (rétrovirus, lentivirus) mais, comme discuté précédemment, elle est limitée par le risque d'insertion mutagène. L'évolution actuelle repose sur les nouvelles technologies de « l'édition du génome » qui, grâce au mécanisme de recombinaison homologue, utilisent la machinerie cellulaire de réparation de l'ADN pour remplacer la séquence mutée d'un gène par une séquence saine. Ainsi, des nucléases ZFN (*Zinc Finger Nuclease*), TALEN (*Transcription activator-like effector nuclease*) (Christian et al., 2010) et CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)-Cas9 permettent d'induire des cassures double-brin dans l'ADN au niveau d'un site ciblé, ce qui augmente la fréquence de recombinaison homologue et permet l'introduction d'une mutation ou d'un « gène donneur sain » par exemple (Li et al., 2014). Des essais de correction génétique utilisant des vecteurs lentiviraux ont été réalisés avec succès dans des maladies hématologiques. Par exemple, en 2009 dans l'anémie de Fanconi où les fibroblastes du patient ont été corrigés grâce à un vecteur lentiviral puis reprogrammés en cellules iPS et enfin différenciés *in vitro* en progéniteurs hématopoïétiques phénotypiquement normaux (Raya et al., 2009), mais également en 2012 dans la porphyrie érythropoïétique congénitale où la correction par thérapie génique a permis la production de globules rouges fonctionnels à partir des cellules iPS corrigées (Bedel et al., 2012). Des cellules iPS humaines issues de patients atteints de drépanocytose ont également pu être corrigées grâce aux techniques ZFN (Sebastiano et al., 2011; Zou et al., 2011a) et TALEN (Sun and Zhao, 2013). Très récemment, Li *et al.* ont réussi à corriger les cellules iPS d'un patient atteints de dystrophie musculaire de Duchenne grâce aux technologies TALEN et CRISPR (Li et al., 2015).

Screening pharmacologique

Ces modèles physiopathologiques permettent également de tester de nouvelles approches pharmacologiques potentiellement curatives. Des neurones modélisant le syndrome de Rett (maladie neurodégénérative due à une mutation du gène codant MeCP2 situé sur le chromosome X) ont permis de tester l'efficacité de différentes drogues et leur phénotype a ainsi pu être partiellement corrigé par l'administration d'IGF1 (Marchetto et al., 2010). La mise en place de plateformes représenterait un outil inestimable pour permettre le criblage de nombreuses molécules et évaluer leur efficacité à corriger le phénotype malade (Phillips and Crook, 2010; Rowntree and McNeish, 2010).

- Banques de cellules iPS

Actuellement, les chercheurs s'emploient à mettre en place des lignes de conduite internationales afin d'harmoniser les « règles de fabrication » (GMP, *good manufacturing practice*) et de caractérisation des cellules iPS pour disposer de lignées de grade clinique conservées dans des banques (Andrews et al., 2014; Barry et al., 2015). Il a par exemple été montré que la sélection de 30 lignées homozygotes seraient suffisantes pour procurer une compatibilité HLA avec 82,2 % de la population japonaise (Nakatsuji et al., 2008) alors qu'il faudrait disposer de 100 lignées homozygotes pour correspondre à 78 % de la population européenne (Gourraud et al., 2012). Le système HLA est bien plus complexe que le système des groupes sanguins érythrocytaires, ce qui explique la plus grande quantité de lignées iPS nécessaires. L'institut RIKEN au Japon propose déjà des lignées de cellules iPS dérivées de personnes saines ou provenant d'individus malades (> 40 déjà disponibles) alors que la 1^{ère} banque européenne pour les cellules iPS humaines (EBiSC, *European Bank for induced pluripotent Stem Cells*) est actuellement en cours de création.

2. Production de cellules souches/progénéiteurs hématopoïétiques à partir de cellules iPS

2.1. Les cellules souches hématopoïétiques

2.1.1. Développement du système hématopoïétique durant l'embryogénèse

La production de cellules sanguines tout au long de la vie repose sur l'existence de CSH apparaissant au cours de l'embryogénèse et assurant l'homéostasie du système hématopoïétique dans l'organisme grâce à un auto-renouvellement et une différenciation en cellules matures continus.

Chez l'Homme, au cours de l'ontogénèse, le développement hématopoïétique est caractérisé par deux vagues indépendantes dans le temps et l'espace. L'hématopoïèse dite primitive démarre vers le 15^{ème}-17^{ème} jour de gestation (jusqu'à la 8^{ème} semaine) avec l'apparition d'îlots sanguins dérivés du feuillet mésodermique dans le sac vitellin extra-embryonnaire. Les progénéiteurs générés donneraient majoritairement des érythroblastes nucléés primitifs, des mégacaryocytes et des macrophages primitifs. Ces progénéiteurs érythro-myéloïdes du sac vitellin coloniseraient le foie vers le 23^{ème} jour de gestation. Une seconde vague de génération de CSH, ou hématopoïèse définitive, aurait lieu dans l'embryon au moment de la mise en place de la circulation sanguine (21^{ème} jour de gestation) avec apparition de progénéiteurs hématopoïétiques multipotents de type adulte capables de repopulation érythroïde, myéloïde et lymphoïde à long terme (Tavian et al., 2001). En effet, à partir du jour 27, des

CSH définitives émergeraient d'une région appelée "Aorte - Gonades - Mesonephros" (AGM) (Tavian and Péault, 2005) et plus particulièrement au niveau de l'aorte dorsale à partir d'un « endothélium hémogénique », et seraient responsables de la seconde colonisation du foie à environ 30-40 jours de gestation (phase hépatique) et du thymus, qui deviennent ainsi des sites hématopoïétiques et lymphopoïétiques respectivement. Depuis le foie fœtal, les CSH vont ensuite coloniser les organes hématopoïétiques définitifs. Ainsi, une petite partie de l'érythropoïèse définitive a également lieu du 2^{ème} au 6^{ème} mois au niveau de la rate (phase splénique). Puis, à partir du 4^{ème} mois de développement embryonnaire, les CSH migrent *via* le système vasculaire dans la moelle osseuse (phase myéloïde), siège de l'hématopoïèse définitive chez l'adulte et lieu de résidence des CSH (Figure 10). Chez l'enfant, elle a lieu dans tous les os puis, à partir de 5 ans, elle se déroule uniquement dans les os plats (pelvis, sternum, os iliaque, côtes, crâne) et les vertèbres. Le thymus et la rate continuent de jouer un rôle dans l'hématopoïèse chez l'individu adulte en hébergeant la différenciation lymphocytaire T et la différenciation lymphocytaire B respectivement.

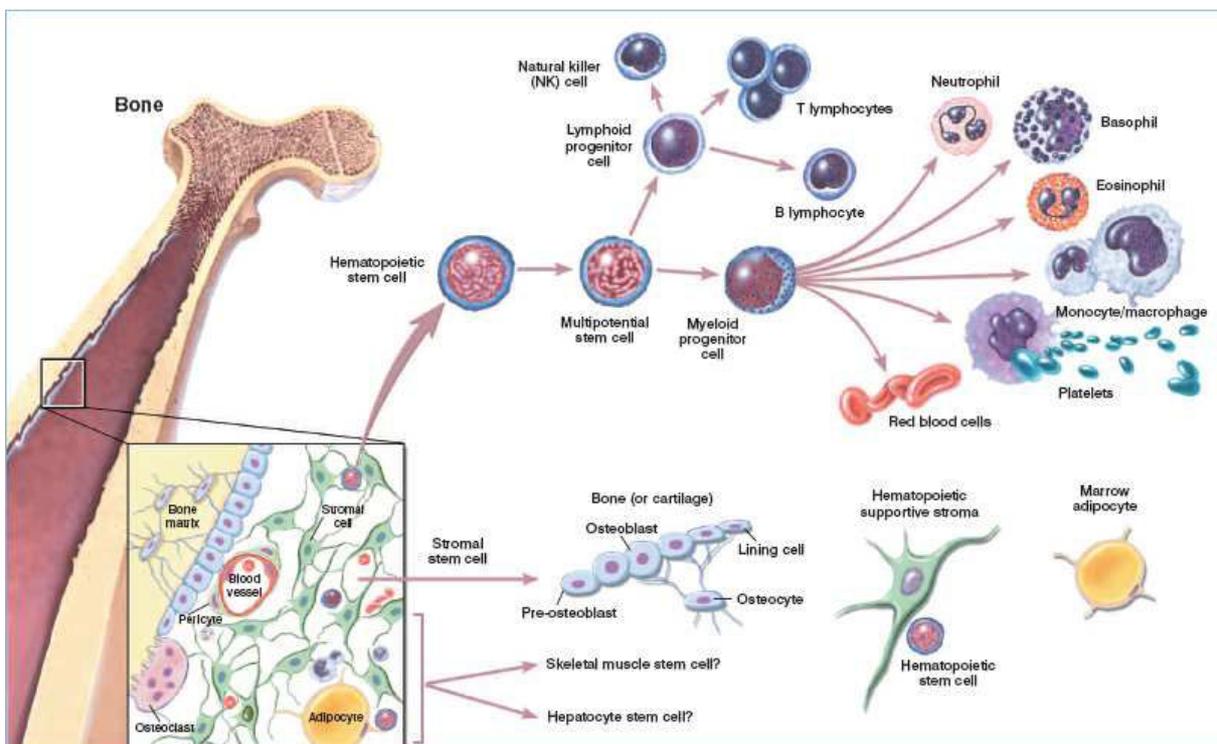


Figure 10. La niche hématopoïétique et l'hématopoïèse. 2001 Terese Winslow (assisted by Lydia Kibiuk)

2.1.2. L'hématopoïèse définitive chez l'adulte

La niche hématopoïétique

Dans la moelle osseuse, les CSH sont localisées dans un environnement cellulaire appelé « niche » qui les protège. La niche est une structure anatomique et fonctionnelle qui contient les CSH elles-mêmes, mais également d'autres types cellulaires de soutien formant un microenvironnement

médullaire riche en facteurs et molécules diverses capables de réguler la survie, la quiescence, l'auto-renouvellement, la prolifération et la différenciation des CSH (Schofield, 1978). La matrice extracellulaire de cette niche est composée de protéines produites par les cellules stromales comme les collagènes, la fibronectine, la laminine... Les cellules stromales jouant un rôle majeur sont les cellules endothéliales, les cellules souches mésenchymateuses ainsi que les ostéoblastes. Mais d'autres cellules participent également à la niche hématopoïétique comme des fibroblastes, des adipocytes, des macrophages... (Figure 10). Elles vont agir par contact direct avec les CSH ou libérer dans la niche divers facteurs de croissance hématopoïétiques ou autres composants essentiels comme CXCL12/SDF-1 (rétention des CSH dans la niche), angiopoïétine-1, SCF (*stem cell factor*) et thrombopoïétine (TPO) (maintien de la quiescence des CSH) (Boulais and Frenette, 2015). Les mécanismes de régulation de l'hématopoïèse sont très complexes et finement régulés par la niche hématopoïétique afin de maintenir l'homéostasie du système hématopoïétique durant toute la vie d'un individu.

En plus de la présence des cellules stromales, la niche hématopoïétique procure également un environnement hypoxique nécessaire aux CSH en les protégeant des FRO. En effet, l'hypoxie induit la sécrétion du facteur de transcription HIF-1 α qui va diminuer la respiration mitochondriale et l'activité des NADPH oxydases dans les CSH (Suda et al., 2011). Ainsi, une fine régulation de la fluctuation du niveau de FRO dans les CSH est indispensable pour le maintien de l'homéostasie du système hématopoïétique (Ludin et al., 2014). Les CSH exprimant un niveau intracellulaire de FRO faible sont plus quiescentes et présentent un potentiel d'auto-renouvellement et de transplantation élevés alors qu'un niveau élevé de FRO diminue la prolifération des CSH et induit leur différenciation et leur mobilisation. Les CSH expriment les isoformes NOX1, 2 (majoritairement) et 4 qui produisent des faibles niveaux de FRO constitutivement (Piccoli et al., 2007). Ainsi, la déficience en activité NADPH oxydase dans la CGD pourrait être responsable de la diminution de la mobilisation des CSH observée après induction par le G-CSF (Sekhsaria et al., 1996). A l'inverse, un défaut de cette balance avec une hyper-expression de FRO (stress oxydant) peut également conduire à l'apparition d'hémopathies telles que des syndromes myélodysplasiques ou des leucémies ainsi qu'à la sénescence et à une diminution du pool de CSH dans la moelle osseuse (Sardina et al., 2012).

L'hématopoïèse adulte

Au cours de l'hématopoïèse, la maturation des cellules hématopoïétiques est un processus progressif et il est possible donc d'identifier trois compartiments constitués d'un continuum de cellules de degrés de maturation variables :

- Le compartiment des cellules souches hématopoïétiques : les CSH sont caractérisées par deux propriétés principales, leur auto-renouvellement et leur potentiel de différenciation vers toutes les lignées hématopoïétiques,
- Le compartiment des progéniteurs hématopoïétiques : ces progéniteurs issus de la différenciation des CSH peuvent être primitifs (capables d'une prolifération importante et de différenciation vers plusieurs lignées hématopoïétiques) ou plus matures (incapables d'auto-renouvellement et engagés vers une ou deux lignées distinctes),
- Le compartiment des précurseurs hématopoïétiques : capables d'engendrer les cellules matures possédant une morphologie caractéristique identifiable et ne se divisant plus.

A la fin de ce processus de maturation médullaire, les cellules hématopoïétiques traversent la barrière endothéliale, quittent la moelle osseuse et atteignent la circulation sanguine.

Plus de 10^{11} cellules hématopoïétiques matures humaines sont ainsi produites chaque jour : érythrocytes, plaquettes, neutrophiles, monocytes/macrophages, éosinophiles, basophiles, cellules dendritiques, lymphocytes T et B et cellules NK (Figure 10). Pourtant, les CSH sont très peu nombreuses dans l'organisme (1 cellule sur 1 million dans la moelle osseuse humaine). Les plus primitives sont pour la plupart quiescentes (phase G_0), et il est d'ailleurs estimé qu'elles se diviseraient tous les 175-350 jours environ (Catlin et al., 2011). L'homéostasie de ce pool de CSH est maintenue grâce à une division asymétrique : une CSH se divise en donnant une autre CSH et une cellule-fille se différenciant vers un lignage donné.

2.1.3. Mise en évidence des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques (CSPH)

Il est très difficile de caractériser précisément les CSPH. Généralement, la caractérisation de ces cellules associe évaluation du potentiel hématopoïétique *in vitro* et *in vivo* et identification des marqueurs de surface.

2.1.3.1. Evaluation du potentiel hématopoïétique

- Tests fonctionnels *in vitro*

Plusieurs tests *in vitro* sont disponibles, chacun permettant de distinguer des stades différents de maturation des cellules souches ou progéniteurs hématopoïétiques (Figure 11).

Le test clonogénique ou CFC (*colony-forming cells*) assay

Ce test clonogénique met en évidence la présence de précurseurs/progéniteurs déjà plus ou moins engagés dans un lignage hématopoïétique. En effet, ceux-ci possèdent la capacité de former en 7-21 jours des colonies hématopoïétiques dans un milieu semi-solide (méthylcellulose) contenant des cytokines hématopoïétiques. Le type de colonies renseigne sur le type de progéniteurs présents dans

la population analysée : progéniteur multipotent (CFU-GEMM ou CFU-Mix, *colony-forming unit granulocyte erythrocyte macrophage megakaryocyte*), bipotent (CFU-GM, *colony-forming unit granulocyte-macrophage*), ou unipotent : érythroïde (BFU-E, *burst-forming unit erythrocyte*, et CFU-E, *colony-forming unit erythrocyte*), mégacaryocytaire (CFU-Mk ou CFU-Meg, *colony-forming unit megakaryocyte*), granulocytaire (CFU-G, *colony-forming unit granulocyte*), macrophagique (CFU-M, *colony-forming unit macrophage*), éosinophile (CFU-Eo, *colony-forming unit eosinophil*) et basophile (CFU-Baso, *colony-forming unit basophile*). De même, la taille de chaque colonie serait directement proportionnelle au potentiel prolifératif du progéniteur à l'origine de cette colonie. Dans cet essai dit « à court terme », les progéniteurs se différencient en moins de 3 semaines et ont un nombre de division limité (5 à 10) (Wognum et al., 2003). Ce test n'est donc pas approprié pour identifier les cellules immatures comme les CSH qui nécessitent plus de temps pour donner des cellules différenciées (Coulombel, 2004).

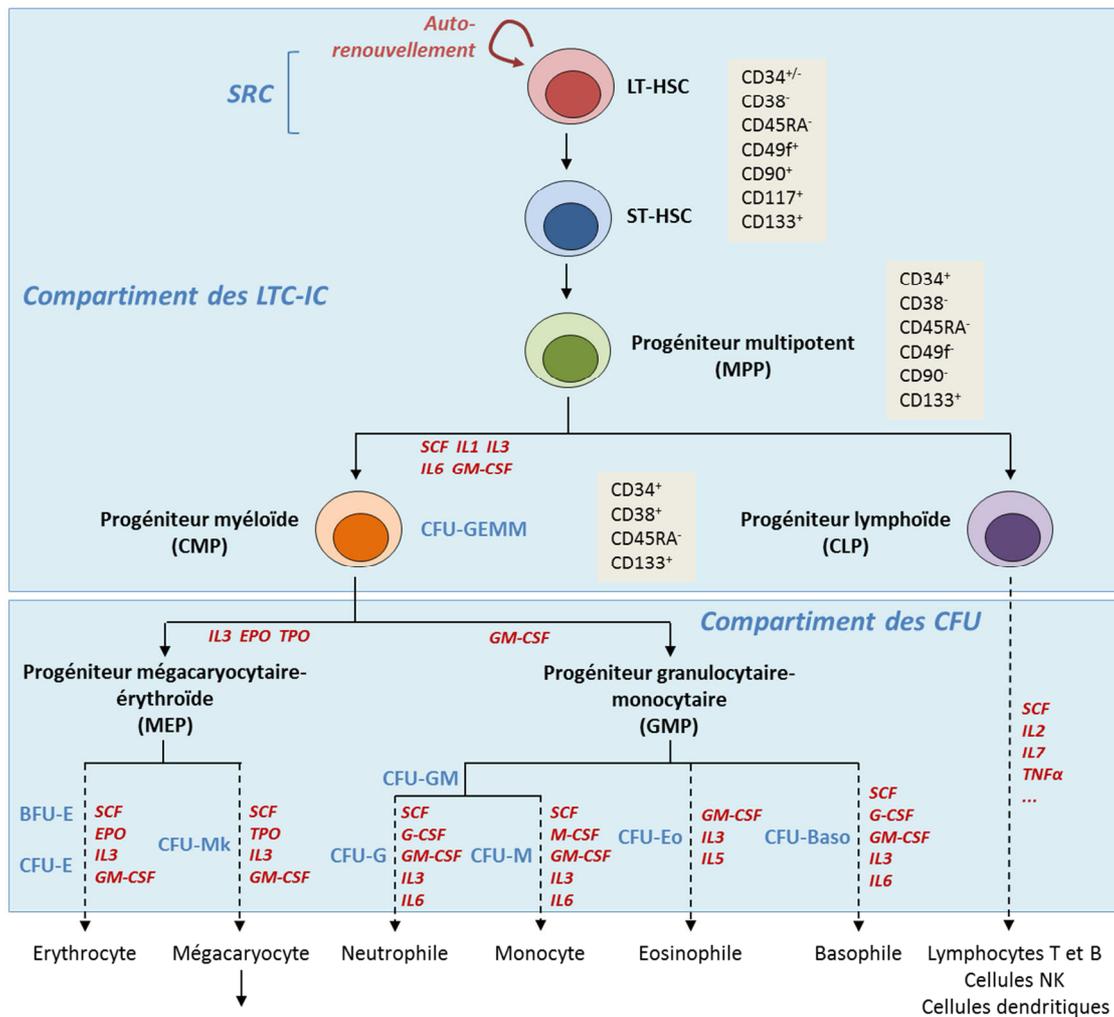


Figure 11. Evolution des marqueurs des cellules souches et du potentiel hématopoïétique au cours de l'hématopoïèse. Les marqueurs de surface les plus couramment employés sont indiqués dans les encarts gris, le potentiel hématopoïétique est indiqué en bleu et les cytokines hématopoïétiques en rouge.

Les systèmes de coculture : LTC-IC et CAFC

Dans ces systèmes de coculture dits « à long terme » qui durent plus de 5 semaines, les cellules testées sont cultivées sur des cellules stromales murines irradiées (MS-5 et S17 par exemple) en présence de cytokines, mimant ainsi le microenvironnement médullaire. Ils permettent de détecter des cellules plus immatures que les progéniteurs détectés par le test CFC, c'est-à-dire des CSH (mais pas toutes) ainsi que d'autres cellules un peu plus différenciées (Figure 11) (Sutherland et al., 1990). Ainsi, des progéniteurs hématopoïétiques déjà engagés vont terminer leur maturation et finalement disparaître au cours des 3-5 semaines de culture à cause de leur potentiel de prolifération limité, alors que les cellules plus immatures vont accomplir un nombre élevé de divisions (> 15) avant de donner des cellules différenciées. Ces tests ont permis d'identifier deux types de cellules : les LTC-IC (*long-term culture-initiating cells*) qui, après 5 semaines de culture, donneront des colonies détectables par le test CFC, et les CAFC (*cobblestone area-forming cells*) qui vont s'insérer dans la couche stromale et former un cluster de cellules pavimenteuses fortement associé aux cellules stromales. Le test des LTC-IC permet ainsi de déterminer, dans une population analysée, la fréquence des CSH (dilutions limites et analyse par la loi de Poisson) (Coulombel, 2004).

- Reconstitution hématopoïétique *in vivo*

Bien que les systèmes de coculture comme le LTC-IC permettent une bonne estimation *in vitro* de la présence de CSH, ils ne permettent pas de prédire totalement le potentiel de reconstitution des cellules hématopoïétiques *in vivo*. Ainsi, le seul test prouvant la présence de « vraies » CSH dans une population donnée est le test de reconstitution hématopoïétique *in vivo* à long terme après transplantations en série dans des souris immunodéficientes NOD/SCID irradiées ; ces cellules sont ainsi appelées SRC (*scid-repopulating cells*) (Dick et al., 1997). Par exemple, il y aurait 1 SRC pour $9,3 \times 10^5$ cellules mononucléées du cordon ombilical, pour 3×10^6 cellules de la moelle osseuse, pour 8×10^6 cellules du sang périphérique (après mobilisation par du G-SCF) ou pour 617 cellules $CD34^+CD38^-$ (Dick et al., 1997). Un très faible nombre de SRC voire même une seule cellule SRC serait capable de reconstituer une hématopoïèse durable dans des souris immunodéficientes.

Il faut cependant distinguer deux types de SRC. Des ST-SRC (*short-term-SRC*) peuvent être détectées à partir de 2 semaines post-transplantation mais leur potentiel de différenciation est restreint aux compartiments érythroïdes et myéloïdes, et seulement à court terme (2-3 semaines). A l'inverse, les LT-SRC (*long-term-SRC*) sont détectées après 8-10 semaines et sont capables de reconstituer une hématopoïèse à long terme (Glimm et al., 2001).

Comme déjà précisé précédemment, les CSH sont multipotentes et capables d'auto-renouvellement. Ainsi, l'injection primaire permet de tester la multipotence des CSH injectées en analysant les lignages reconstitués. Puis, l'injection secondaire, où la moelle osseuse des souris transplantées est

ré-injectée dans d'autres souris immunodéficientes irradiées, permet de tester leur capacité de reconstitution secondaire et donc leur potentiel d'auto-renouvellement.

2.1.3.2. Marqueurs de surface

La biologie des CSH est très complexe et il est donc très difficile de trouver un ensemble de marqueurs caractérisant phénotypiquement parfaitement les CSH. Certains marqueurs sont cependant à présent bien associés aux CSH (Figure 11).

Les cellules hématopoïétiques primitives, dont les CSH, n'expriment pas les marqueurs de lignage (Lin) tels que la glycophorine A exprimée par les érythrocytes, les marqueurs CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 exprimés par les lymphocytes, ou les marqueurs CD14, CD16 et CD66b associés aux cellules myéloïdes. La sélection de cellules Lin⁻ permet donc généralement un enrichissement en CSH de 50-200 fois en fonction des marqueurs de lignage utilisés (Wognum et al., 2003).

Le marqueur hématopoïétique CD34 est le plus utilisé pour identifier et isoler les CSH car il est exprimé par la majorité des cellules capables de reconstituer une hématopoïèse durable multi-lignée dans des souris immunodéficientes, mais il est également exprimé par les cellules progénitrices plus différenciées. L'isolement des cellules CD34⁺ conduit donc à un enrichissement de 25 à 100 fois en CSH et progéniteurs hématopoïétiques. Cependant, bien que les cellules CD34⁺ représentent près de 5 % du foie fœtal, du sang de cordon ou de la moelle osseuse, en réalité moins de 0,1 % de ces cellules sont de vraies CSH, moins de 1 % sont des LTC-IC et moins de 20 % des CFC (Wognum et al., 2003).

D'autres marqueurs combinés avec le CD34 peuvent permettre de définir plus précisément le phénotype des CSH. Ainsi les CSH sont généralement CD34⁺CD38⁻ et n'expriment le marqueur CD38 qu'au cours de leur différenciation. D'autres marqueurs seraient absents ou faiblement exprimés par les CSH comme le marqueur CD45RA ou HLA-DR, alors que d'autres seraient exprimés par la majorité des CSH comme CD90 (également appelé Thy1), CD133, CD117 (également appelé c-kit, récepteur du SCF), KDR (récepteur du VEGF-2), CD49f ou le CXCR4 (récepteur du CXCL12/SDF-1 α , impliqué dans le chimiotactisme des CSH et nécessaire pour le *homing* et la prise de greffe) (Handgretinger and Kuçi, 2013; Lapidot and Kollet, 2002; Majeti et al., 2007; Ziegler et al., 1999).

En plus des marqueurs de surface, la capacité d'efflux/exclusion de colorants spécifiques permet également d'identifier les CSH. La population de cellules réfractaires aux colorants fluorescents comme la rhodamine 123 (Rho) ou le Hoechst 33342 (Ho) est appelée " *side-population* " (SP) et contient ainsi un très grand nombre de CSH (Wognum et al., 2003). De même, les CSH présentent une activité intracellulaire élevée de l'enzyme aldéhyde déhydrogénase (ALDH) (Storms et al., 1999).

2.2. Production de progéniteurs CD34⁺ humains à partir de cellules souches pluripotentes humaines (hPSCs)

La différenciation hématopoïétique des cellules ES humaines a déjà permis de nombreuses avancées dans l'étude de l'ontogénie du système hématopoïétique humain et la compréhension des mécanismes de différenciation hématopoïétique puisque leur étude directe sur l'embryon humain est limitée pour des raisons éthiques et techniques. Les cellules souches pluripotentes iPS représentent une source potentielle illimitée et éthique de cellules hématopoïétiques. L'enjeu est en effet majeur puisque l'obtention de CSH en quantité illimitée grâce aux cellules iPS pourrait permettre de pallier au manque de donneurs HLA compatibles pour la transplantation allogénique ou produire des CSH corrigées autologues pour guérir des maladies hématologiques sévères (drépanocytose, thalassémies, leucémies...), générer des modèles physiopathologiques cellulaires et animaux (voir Chapitre II-4 Souris humanisées) ou encore produire des cellules matures pour la thérapie cellulaire (Vanhee and Vandekerckhove, 2015).

L'objectif de tous les protocoles de différenciation hématopoïétique est de créer *in vitro* un microenvironnement favorable pour orienter la différenciation des hPSCs spécifiquement vers le lignage hématopoïétique, soit pour l'obtention de CSPH, soit pour la différenciation terminale en cellules hématopoïétiques matures. Il existe dans la littérature une quantité très importante de protocoles de différenciation montrant l'obtention de cellules CD34⁺ et nous verrons ici de façon générale le principe de ces protocoles et les dernières avancées publiées. La différenciation hématopoïétique a d'abord été développée sur les cellules ES puis ces différents protocoles ont été adaptés aux cellules iPS ; ces deux types de cellules souches seront donc abordés en parallèle. Plusieurs de ces études ont d'ailleurs noté que le timing de différenciation hématopoïétique *in vitro* des cellules ES et iPS était similaire.

2.2.1. Les techniques de différenciation hématopoïétique

Deux techniques principales sont employées pour induire la différenciation hématopoïétique : la première technique repose sur un système de coculture avec des cellules stromales et la seconde technique sur la formation de corps embryoides (EBs).

Coculture avec des cellules stromales

L'objectif de ces systèmes de coculture est de mimer le microenvironnement embryonnaire ayant permis l'émergence des CSH. Ainsi, la première différenciation hématopoïétique à partir des cellules ES humaines a été réalisée en utilisant des cellules stromales murines C166, une lignée de cellules endothéliales dérivée du sac vitellin (jour 12 de gestation), et S17, des cellules stromales issues de la

moelle osseuse (Kaufman et al., 2001). D'autres lignées stromales murines se sont révélées intéressantes comme les cellules MS-5 ou les cellules OP9 (Nakano, 1996; Yoshida et al., 1990). Les cellules OP9 seraient d'ailleurs les plus efficaces pour induire la formation de cellules CD34⁺ à partir de cellules ES humaines (Vodyanik et al., 2005). D'autres lignées ont également été employées mais de façon plus anecdotique, telles que des cellules stromales dérivées de foie fœtal humain (Ledran et al., 2008; Qiu et al., 2005) mais également d'AGM (Ledran et al., 2008; Weisel et al., 2006).

Formation des corps embryoïdes

Dans cette structure 3D qui reproduit le développement embryonnaire *in vivo* (Zambidis et al., 2005), il se produit spontanément une différenciation vers les trois feuillets embryonnaires dont le mésoderme, source du lignage hématopoïétique. Cependant, cette différenciation spontanée est peu efficace en termes de rendement de progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ produits mais peut être améliorée par l'ajout de cytokines afin d'orienter la différenciation. Chadwick *et al.* ont ainsi montré en 2003 l'importance du BMP4 (*bone morphogenetic protein-4*) sur la différenciation des cellules ES humaines (Chadwick et al., 2003). D'autres équipes ont également développé des techniques permettant d'obtenir une taille plus homogène des EBs afin d'améliorer la différenciation hématopoïétique : *hanging drop* (Cerdan et al., 2007), *spin EBs* (Ng et al., 2005).

Combinaison corps embryoïdes / cultures stromales

La combinaison de ces deux approches, c'est-à-dire la formation des corps embryoïdes suivie de la coculture sur cellules stromales, généralement des cellules OP9, a également prouvé son efficacité (Kim et al., 2005; Wang et al., 2005a). Les cellules OP9 permettraient notamment la survie des précurseurs hématopoïétiques produits dans les EBs et induiraient leur prolifération (Ji et al., 2008).

Différenciation sur matrice extracellulaire

Afin de s'affranchir de l'utilisation de cellules stromales animales ou de la variabilité de la formation des EBs, la différenciation hématopoïétique des hPSCs a également pu être obtenue par culture des cellules souches en milieu sans sérum dans des disques recouverts avec du Matrigel™ (Niwa et al., 2011) ou avec des protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine et le collagène IV (Salvagiotto et al., 2011) en présence de cytokines hématopoïétiques.

2.2.2. Améliorations des protocoles de différenciation

La connaissance plus précise des voies régulant l'hématopoïèse au cours de l'embryogénèse grâce notamment aux cellules ES murines et humaines a conduit à développer de nouvelles approches pour améliorer les protocoles de différenciation et optimiser la production de progéniteurs hématopoïétiques.

Cytokines et stimulation des voies de signalisation

De nombreux protocoles utilisent des facteurs de croissance et cytokines pour mimer les voies de signalisation mises en jeu de façon séquentielle au cours de l'embryogénèse. Ainsi, des facteurs de croissance ou cytokines hématopoïétiques comme le BMP-4 (Chadwick et al., 2003; Zhang et al., 2008), Wnt3a (Wang and Nakayama, 2009), bFGF (Pick et al., 2007), VEGF (Cerdan et al., 2004; Kennedy et al., 2007; Pick et al., 2007), Flt3L, TPO, SCF (Srivastava et al., 2007), IL3, IL6 et d'autres encore vont activer des voies de signalisation impliquées dans le développement hématopoïétique telles que les voies Activin A/nodal ou Wnt/ β -caténine, améliorant ainsi la production de précurseurs/progénéiteurs CD34⁺ en systèmes de coculture ou d'EBs. En effet, la voie Activin/nodal est essentielle pour l'hématopoïèse primitive et il a été montré qu'une inhibition de cette voie aboutit à la génération d'une population enrichie en progénéiteurs définitifs (Kennedy et al., 2012). A l'inverse, l'inhibition précoce de la voie Wnt bloquerait le développement de l'hématopoïèse définitive (Sturgeon et al., 2014).

De façon très intéressante, Tian *et al.* en 2004 ont montré que l'effet de ces cytokines était différent selon la technique d'induction de l'hématopoïèse utilisée (coculture *versus* corps embryoïdes). Ainsi, la combinaison des cytokines SCF/Flt3L/TPO permettrait une différenciation hématopoïétique en système stromal (sans sérum) mais ne serait pas suffisante en système EB. L'ajout de BMP4 serait essentiel pour l'induction hématopoïétique efficace à partir des EBs, suggérant que les cellules stromales pourraient être une source de BMP4 (Tian et al., 2004).

Certaines équipes ont génétiquement modifié les cellules stromales afin de leur faire exprimer des activateurs de ces voies de signalisation : cellules stromales S17 ou M210 exprimant Wnt1 (Woll et al., 2008), et cellules stromales OP9 exprimant Wnt3 (OP9-W3a) ou le ligand *Delta-like 1* de la voie Notch (OP9-DL1) (Amabile et al., 2013) puisque la voie de signalisation Notch serait également impliquée dans le développement hématopoïétique (Bigas et al., 2010).

Expression forcée de facteurs de transcription

Une piste très intéressante pour produire des CSPH transplantables est d'induire l'expression de facteurs de transcription impliqués dans l'hématopoïèse. Kyba *et al.* ont ainsi montré en 2002 à partir de cellules ES murines que l'expression forcée dans les EBs du facteur de transcription HoxB4, gène impliqué dans l'auto-renouvellement des CSH définitives, permettait la formation de CSH possédant un potentiel de prise de greffe multi-lignée à long terme dans des souris immunodéficientes irradiées (Kyba et al., 2002). Cependant, l'efficacité de l'expression forcée de ce facteur dans les cellules souches pluripotentes humaines est controversée. Il a en effet été montré que l'expression ectopique d'HoxB4 améliorerait la différenciation hématopoïétique des cellules ES humaines et

l'expansion des cellules hématopoïétiques mais sans améliorer leur prise de greffe (Bowles et al., 2006; Lee et al., 2008; Wang et al., 2005b).

La surexpression dans des cellules ES humaines du facteur de transcription SOX17, impliqué dans la transition endothéliale-hématopoïétique et donc dans le développement de l'hématopoïèse définitive, a permis l'expansion des cellules CD34⁺CD45⁻ capables de donner naissance à des progéniteurs hématopoïétiques multi-lignée (Nakajima-Takagi et al., 2013). Ceci pourrait donc être une piste intéressante pour l'amplification des CSH à des fins thérapeutiques.

De même, Ran *et al.* ont montré que l'expression forcée ectopique dans des cellules ES et iPS humaines de RunX1a, un régulateur positif des gènes impliqués dans l'hématopoïèse, améliorerait la production de CSPH ainsi que leur expansion *in vitro* et leur potentiel de reconstitution multi-lignée après transplantation dans la MO de souris immunodéficientes (Ran et al., 2013).

Conditions de culture

Les conditions de culture peuvent également jouer un rôle important dans la différenciation hématopoïétique. Dans l'organisme humain, les CSH sont présentes dans une niche hypoxique. Il a ainsi été montré une amélioration de la différenciation hématopoïétique des hPSCs en condition hypoxique (5 % CO₂) par rapport à une différenciation se déroulant en condition normoxique (Salvagiotto et al., 2011).

3. La modélisation physiopathologique de la CGD grâce aux cellules iPS

3.1. Production de neutrophiles et macrophages à partir des cellules souches ES et iPS

Depuis les premiers essais sur les cellules ES murines, de nombreux protocoles de différenciation hématopoïétique ont été développés pour obtenir des neutrophiles et des macrophages à partir de hPSCs. Ces méthodes impliquent toutes la production de progéniteurs hématopoïétiques qui sont ensuite différenciés en cellules matures. La majorité des méthodes de différenciation utilisent des protocoles en plusieurs étapes pouvant associer différentes techniques comme la coculture avec des cellules stromales murines OP9, la formation de corps embryoïdes, la culture en suspension... Le principe général des différents protocoles publiés pour la production de neutrophiles et macrophages à partir de cellules iPS humaines uniquement est récapitulé dans la Figure 12.

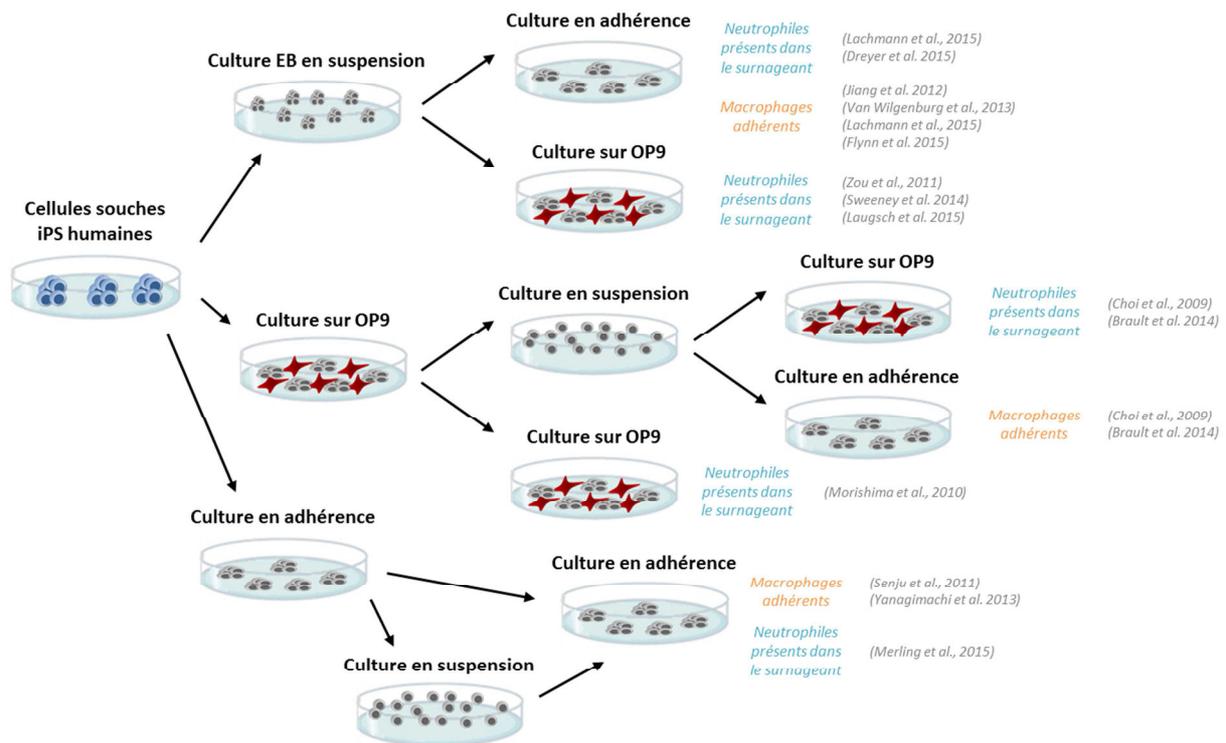


Figure 12. Principe général des protocoles de différenciation hématoïétique des cellules souches iPS humaines en neutrophiles et macrophages.

A chaque étape de culture, des cytokines différentes permettent d’orienter la différenciation hématoïétique vers le type cellulaire désiré, et sont celles intervenant dans l’hématopoïèse physiologique (Figure 11). La combinaison de cytokines utilisées ainsi que leur concentration sont très variables d’un protocole à l’autre. De façon unanime cependant, le G-CSF et le M-CSF sont ajoutés en fin de différenciation car ces deux cytokines sont essentielles à la différenciation terminale en cellules matures neutrophiles et macrophages respectivement.

- Génération de neutrophiles

Nous avons comparé les différents protocoles issus de la littérature pour la différenciation des hPSCs en neutrophiles matures, ainsi que les rendements obtenus et les durées de culture nécessaires à leur obtention. Leurs caractéristiques sont indiquées dans le Tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1. Protocoles de production de neutrophiles à partir des cellules souches pluripotentes murines et humaines.

	Auteur	Type de PSC et origine	Protocole de différenciation	Rendement de production	Pureté des cellules produites	Durée de la différenciation
NEUTROPHILES	Lieber <i>et al.</i> 2004	ES murines	EB J8 dissociés puis transférés sur OP9 à deux reprises	8x10 ⁴ mES → 6x10 ⁵ PNN (expansion = 125 fois)	75-96 %	15-31 j
	Saeki <i>et al.</i> 2009	ES humaines	EB J3 transférés sur un disque de gélatine et cultivés en adhérence pendant 40 j	4x10 ⁵ hES → 4x10 ⁶ PNN (expansion = 1 fois)	30-50 %	43 j
	Yokoyama <i>et al.</i> 2009	ES humaines	EB J17 dissociés et transférés sur OP9 pendant 7 j, puis remise en culture des cellules en suspension sur OP9 pendant 10 j	expansion = 1,7 fois	70-80 %	34 j
	Choi <i>et al.</i> 2009	ES et iPS humaines	Coculture hES ou hiPS sur OP9 pendant 9 j, dissociation et isolement de cellules lin ⁺ CD34 ⁺ CD45 ⁺ , culture 2 j en suspension et tri puis transfert sur OP9 pendant 8-10 j	expansion = 60 fois à partir des cellules hES	non précisé	19-21 j
	Morishima <i>et al.</i> 2010	iPS humaines	Coculture hiPS sur OP9 pendant 10 j puis isolement de cellules Tra-1-85 ⁺ CD34 ⁺ VEGFR2 ^{high} et transfert sur OP9 pendant 20 j puis 10 j	expansion = 4 fois à partir des cellules isolées à J10	38 %	40 j
	Mukherjee <i>et al.</i> 2011	iPS murines	EB J6 transférés sur du collagène IV pendant 4 j et isolement des cellules Flk1 ⁺ puis culture sur OP9 pendant 7 j. Mise en culture des cellules en suspension dans de la méthylcellulose pendant 7-14 j	non précisé	80 %	24-31 j
	Zou <i>et al.</i> 2011 Sweeney <i>et al.</i> 2014	iPS humaines	Protocole de Yokoyama <i>et al.</i> légèrement modifié (milieu et cytokine)	non précisé	30-40 %	34 j
	Brault <i>et al.</i> 2014	iPS humaines	Protocole de Choi <i>et al.</i> modifié : coculture hiPS sur OP9 pendant 10 j, dissociation et isolement de cellules CD34 ⁺ , culture 4 j en suspension puis sur OP9 pendant 11 j	10x10 ⁵ hiPS → 3x10 ⁵ PNN	50-70 %	25 j
	Merling <i>et al.</i> 2015	iPS humaines	Culture en adhérence des cellules hiPS pendant 13 j puis expansion en suspension pendant 6-7 j et enfin culture sur cellules OP9 ou non pendant 6-7 j	non précisé	non précisé (mixture de granulocytes, neutrophiles prédominants)	25-27 j
	Lachmann <i>et al.</i> 2015 Dreyer <i>et al.</i> 2015	iPS humaines	EB J5 cultivés en adhérence pendant 10-15 j (et jusqu'à 2-3 mois). Les cellules en suspension sont ensuite différenciées pendant 7 j.	4-5x10 ⁵ PNN/puits/semaine pendant > 7 semaines	36 % 14-30 %	≈ 27 j
	Lausch <i>et al.</i> 2015	iPS humaines	EB J18-20 dissociés et transférés sur OP9 pendant 8-10 j, puis remise en culture des cellules en suspension pendant 18-24 j	non précisé	non précisé (>90 % de cellules myéloïdes CD13 ⁺)	43-44 j

Il semble plus facile de produire des neutrophiles à partir de cellules ES plutôt qu'iPS, et à partir de cellules murines plutôt qu'humaines. Le rendement de ces protocoles à partir des cellules iPS humaines est donc globalement faible, avec un pourcentage de pureté d'environ 50 % seulement. La durée d'obtention des neutrophiles est variable et oscille entre 20 et 40 jours. Seul le protocole récemment publié par Lachmann *et al.* permet une production prolongée de neutrophiles pendant plusieurs semaines (Lachmann *et al.*, 2015). De plus, il présente l'avantage d'être réalisé entièrement sans cellules stromales murines, ce qui également le cas pour le protocole de Merling *et al.* alors que tous les autres protocoles publiés impliquent une étape de coculture avec les cellules OP9 (Merling *et al.*, 2015). Cependant, la pureté en neutrophiles produits dans ces deux protocoles doit encore être améliorée.

- Génération de macrophages

Nous avons comparé les différents protocoles issus de la littérature pour la différenciation des hPSCs en macrophages matures, ainsi que les rendements obtenus et les durées de culture nécessaires à leur obtention. Leurs caractéristiques sont indiquées dans le Tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2. Protocoles de production de macrophages à partir des cellules souches pluripotentes murines et humaines.

	Auteur	Type de PSC et origine	Protocole de différenciation	Rendement de production	Pureté des cellules produites	Durée de la différenciation
MACROPHAGES	Lieschke <i>et al.</i> 1995	ES murines	EB J9-12 transférés en culture adhérente	7500 mES → 10 ⁵ mO		
	Moore <i>et al.</i> 1998	ES murines	EB J10-12 transférés en culture adhérente puis récupération des cellules en suspension tous les 2 j et transfert en adhérence pendant 3-5 j	non précisé production continue	> 90 %	non précisé (> 15 j)
	Lindmark <i>et al.</i> 2004	ES murines	Protocole de Moore <i>et al.</i> : EB J11 dissociés et transférés en culture adhérente pendant 10 j	non précisé	> 90 %	21 j
	Anderson <i>et al.</i> 2006	ES humaines	hES cultivées sur cellules S17 pendant 15-17 j puis isolement des CD34 ⁺ et transfert en méthylcellulose pendant 14 j, puis culture en suspension des colonies pendant 12-15 j	non précisé	> 99 %	≈ 41-45 j
	Odegaard <i>et al.</i> 2007	ES humaines	EB J6-8 dissociés et remis en culture pendant 2 j. Les cellules non adhérentes sont transfectées (rétrovirus) et amplifiées (durée illimitée), puis culture adhérente pendant 6-7 j	200-300x10 ⁶ mO/semaine (expansion=10-15 fois)	non précisé (population homogène)	non précisé (> 14 j)
	Karlsson <i>et al.</i> 2008	ES humaines	EB J3 cultivés en adhérence pendant 18 j en moyenne puis les monocytes du surnageant sont cultivés en adhérence pendant 6 j	1x10 ⁷ monocytes/plaque/semaine pendant 1-3 semaines	> 90 %	≈ 27 j
	Subramanian <i>et al.</i> 2009	ES humaines	CD34 ⁺ obtenus à partir d'EB J15 (ou de culture hES sur OP9 J10) sont cultivés en adhérence pendant 8-9 j puis pendant 5-6 j	1x10 ⁶ CD34 ⁺ → 4-4,5 10 ⁹ monocytes	≈ 60 %	26-30 j
	Choi <i>et al.</i> 2009 Choi <i>et al.</i> 2011	ES et iPS humaines	Coculture hES ou hiPS sur OP9 pendant 9 j, dissociation et isolement de cellules lin ⁻ CD34 ⁺ CD45 ⁺ , culture 8 j en suspension puis tri et culture en suspension pendant 5-7 j	expansion = 18 fois à partir des cellules hES	non précisé	22-24 j
	Senju <i>et al.</i> 2009	iPS murines	Coculture miPS sur OP9 pendant 6-7 j puis dissociation et remise en culture sur OP9 pendant 6 j puis les cellules en suspension sont cultivées en condition adhérente (? j)	non précisé	non précisé	non précisé (> 14 j)
	Senju <i>et al.</i> 2011	iPS humaines	Protocole ① : coculture hiPS sur OP9 pendant 14-18 j puis dissociation et culture des cellules non adhérentes pendant 10-14 j puis à nouveau 8 j en condition adhérente / Protocole ② : hiPS cultivées en adhérence pendant 25-28 j puis, après dissociation, culture pendant 10-15 j et transfert des cellules en suspension en culture adhérente pendant > 15 j	non précisé	non précisé	> 5 semaines
	Jiang <i>et al.</i> 2012	iPS humaines	Protocole de Karlsson <i>et al.</i> modifié : EB 3 j cultivés en adhérence puis apparition de monocytes dans le surnageant pendant 5-8 semaines qui sont cultivés en adhérence pendant 8 j	8-12x10 ⁶ monocytes en 5-8 semaines	non précisé	≈ 27 j
	Yanagimachi <i>et al.</i> 2013	ES et iPS humaines	Cellules iPS ou ES cultivées en adhérence pendant 16-28 j avec différents milieux puis tri des monocytes CD14 ⁺ et culture en adhérence pendant 7j.	1,3x10 ⁶ monocytes/30 colonies tous les 3-4 j pendant 10-15 j	non précisé	23-35 j
	van Wilgenburg <i>et al.</i> 2013	ES et iPS humaines	Protocole de Karlsson <i>et al.</i> modifié : EB 4 j cultivés en adhérence avec apparition de monocytes dans le surnageant après 15 j, transfert en culture adhérente pendant 5-7 j	> 1x10 ⁷ monocytes/plaque en 8 semaines (ES) ou en 3 mois (iPS). Jusqu'à 1 an de culture	non précisé	> 24-26 j
	Braut <i>et al.</i> 2014	iPS humaines	Coculture hiPS sur OP9 pendant 10 j, dissociation, culture 11 j en suspension puis en adhérence pendant 6-7 j	1x10 ⁶ hiPS → 3x10 ⁶ mO	> 90 %	27-28 j
	Lachmann <i>et al.</i> 2015	iPS humaines	EB J5 cultivés en adhérence pendant 10-15 j (et jusqu'à 2-3 mois) puis remise en culture des cellules en suspension en culture adhérente pendant 7-10 j	0,5-1x10 ⁶ mO/puits/semaine pendant > 2 mois	non précisé	27-30 j
	Flynn <i>et al.</i> 2015	iPS humaines	Protocole de van Wilgenburg <i>et al.</i> 2013	non précisé	non précisé	> 24-26 j

Les macrophages semblent être obtenus plus facilement que des neutrophiles. Probablement grâce à la dernière étape de différenciation réalisée en adhérence qui permet leur sélection (6-8 j en présence de M-CSF) et leur pureté atteint alors plus de 90 % dans la majorité des articles (quand elle est précisée). Globalement, le temps minimum pour produire des macrophages est d'environ 25-30 j. Il est surtout important de noter que certains protocoles tels que celui développé par Karlsson *et al.* en 2008 (Karlsson *et al.*, 2008) et utilisé tel quel ou modifié (Flynn *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2012; Wilgenburg *et al.*, 2013) permettent une production prolongée et en grande quantité de monocytes/macrophages.

Pour conclure sur ces différents protocoles de différenciation en neutrophiles ou en macrophages, l'induction de la différenciation hématopoïétique grâce à la formation des corps embryoïdes est employée plus fréquemment que la culture avec des cellules OP9. Il est en effet évident que, pour une application de thérapie cellulaire, il est indispensable de disposer de méthodes de différenciation sans cellules stromales et sans sérum. Plusieurs équipes ont donc développé des protocoles mieux définis, sans sérum ni cellules stromales, permettant ainsi la production de cellules neutrophiles ou macrophages utilisables chez l'Homme en thérapie (Merling et al., 2015; Senju et al., 2011; Wilgenburg et al., 2013; Yanagimachi et al., 2013).

3.2. Production de neutrophiles et macrophages modélisant la CGD

Parmi les différentes équipes citées ci-dessus, certaines ont utilisé des cellules de patients (ou de souris) CGD reprogrammées en cellules iPS afin de produire des neutrophiles et/ou macrophages modélisant différentes formes génétiques de CGD. Certains de ces modèles cellulaires ont même été utilisés pour développer de nouvelles approches de thérapie génique (Tableau 3).

Tableau 3. Neutrophiles et macrophages modèles de CGD à partir de cellules iPS murines et humaines et développement de nouvelles stratégies de thérapie génique

	Cellules d'origine	Forme de CGD	Anomalies génétiques modélisées	Modèle cellulaire	Correction génétique
Mukherjee et al. 2011	fibroblastes murins (biopsie)	CGDX ^o	KO <i>CYBB</i>	Neutrophiles	Insertion d'un transgène optimisé gp91 ^{pmox} dans les EB J6 par un lentivirus SIN
Zou et al. 2011	cellules souches mésenchymateuses humaines (moelle osseuse)	CGDX ^o	<i>CYBB</i> : mutation ponctuelle 458T>G dans l'exon 5	Neutrophiles	Insertion d'un minigène <i>CYBB</i> non muté dans le locus AAVS1 grâce à la technique d'édition du génome ZFN
Jiang et al. 2012	fibroblastes humains (biopsie)	CGDX ⁺	<i>CYBB</i> : mutation ponctuelle dans l'intron 1 (-11T>G)	Macrophages	X
		CGDX ^o	<i>CYBB</i> : large délétion incluant les exons 1 à 3		
		CGDAR47 ^o	<i>NCF1</i> : délétion GT au début de l'exon 2		
Brault et al. 2014	fibroblastes humains (biopsie)	CGDX ^o	<i>CYBB</i> : mutation ponctuelle non-sens 469C>T dans l'exon 5	Neutrophiles et macrophages	X
		CGDAR22 ^o	<i>CYBA</i> : délétion c.295_301 delGTGCCCG dans l'exon 5		
		CGDAR47 ^o	<i>NCF1</i> : délétion GT au début de l'exon 2		
Merling et al. 2015	cellules CD34 ⁺ humaines (sang périphérique) cf Merling et al. 2013	CGDX ^o	<i>CYBB</i> : mutation ponctuelle non-sens 217C>T dans l'exon 3	Neutrophiles et macrophages (sauf CGDX)	Correction génétique basée sur le vecteur développé par Zou et al. : cinq vecteurs créés, chacun d'eux apportant l'un des 5 gènes pouvant être muté dans la CGD
		CGDAR22 ^o	<i>CYBA</i> : mutation ponctuelle 288G>T dans l'intron 4		
		CGDAR47 ^o	<i>NCF1</i> : délétion GT au début de l'exon 2		
		CGDAR67 ^o	<i>NCF2</i> : mutation ponctuelle 1A>G (exon 1) et délétion de 14 bases (exon 4)		
		CGDAR40 ⁺	<i>NCF4</i> : mutation ponctuelle 6447G>A (exon 4) et duplication 3957-3966 (exon 3)		
Flynn et al. 2015	fibroblastes humains (biopsie) cf Jiang et al. 2012	CGDX ⁺	<i>CYBB</i> : mutation ponctuelle dans l'intron 1 (-11T>G)	Macrophages	Correction ponctuelle de la mutation dans le gène <i>CYBB</i> endogène grâce au système CRISPR-Cas9
Dreyer et al. 2015	cellules CD34 ⁺ humaines	CGDX ^o	<i>CYBB</i> : délétion des exons 2 et 3	Neutrophiles	Insertion d'un minigène <i>CYBB</i> non muté dans le locus AAVS1 grâce à la technique d'édition du génome TALEN, expression myéloïde spécifique
Lausch et al. 2015	kératinocytes	CGDX ^o	<i>CYBB</i> : double mutation c.958delG et c.962T>G dans l'exon 5	Neutrophiles	Deux stratégies : - transposon <i>piggyBac</i> avec un BAC transportant le gène <i>CYBB</i> - thérapie ciblée par recombinaison homologue (vecteur BAC)

Mukherjee *et al.* en Angleterre ont été les premiers à générer des cellules iPS CGDX à partir de fibroblastes de souris CGDX (Mukherjee *et al.*, 2011). La correction génétique a été réalisée avec succès sur les EBs J6 par transfection de l'ADNc fonctionnel de NOX2 à l'aide d'un vecteur lentiviral SIN. Des neutrophiles capables de produire des FRO ont ainsi été obtenus après différenciation hématopoïétique des EBs corrigés.

L'équipe de Malech aux Etats-Unis a utilisé des cellules iPS reprogrammées à partir de cellules souches mésenchymateuses issues de la MO d'un patient mâle adulte atteint de CGDX (Zou *et al.*, 2011b). Ils ont été les premiers à montrer que les neutrophiles différenciés à partir de patients CGD modélisent parfaitement le phénotype oxydase-négatif retrouvé chez ces patients. La correction génétique a été directement réalisée sur les cellules iPS grâce à la technologie d'édition du génome utilisant les nucléases à doigt de zinc ZFN (Zou *et al.*, 2009). Récemment, cette même équipe a publié la production de neutrophiles et macrophages à partir de cellules iPS reprogrammées à partir de CD34⁺ issues du sang périphérique de patients atteints des 5 formes génétiques de CGD (Merling *et al.*, 2013). Des neutrophiles et macrophages p67^{phox} et p40^{phox} sont donc à présent modélisés. Ils ont montré que leur approche d'édition du génome par ZFN développée en 2011 sur les cellules iPS CGDX était efficace sur les 5 formes génétiques en permettant la production de cellules phagocytaires corrigées capables de produire des FRO (Merling *et al.*, 2015).

C'est en 2012 que Jiang *et al.* ont réussi la modélisation de macrophages CGD pour la première fois (Jiang *et al.*, 2012). Ils ont ainsi généré une lignée iPS à partir des fibroblastes d'un patient CGDAR47 et deux lignées issues de deux patients CGDX qu'ils ont ensuite différenciés en macrophages selon une méthode publiée précédemment (Karlsson *et al.*, 2008). Il y a quelques mois, une approche de correction génétique basée sur l'utilisation de CRISPR-Cas9 a été réalisée avec succès sur les macrophages CGDX par cette équipe. Cette nouvelle technique a permis de corriger la mutation directement dans le gène *CYBB* du patient et de restaurer ainsi l'activité NADPH oxydase et la production de FRO uniquement dans les macrophages (Flynn *et al.*, 2015).

En 2014, nous avons publié pour la première fois l'obtention de neutrophiles et macrophages CGDAR22 ainsi que des neutrophiles CGDAR47 (Brault *et al.*, 2014). De plus, notre travail a permis une vraie quantification du rendement de production et une amélioration de la pureté des neutrophiles produits à partir de cellules iPS humaines (Tableaux 1 et 2). Ce travail sera développé dans la partie introductive de l'article 1.

Très récemment, des neutrophiles CGDX produits grâce à leur protocole développé auparavant (Lachmann *et al.*, 2015) ont été corrigés par la technologie TALEN. Par rapport aux techniques ZFN publiées plus tôt, ils ont montré que la technologie TALEN est moins toxique que les ZFN et donc plus

efficace pour corriger les cellules iPS. De plus, ils ont limité l'expression de gp91^{phox} à la lignée myéloïde, évitant ainsi une expression inappropriée de FRO dans les CSH (Dreyer et al., 2015).

Enfin, il y a quelques mois, une nouvelle équipe a testé deux approches différentes pour restaurer l'activité NADPH oxydase de neutrophiles CGDX : la 1^{ère} approche utilise le système transposon/transposase *piggyBac* qui permet l'intégration aléatoire d'une seule copie du chromosome bactérien BAC contenant la séquence fonctionnelle du gène *CYBB*, et la 2^{nde} approche repose sur le mécanisme de recombinaison homologue pour corriger directement au niveau du gène *CYBB* grâce également à un vecteur BAC (Laugsch et al., 2015).

Les cellules iPS sont un outil très puissant pour la modélisation physiopathologique et permettent des études sur des formes génétiques rares (seulement 1 cas de patient CGDAR40 à ce jour). De plus, elles sont essentielles au développement de nouvelles thérapies, notamment les approches de thérapie génique, afin d'améliorer leur efficacité et leur sécurité avant leur utilisation en clinique chez l'Homme. Une nouvelle approche thérapeutique par transfert protéique que nous développons dans le laboratoire TheREx sera abordée dans le Chapitre III ainsi que dans la partie introductive de l'article 2.

4. Les souris humanisées

La souris est un bon modèle animal facile à manipuler (taille réduite et entretien facile) et avec un développement rapide (temps de génération court). Cependant, même si la souris est un mammifère qui partage des caractéristiques physiologiques communes avec l'Homme, les modèles murins peuvent parfois ne pas modéliser parfaitement le système humain. De plus, certains agents pathogènes pour l'Homme ne le sont pas pour la souris. Ainsi ce modèle animal ne permet pas toujours d'étudier la physiopathologie d'une maladie et n'est pas toujours pertinent pour tester de nouvelles thérapies dans le contexte d'études pré-cliniques.

L'« humanisation » des souris a été initiée dans les années 1980. Le terme « souris humanisées » se rapporte à des souris immunodéficientes qui ont été greffées avec des cellules souches ou des tissus humains et/ou modifiées génétiquement pour exprimer un gène humain (pour revue sur les souris humanisées génétiquement, voir (Scheer et al., 2013)). Les premiers types d'humanisation concernaient le système immunitaire (et c'est ce qui nous intéresse dans ce travail), mais il est aussi possible de créer des souris avec des organes humains (foie, pancréas, poumons, intestins, peau...) (Brehm et al., 2014). Pour que l'humanisation des souris avec des cellules souches ou des tissus humains soit possible, il faut éliminer les cellules murines pour que les cellules humaines puissent se

greffer à leur place. Cela peut être réalisé par irradiation par exemple pour la transplantation de CSH, par l'ablation des cellules murines directement ou par modification génétique de la souris.

4.1. Humanisation du système immunitaire

L'objectif du développement de modèles murins possédant un système immunitaire humanisé est de mimer le plus étroitement possible les fonctions immunes et hématologiques humaines. Ces souris sont dites souris HIS (*Humanized immune system*) ou HHLS (*Human hemato-lymphoid system*). Elles représentent de puissants outils pour investiguer l'hématopoïèse et l'immunité humaines normales mais également pathologiques, pour étudier les mécanismes d'infections par des agents pathogènes ainsi que pour tester de nouvelles molécules thérapeutiques.

Seules des souris immunodéficientes sont utilisables pour la transplantation de tissus ou cellules d'origine humaine du fait de l'absence de lymphocytes T et B murins et surtout de cellules NK dont la présence limite la prise de greffe des cellules humaines (Shultz et al., 2003). Nous détaillerons ci-dessous les différents modèles de souris immunodéficientes disponibles pour la génération de souris humanisées ainsi que les limites et améliorations de ces modèles.

4.1.1. Souris immunodéficientes SCID et NOD/SCID

L'histoire des souris immunodéficientes utilisées pour la reconstitution d'un système hémato-lymphoïde humain a réellement commencé en 1983 avec la création des premières souris C.B-17-Prkdc^{scid} (SCID, *severe combined immunodeficiency*) et NOD (*non-obese diabetic*)-SCID qui ne produisent pas de cellules T et B à cause de mutations dans le gène *PRKDC* (*protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide*) impliqué dans la réparation de l'ADN et donc nécessaire pour le réarrangement des récepteurs des cellules T et B (Bosma et al., 1983; Greiner et al., 1995; Prochazka et al., 1992; Shultz et al., 1995). Les souris NOD/SCID ont montré une meilleure efficacité de reconstitution hémato-lymphoïde que les souris SCID (Greiner et al., 1995). Cependant, elles conservent une activité de cellules NK qui ne permet pas une prise de greffe optimale (McCune et al., 1988; Shultz et al., 1995). L'efficacité de la prise de greffe peut être améliorée en traitant les souris NOD/SCID avec des anticorps anti-asialo GM1 (*ganglioside-monosialic acid*) qui inhibent complètement l'activité des cellules NK (Yoshino et al., 2000), ou en créant des souris NOD/SCID homozygotes mutées par exemple pour le gène de la β_2 -microglobuline (NOD/SCID/ β_2m^{null}), une protéine nécessaire pour l'immunité innée par le CMH de classe I (Christianson et al., 1997; Kollet et al., 2000). Cependant, dans les souris NOD/SCID, la production de cellules myéloïdes est imparfaite et les cellules lymphoïdes sont non fonctionnelles. De plus, ces souris développent rapidement des lymphomes thymiques, ce qui raccourcit considérablement leur durée de vie (8-9 mois) (Shultz et al., 1995).

4.1.2. Souris immunodéficientes NOG, NSG et BRG

A partir des années 2000, des lignées de souris complètement déficientes en cellules NK ont été développées grâce à l'introduction de mutations ($IL2R\gamma^{-/-}$) ou à l'absence ($IL2R\gamma^{null/null}$) de la chaîne γ du récepteur de l'IL2 (et d'autres cytokines également) indispensable au développement des cellules NK, associées ou non à des mutations dans les gènes Rag1 et 2 (*recombination activating gene*) empêchant les recombinaisons V(D)J nécessaires au développement des cellules T et B (Figure 13). Ces 3 lignées murines sont les suivantes : NOG (NOD/SCID/ $\gamma c^{-/-}$) (Ito et al., 2002), NSG (NOD/SCID/ $IL2R\gamma^{null}$) (Ishikawa et al., 2005; Shultz et al., 2005) et BRG (BALB/c-Rag2 $^{-/-}$ $IL2R\gamma^{-/-}$ ou BALB/c-Rag1 $^{-/-}$ $IL2R\gamma^{-/-}$) (Brehm et al., 2010a; Traggiai et al., 2004), ces dernières présentant en plus une mutation dans le gène Rag1 ou Rag2. Les souris NOG, NSG et BRG se sont révélées bien plus efficaces que les lignées précédentes en termes d'efficacité de prise de greffe des cellules humaines. De plus, elles sont génétiquement très stables, ne développent pas de tumeurs spontanément et possèdent donc une durée de vie plus longue (> 15 mois). Elles ne sont cependant pas équivalentes entre elles en termes de reconstitution hémato-lymphoïde. Par exemple, les souris NSG et BRG sont équivalentes pour le développement des lymphocytes B alors qu'il a été montré que les souris NOG/NSG étaient plus efficaces pour le développement des lymphocytes T que les souris BRG (Brehm et al., 2010a; Lepus et al., 2009). Cette différence est due au fond génétique NOD des souris NOG et NSG plus permissif résultant d'un polymorphisme dans le gène codant le récepteur SIRP α (*signal regulatory protein alpha*) (Takenaka et al., 2007). En effet, lorsque ce récepteur (exprimé par les macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques et certaines cellules progénitrices hématopoïétiques) est activé par son ligand CD47, cela induit un signal négatif « *Don't eat me* » inhibant la phagocytose par les macrophages. Or, le CD47 humain présent sur les cellules transplantées a une faible affinité pour le récepteur SIRP α murin, ce qui entraîne leur phagocytose par les phagocytes murins. Le polymorphisme présent chez les souris NOG et NSG améliore la capacité de SIRP α à lier le CD47 humain et induit donc une tolérance par les macrophages, ce qui permet alors une meilleure prise de greffe des CSH humaines.

4.1.3. Modalités et suivi de la transplantation

En plus de la sélection de la lignée murine la plus pertinente pour la transplantation, d'autres paramètres sont à choisir afin de générer des souris humanisées, comme le conditionnement de la souris ainsi que le type de cellules et la voie d'injection (Figure 13). En effet, le pré-conditionnement de la souris receveuse est généralement nécessaire et peut être réalisé par irradiation gamma ou rayon X, ou chimiquement par traitement au busulfan (Hayakawa et al., 2009). L'humanisation de ces souris peut être obtenue par transplantation de tissus hématopoïétiques fœtaux comme le foie ou le thymus, ou de CSPH humaines CD34 $^{+}$ issues de sang de cordon, de foie fœtal, plus efficace pour la

génération de souris HIS (Lepus et al., 2009), mais également de moelle osseuse et de sang périphérique après mobilisation avec du G-CSF. L'injection des CSPH dans les souris nouveau-nés est généralement réalisée par voie intrahépatique, intracardiaque ou intraveineuse (veine faciale), alors que dans des souris adultes elle se fait préférentiellement par voie intraveineuse (veine de la queue) (Ishikawa et al., 2005; Ito et al., 2002; Traggiai et al., 2004). Les CSPH ayant un fort tropisme pour la moelle osseuse, leur injection systémique va conduire à leur *homing* dans la moelle osseuse de la souris. L'injection des CSPH dans les souris nouveau-nés mimerait mieux le développement hématopoïétique humain, et il a été montré que le taux de prise de greffe était bien plus élevé qu'en utilisant des souris adultes (Brehm et al., 2010b).

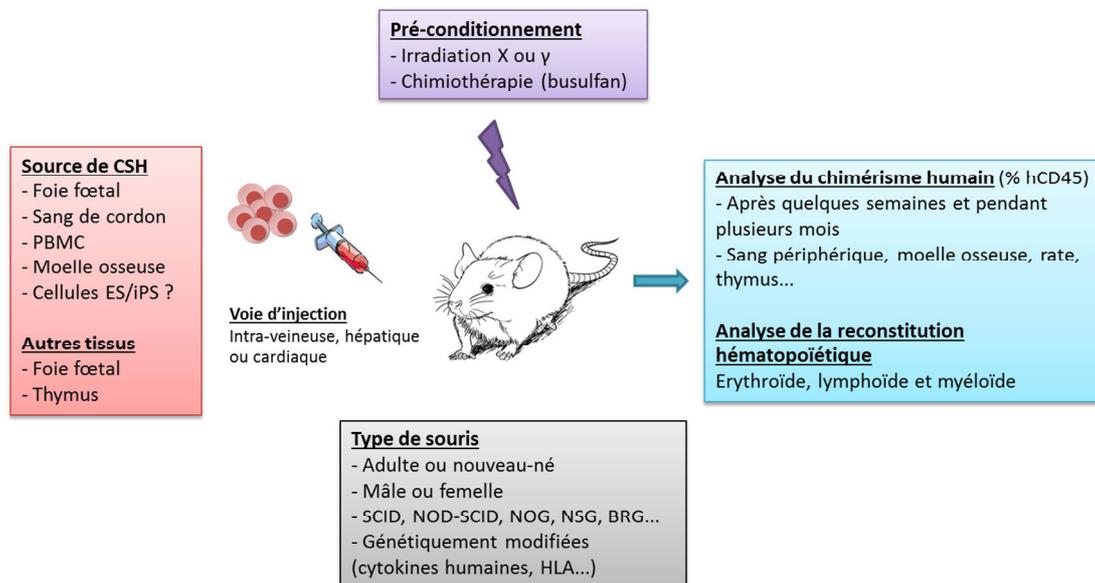


Figure 13. Les modalités de génération de souris possédant un système immunitaire humain.

La reconstitution hémato-lymphoïde chez la souris immunodéficiente receveuse est généralement analysée à partir de 2-3 mois post-greffe et se traduit notamment par la présence de cellules humaines dans la moelle osseuse, la production de cellules hématopoïétiques matures circulantes (lymphocytes T et B, monocytes/macrophages, cellules NK, cellules dendritiques...), la colonisation des organes lymphoïdes primaires et secondaires (rate, ganglions lymphatiques) et même d'autres organes comme le foie, les poumons, le cerveau, la peau, l'intestin... Ainsi, dans les modèles humanisés NOG, NSG ou BRG, des taux de 30-60 % de cellules CD45⁺ humaines peuvent être retrouvés dans le sang circulant, et maintenus pendant 6-9 mois. Puis, la production de cellules humaines commence à décliner (Legrand et al., 2008).

4.1.4. Limites des modèles de souris humanisées et améliorations des lignées murines

Les souris NOG, NSG et BRG sont les plus couramment utilisées pour obtenir des souris HIS car elles permettent une bonne reconstitution hémato-lymphoïde. Cependant, avec ces lignées, il n'y a pas ou

peu de production de neutrophiles (< 2-3 % des leucocytes humains), de globules rouges ou de plaquettes, le développement de certaines cellules reste incomplet (notamment les lymphocytes T)... L'hypothèse est que, bien qu'il existe des réactivités croisées entre les cytokines murines et humaines, l'action des cytokines murines ne serait pas optimale pour la reconstitution hématopoïétique par les CSH humaines. Ainsi, des lignées de souris NOG, NSG ou BRG ont été modifiées génétiquement pour sécréter à des niveaux quasi physiologiques des cytokines hématopoïétiques humaines afin de créer un environnement plus favorable pour les cellules transplantées (Figure 13). Grâce à l'expression endogène de cytokines humaines comme TPO, SCF, GM-CSF, IL3 et M-CSF certaines lignées ont obtenu une prise de greffe plus élevée et prolongée (> 6 mois) ainsi que le développement de la lignée myéloïde (granulocytes, macrophages...) et/ou des lymphocytes T dans la moelle osseuse, la circulation sanguine ou dans les tissus (Billerbeck et al., 2011; Brehm et al., 2012; Rathinam et al., 2011; Rongvaux et al., 2011, 2014; Takagi et al., 2012; Willinger et al., 2011).

4.2. Applications des souris avec un système immunitaire humanisé

Aucun modèle murin humanisé n'est parfait, leurs particularités ont été présentées précédemment. Ainsi, en fonction de la question posée, les chercheurs doivent choisir le modèle le plus approprié pour y répondre. Les applications des souris humanisées sont très nombreuses et les exemples présentés ici ne sont donc pas exhaustifs.

- Transplantation

Les souris humanisées NOD/SCID, NOG et BRG sont de très bons modèles pour étudier le phénomène de maladie du greffon contre l'hôte (GvHD, aiguë et chronique) qui apparaît fréquemment après une transplantation de moelle osseuse allogénique, mais également le rejet de greffe après transplantation d'un organe solide (Brehm and Shultz, 2012; Hogenes et al., 2014). Modéliser ces phénomènes permet ainsi de tester de nouveaux traitements pour les réduire, et surtout à terme d'améliorer la transplantation chez l'Homme.

- Maladies infectieuses

Les modèles de souris humanisées représentent également un outil inestimable pour étudier la pathogénèse de certains agents infectieux, qu'ils soient d'origine virale, bactérienne ou parasitaire, et permettre le développement de nouveaux traitements ou de vaccins.

Les souris immunodéficientes se sont révélées très utiles pour modéliser des infections par des agents lymphotropes comme le virus VIH (Marsden and Zack, 2015), HTLV-1, CMV, EBV, HSV, le virus de la dengue, influenza A... où les lymphocytes humains circulants sont la cible des agents

pathogènes (Münz, 2014). Pour les virus dits hépatotropes comme les virus de l'hépatite B (HBV) et C (HCV), de nouveaux modèles humanisés pour le système immunitaire et le foie permettent d'étudier à la fois la pathogénèse et la réponse immune humaine (Washburn et al., 2011).

Des modèles humanisés d'infections bactériennes ont également été développés tels que des modèles mimant des infections à *Staphylococcus aureus* (Knop et al., 2015) ou à *Salmonella typhi*, une bactérie qui ne cause habituellement pas d'infection chez la souris (Song et al., 2010).

Concernant les parasites, la malaria est l'une des infections les plus répandues dans le monde. Les souris humanisées ont été très utilisées pour étudier le développement de *Plasmodium falciparum* (Kaushansky et al., 2014). En 2014, un nouveau modèle de souris humanisées a été créé pour modéliser le cycle de vie complet de *P. falciparum* (Wijayalath et al., 2014).

- Cancérologie

Les souris NOG et NSG sont de bons outils pour modéliser les cancers humains car la croissance tumorale est très rapide, et le taux de prise de greffe est généralement élevé grâce à un environnement permissif dû à l'absence de cellules NK murines. Les souris immunodéficientes permettent ainsi d'étudier la biologie des tumeurs et leur croissance, les mécanismes d'angiogénèse et de métastase mais également de développer de nouvelles approches d'imagerie et de traitements anti-cancéreux. De nombreux cancers humains comme des lymphomes, leucémies, mélanomes, cancers du sein, du poumon, du pancréas, ou des neuroblastomes ont ainsi été implantés dans ces souris immunodéficientes (Zhou et al., 2014).

4.3. Souris avec un système immunitaire humain grâce aux hPSCs

La transplantation dans des souris immunodéficientes est le seul moyen de prouver la production de « vraies » cellules souches hématopoïétiques (ou SRC). Le Tableau 4 présente ainsi les approches utilisées ainsi que les résultats obtenus en termes de prise de greffe (ou taux de chimérisme) et de reconstitution hématopoïétique à partir des cellules ES et iPS.

Tableau 4. Comparaison des protocoles utilisés pour produire des souris humanisées à partir des cellules ES humaines et des cellules iPS murines et humaines.

Source de PSC	Méthode de différenciation	Type de cellules injectées	Voie de transplantation et quantité de cellules injectées	Modèle animal (dose d'irradiation)	Taux de chimérisme et reconstitution hématopoïétique	Référence
Cellules ES humaines	Formation d'EB J10 et isolement de cellules PECAM-1 ⁺ Flk1 ⁺ VE-cadherin ⁺ CD45 ⁺ puis culture sur fibronectine pendant 7 j avec cytokines	Cellules hématopoïétiques CD45 ⁺ surexprimant HoxB4	Voie intrafémorale : 4-15x10 ⁴ cellules	souris NOD/SCID (3,5 Gy) ou NOD/SCID/ β 2m ^{-/-} (3,25 Gy)	Reconstitution lymphoïde, myéloïde et érythroïde chez 11/19 souris et taux de chimérisme < 1 % dans la MO après 2 mois	Wang <i>et al.</i> 2005
	Coculture pendant 7-24 j avec des cellules stromales S17 irradiées	Population hétérogène de cellules hématopoïétiques issues de la coculture	Voie IV : 2-4x10 ⁶ cellules Voie intrafémorale : 0,5-3,8x10 ⁶ cellules	souris NOD/SCID traitées avec Ac anti-asialo GM1 (3 Gy)	Taux de chimérisme primaire : 0,16-1,44 % et secondaire : 0,08-0,2 % hCD45 ⁺ dans la MO après 3-6 mois	Tian <i>et al.</i> 2006
	Coculture pendant 17 j avec des cellules stromales S17 irradiées	Cellules Lin ⁻ CD34 ⁺ ou CD34 ⁺ CD38 ⁻	Voie intrapéritonéale <i>in utero</i> : 0,13-1,4x10 ⁵ cellules	fœtus de mouton (< 65 j de gestation)	Taux de chimérisme primaire et secondaire < 0,1 % dans la MO et le sang périphérique à 5-17 mois post-transplantation	Narayan <i>et al.</i> 2006
	Coculture pendant 12-18 j avec des cellules stromales dérivées de l'AGM ou du foie fœtal irradiées et en présence de cytokines	Cellules hématopoïétiques et cellules stromales	Voie intrafémorale : 5x10 ⁵ cellules	souris NSG (2 Sv)	Taux de chimérisme : 0,1-2 % dans MO et jusqu'à 16 % dans le sang périphérique à 2-3 mois post-transplantation dans toutes les souris, et de 1,5-3 % en transplantation secondaire	Ledran <i>et al.</i> 2008
	Cellules pré-traitées avec un milieu conditionné par les cellules humaines HepG2 d'hépatocarcinome puis formation d'EB et culture pendant 14 j	Cellules dissociées des EB	Voie intrafémorale : 2x10 ⁵ cellules	souris NOG (2,75 Gy)	Reconstitution érythroïde puis myéloïde avec un taux de chimérisme d'environ 2 % à 3 semaines et < 0,1 % à 4 mois, persistance de cellules humaines jusqu'à 10 mois. Transplantation secondaire < 0,1 %	Lu <i>et al.</i> 2009
	Formation d'EB et culture avec des cytokines pendant 10-13 j	Cellules CD34 ⁺ CD45 ⁺ surexprimant RunX1a	Voie intrafémorale : 1,5-3x10 ⁵ cellules	souris NSG (3 Gy)	Taux de chimérisme d'environ 5-15 % à 9 semaines avec reconstitution érythroïde, myéloïde et lymphoïde après 9 semaines	Ran <i>et al.</i> 2013
Cellules iPS murines	EB J6 dissociés puis cultivés pendant 14-16 j sur cellules OP9 en présence de cytokines	Cellules surexprimant HoxB4 issues de la coculture	Voie rétro-orbitale : quantité de cellules injectées non précisée	souris drépanocytaires h β ^S /h β ^S (5,5 Gy x2) traitées avec Ac anti-asialo GM1	Prise de greffe dans 3/3 souris, stable > 60 % jusqu'à 3 mois dans le sang périphérique. Reconstitution érythroïde	Hanna <i>et al.</i> 2007
Cellules iPS humaines	Coculture avec des cellules OP9 pendant 8 j en présence de cytokines	Cellules CD34 ⁺	Voie intra-tibiale : 5x10 ⁵ cellules	souris NOD/SCID femelles (3 Gy)	6,5-9,5 % de cellules humaines dans la MO et 2,1-2,5 % dans le sang périphérique après 6 semaines. Reconstitution érythroïde	Wang <i>et al.</i> 2012
	Formation d'EB et culture pendant 18 j en présence de cytokines	Cellules dissociées des EB (20,8 % de CD34 ⁺ CD45 ⁺)	Voie intrafémorale : 4x10 ⁵ cellules	souris NOD/SCID ou NSG (3,65 Gy)	Aucune prise de greffe dans les souris NOD/SCID, et chimérisme < 0,1 % dans les souris NSG après 10 semaines. Pas de reconstitution hématopoïétique	Risueño <i>et al.</i> 2012
	Formation d'EB et culture en présence de cytokines puis isolement de cellules CD34 ⁺ CD45 ⁺	Cellules CD34 ⁺ CD45 ⁺ transfectées avec des facteurs de transcription et amplifiées pendant 14 j	Voie intrafémorale : 0,8-1,2x10 ⁶ cellules	souris NSG (2,5 Gy)	Prise de greffe dans 16/21 souris avec un taux de chimérisme moyen de 2,7 % après 1 mois, reconstitution érythroïde (jusqu'à 6 semaines) et myéloïde (jusqu'à 3 mois)	Doulatov <i>et al.</i> 2013
	Formation de tératomes par co-injection iPS/OP9-Wnt3a en SC ou IM dans des souris NSG et croissance pendant 8 semaines	Cellules CD34 ⁺ CD45 ⁺ isolées de tératomes	Voie intra-orbitale : 100 à 10 000 cellules	souris NSG (1,5 Gy)	Taux de chimérisme de 0,1-2 % (et 0,04 % en transplantation secondaire) et reconstitution érythroïde, myéloïde et lymphoïde T et B après 2 mois.	Amabile <i>et al.</i> 2013
	Formation de tératomes par co-injection iPS/OP9 dans les testicules de souris NOD/SCID et libération de SCF et TPO (pompe micro-osmotique), croissance pendant 12 semaines	Cellules CD34 ⁺ CD45 ⁺ isolées de la MO des souris portant les tératomes	Voie intrafémorale : 600 cellules	souris NOD/SCID ou NOD/SCID/JAK3 ^{null} (2 Gy)	Prise de greffe supérieure dans les souris NOD/SCID/JAK3 ^{null} et taux de chimérisme de 0,2-5 % après 3 mois. Reconstitution érythroïde, myéloïde et lymphoïde en transplantation primaire et secondaire	Suzuki <i>et al.</i> 2013

4.3.1.A partir de cellules ES humaines

Pour la première fois en 2005, des progéniteurs hématopoïétiques différenciés à partir de cellules ES humaines ont été capables de reconstitution myéloïde, lymphoïde et érythroïde de la moelle osseuse de souris immunodéficientes NOD/SCID (Wang et al., 2005b). L'expression forcée ectopique d'HoxB4 dans ces progéniteurs augmente leur capacité proliférative mais l'efficacité de la prise de greffe ainsi que le taux de chimérisme restent faibles (< 1 %).

Un an plus tard, cette fois-ci en utilisant un système de coculture sur des cellules stromales murines S17, deux autres équipes montrent la production de cellules SRC capables de prise de greffe après transplantation dans des souris NOD/SCID (Tian et al., 2006) ou *in utero* dans des fœtus de mouton (Narayan et al., 2006). Cependant, là encore, le taux de chimérisme reste inférieur à 1-2 %. Ledran *et al.* ont obtenu une efficacité de prise de greffe et un taux de chimérisme similaires en utilisant des cellules stromales dérivées de l'AGM ou de foie fœtal (Ledran et al., 2008). Si la reconstitution myéloïde a bien été mise en évidence, la reconstitution lymphoïde n'a cependant pas été clairement démontrée. De même, aucune lymphopoïèse n'a pu être mise en évidence dans l'étude de Lu *et al.* après transplantation de cellules hématopoïétiques alors qu'elles sont capables de reconstitution érythroïde et myéloïde prolongée (Lu et al., 2009). Par contre, de façon surprenante, des cellules lymphoïdes ont pu être détectées lors de la transplantation secondaire après 3 mois.

Finalement, Ran *et al.* ont réussi à produire des cellules hématopoïétiques capables de reconstitution érythroïde, lymphoïde et myéloïde détectable 9 semaines après transplantation grâce à la transduction du facteur de transcription RunX1a dans les cellules ES humaines (Ran et al., 2013).

4.3.2.A partir de cellules iPS murines et humaines

La 1^{ère} transplantation de cellules hématopoïétiques dérivées de cellules iPS dans un modèle de souris drépanocytaires a été réalisée avec succès en 2007 par Hanna *et al.* (Hanna et al., 2007). Ils ont mis en évidence que les cellules iPS issues de souris drépanocytaires, génétiquement modifiées pour exprimer HoxB4 et corrigées par recombinaison homologue puis transplantées, étaient capables de restaurer le phénotype drépanocytaire (reconstitution érythroïde). Des résultats équivalents ont été obtenus par transplantation de progéniteurs CD34⁺ différenciés à partir de cellules iPS humaines issues de patient souffrant de β -thalassémie et corrigées (Wang et al., 2012). Leur analyse s'est cependant concentrée sur la reconstitution érythrocytaire, et ni la production de cellules lymphoïdes ou myéloïdes ni la maintenance à long terme de l'hématopoïèse n'ont été évaluées. Ces deux articles ont ainsi prouvé la faisabilité de l'utilisation des cellules iPS pour la correction d'une maladie génétique hématologique touchant les globules rouges.

Au même moment, en utilisant cette fois-ci le système des EBs pour induire la différenciation, une autre équipe a montré que des cellules hématopoïétiques humaines issues d'EBs ont été capables de

se greffer dans la moelle osseuse des souris transplantées et d'y survivre après 10 semaines mais pas de migrer ou de reconstituer l'hématopoïèse (Risueño et al., 2012).

Plus récemment, des progéniteurs hématopoïétiques transduits avec une combinaison de facteurs de transcription puis amplifiés *in vitro* ont été capables de reconstitution à court terme érythroïde et myéloïde (Doulatov et al., 2013).

Il a donc fallu attendre 2013 pour que des cellules iPS humaines soient différenciées en progéniteurs CD34⁺ capables de reconstituer un système hémato-lymphoïde fonctionnel dans des souris. Seules deux équipes ont réussi cette prouesse, toutes les deux grâce à la formation de tératomes induits après co-injection de cellules iPS et OP9 (Amabile et al., 2013; Suzuki et al., 2013). Leur nouvelle approche est basée sur l'hypothèse que les tératomes formeraient un microenvironnement similaire à celui de l'embryon, permettant ainsi le développement de cellules hématopoïétiques. Dans l'article publié par Amabile *et al.*, les tératomes ont été formés par co-injection des iPS avec des cellules OP9-Wnt3a. Les progéniteurs CD34⁺CD45⁺ isolés des tératomes ont montré une efficacité de prise de greffe comparable aux cellules de sang de cordon et une reconstitution multi-lignée prédominant sur la lignée myéloïde. Suzuki *et al.* ont formés les tératomes par co-injection iPS/OP9 et libération progressive ectopique de SCF et TPO grâce à l'implantation d'une pompe micro-osmotique. Ils ont mis en évidence, comme le groupe précédent, une infiltration des organes murins et notamment de la moelle osseuse par des cellules humaines myéloïdes et lymphoïdes dans les souris NOD/SCID portant les tératomes iPS/OP9. Mais contrairement à Amabile *et al.*, ils ont isolé les progéniteurs CD34⁺CD45⁺ humains directement de la moelle osseuse des souris portant les tératomes et les ont réinjectés dans des souris NOD/SCID/JAK3^{null}, conduisant à une reconstitution multi-lignée.

La comparaison de tous ces articles est rendue difficile par la variété de protocoles disponibles pour produire les progéniteurs CD34⁺, les voies d'injection, les modèles de souris utilisés... Tous ces paramètres peuvent avoir une influence considérable sur l'efficacité de la prise de greffe des cellules transplantées mais également sur leur potentiel de reconstitution multi-lignée et la durée de cette reconstitution.

CHAPITRE III - La thérapie protéique : vectorisation de protéines membranaires grâce aux protéoliposomes

1. Les protéines membranaires chez l'Homme

Les protéines membranaires représentent près de 20-30 % des protéines totales chez l'Homme (Ahram et al., 2006; Fagerberg et al., 2010). Elles sont classées en 2 groupes selon leur localisation (Figure 14) :

- les protéines périphériques : associées directement aux lipides de la membrane ou à des protéines membranaires intégrales le plus souvent par le biais d'interactions électrostatiques mais sans traverser la membrane,
- les protéines intégrales : également appelées protéines transmembranaires, elles contiennent des domaines hydrophobes constitués d'hélices alpha (le plus fréquemment) ou de tonneaux beta (dans le cas de protéines de bactéries gram -) intégrés dans la double couche lipidique de la membrane cellulaire et liés entre eux par des boucles extracellulaires et/ou intracellulaires. Le nombre de domaines transmembranaires de ces protéines est variable.

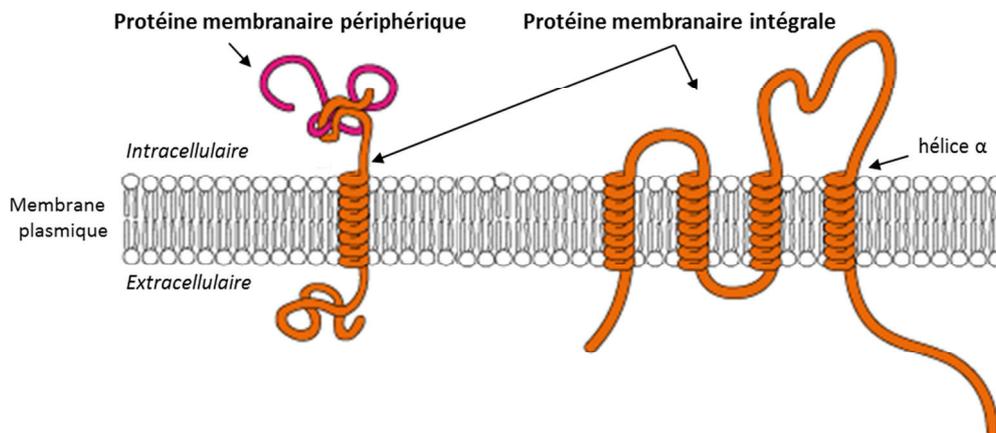


Figure 14. Les protéines membranaires chez l'Homme : périphériques et intégrales. D'après The human protein atlas : <http://www.proteinatlas.org/humanproteome/secretome>.

Parmi les protéines transmembranaires, on peut trouver notamment des récepteurs, des enzymes, des transporteurs régulant les mouvements de molécules ou d'ions divers à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule, des protéines jouant un rôle dans la signalisation cellulaire, l'adhésion entre les membranes, la fixation de la matrice extracellulaire, la production d'énergie, la régulation du volume cellulaire, les phénomènes de détoxification... Ainsi, à cause de leur rôle important dans des processus biologiques essentiels, elles peuvent être impliquées dans de nombreuses maladies génétiques (Sanders and Myers, 2004). Pour cette raison, elles représentent près de 70 % des cibles pharmacologiques actuelles (Lundstrom, 2007).

Cependant, l'étude de ces protéines membranaires (élucider leur structure, comprendre leur fonction et l'effet de mutations...) est limitée par la difficulté à les produire en grande quantité *in vitro* tout en conservant leur fonctionnalité. Actuellement, 2452 protéines membranaires (<http://pdhtm.enzim.hu/> ; dernière mise à jour le 14/08/15) sont déposées dans la « Protein Data Bank », une collection mondiale de données sur la structure 3D de protéines essentiellement, ce qui représente moins de 3 % des structures totales (115092 au 6 octobre 2015).

Dans les chapitres suivants, nous détaillerons les différents systèmes d'expression cellulaires et acellulaires permettant la production de protéines recombinantes membranaires et nous nous intéresserons ensuite plus particulièrement aux protéoliposomes et leurs applications.

2. Les systèmes d'expression cellulaires

Les systèmes classiques cellulaires ont été les premiers développés afin de produire des protéines recombinantes. En effet, une protéine peut être produite de façon recombinante après insertion de l'ADN du gène codant cette protéine d'intérêt dans des cellules ou microorganismes servant d'« usine de production ». Ces usines de production peuvent être de type procaryote (bactérie) ou eucaryote (levures, cellules d'insecte ou de mammifères) (Figure 15).

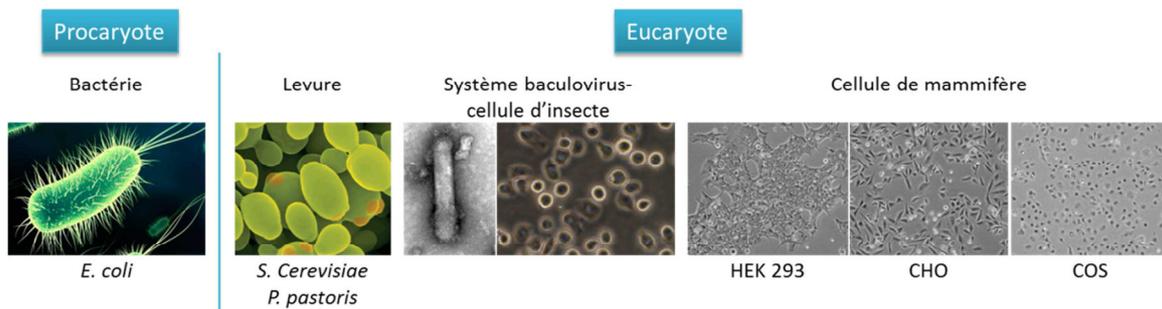


Figure 15. Les organismes procaryotes et eucaryotes d'expression cellulaire les plus fréquemment utilisés pour la production de protéines recombinantes : *Escherichia coli* pour les systèmes procaryotes, puis pour les systèmes eucaryotes, il s'agit des levures comme *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia pastoris*, du système baculovirus/cellule d'insecte, et enfin des cellules de mammifère comme HEK293 (*human embryonic kidney*), CHO (*chinese hamster ovary*) et COS (fibroblaste rénal de singe).

2.1. Choix du système d'expression : procaryote ou eucaryote ?

Pour produire une protéine recombinante, il faut choisir le système d'expression le plus approprié. Et pour cela, différents critères sont à prendre en compte : la quantité de protéine à produire, si celle-ci nécessite des modifications post-traductionnelles (MPT), si elle doit être soluble et fonctionnelle, si une étape de purification est nécessaire ou non, le coût, l'équipement disponible...

Certaines MPT peuvent être essentielles pour la stabilité voire l'activité d'une protéine donnée. Les plus courantes pour une protéine sont la glycosylation, la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitinylation... (Khoury et al., 2011). La formation de ponts disulfures est également une MPT importante puisqu'elle permet la stabilisation du repliement de nombreuses protéines (Saibil, 2013)

Les systèmes d'expression procaryotes et eucaryotes cités plus haut ne sont pas tous équivalents pour la production des protéines recombinantes. Leurs principaux avantages et inconvénients sont synthétisés dans le Tableau 5.

Tableau 5. Avantages et inconvénients des principaux systèmes d'expression cellulaires

	Avantages	Inconvénients
Bactérie <i>Escherichia coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Potentiellement très hauts niveaux d'expression - Faible coût - Conditions de culture simples - Croissance rapide - Facilement adaptable à la production à grande échelle - Protocoles de transformation simples - Modification possible de nombreux paramètres pour optimiser l'expression 	<ul style="list-style-type: none"> - Formation des ponts disulfures inefficace - Repliement médiocre des protéines dans le cytoplasme - Formation de corps d'inclusion - Repliement des protéines <i>in vitro</i> inefficace - Système de codons utilisé différent du système eucaryote - MPT minimales - Endotoxine
Levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Bon niveau d'expression - Faible coût - Conditions de culture simples - Facilement adaptable à la production à grande échelle - Choix d'expression en milieu intracellulaire ou sécrétée (purification plus simple) - Capable de réaliser la plupart des MPT eucaryotes - Repliement des protéines efficace - Pas d'endotoxine 	<ul style="list-style-type: none"> - Généralement moins d'expression qu'avec <i>Pichia pastoris</i> - Sécrétion plus faible qu'avec <i>Pichia pastoris</i> - Glycosylation différente des cellules de mammifères - Tendance à hyperglycosyler les structures N glycan des protéines considérées allergéniques
Levure <i>Pichia pastoris</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Haut niveau d'expression - Faible coût - Conditions de culture simples - Croissance relativement rapide - Facilement adaptable à la production à grande échelle - Choix d'expression en milieu intracellulaire ou sécrétée (purification plus simple) - MPT importantes des protéines, N-glycosylation plus ressemblante aux eucaryotes que <i>S. cerevisiae</i> - Repliement des protéines efficace - Pas d'endotoxine 	<ul style="list-style-type: none"> - Glycosylations différentes des cellules de mammifères
Cellules d'insecte infectées avec Baculovirus	<ul style="list-style-type: none"> - Bon niveau d'expression (surtout pour les protéines intracellulaires) - Croissance relativement rapide - Repliement de protéines efficace - Modérément adaptable à la production à grande échelle - MPT importantes des protéines - Glycosylation plus semblables aux glycosylations en cellules de mammifères - Pas d'endotoxine 	<ul style="list-style-type: none"> - Milieu de culture cher - Grands volumes de virus nécessaires pour permettre de larges productions - Traitement inefficace des pro-peptides dans les voies de sécrétion - Glycosylations différentes de celles obtenues en cellules de mammifères - Lyse cellulaire et dégradation potentielle des protéines exprimées suite à l'infection virale
Cellules de mammifères	<ul style="list-style-type: none"> - Bon niveaux d'expression - Modérément adaptable à la production à grande échelle - Augmentation de la production quand utilisation de cellules adaptées à la culture en suspension - Repliement des protéines efficace - Production de protéines sécrétées - Toutes MPT - Pas d'endotoxine 	<ul style="list-style-type: none"> - Milieu de culture cher - Besoins complexes pour la croissance

2.1.1. Les systèmes d'expression procaryotes

Escherichia coli, un bacille Gram négatif, est le système procaryote le plus couramment répandu pour la synthèse de protéines recombinantes même si d'autres bactéries ont également été utilisées

comme *Bacillus subtilis* et *Ralstonia eutropha* (Yin et al., 2007). Dans *E. coli*, les protéines peuvent être sécrétées dans le périplasme de la bactérie, ou directement dans le milieu extracellulaire, ce qui réduit la dégradation par les protéases et rend la purification plus facile. Les protéines peuvent aussi être produites sous forme de corps d'inclusion mais dans ce cas, la protéine est sous forme insoluble et souvent mal repliée ce qui nécessitera une étape de solubilisation et de renaturation (Khow and Suntrarachun, 2012). Les systèmes procaryotes sont généralement plus faciles d'utilisation, moins coûteux et avec une croissance plus rapide que les systèmes en cellules de mammifères ce qui augmente leur rendement : de l'ordre de plusieurs g/L. Cependant, aucune MPT n'est possible avec *E. coli* et l'absence de protéines chaperonnes peut conduire au mauvais repliement de la protéine.

2.1.1. Les systèmes d'expression eucaryotes

Les systèmes eucaryotes présentent des avantages indéniables pour l'obtention de protéines eucaryotes stables et fonctionnelles puisqu'elles vont pouvoir subir des MPT nécessaires à leur stabilité et leur activité (Tableau 5). Les principales levures utilisées sont *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia pastoris*. Elles sont très faciles à cultiver et à manipuler génétiquement. Le système baculovirus-cellules d'insecte est également très efficace pour la synthèse de glycoprotéines eucaryotes bien que les glycosylations ne soient pas identiques et peuvent rendre la protéine immunogène. Des évolutions continues de ces différents systèmes permettent la réalisation de glycosylations plus proche de celles des cellules de mammifères (Palmerberger et al., 2012; Wildt and Gerngross, 2005). Les cellules de mammifères sont finalement celles qui permettent le plus de MPT mais elles sont plus coûteuses, et le rendement est généralement plus faible. Parmi celles-ci, on peut citer notamment les cellules COS, CHO et HEK 293 (Figure 15) (Yin et al., 2007).

2.2. Production de protéines membranaires en systèmes d'expression cellulaires

Les systèmes d'expression cellulaires procaryotes et eucaryotes sont très utiles pour la synthèse de protéines solubles. Parmi celles utilisées en clinique, on peut d'ailleurs citer des vaccins contre l'hépatite B produits dans *S. cerevisiae* (HBVaxPro[®]) ou cellules CHO (Genhevac B[®]), l'insuline humaine recombinante produite généralement dans *E. coli* ou *S. cerevisiae*, des hormones, des facteurs hématopoïétiques, de la coagulation, des anticorps monoclonaux (cellules CHO : rituximab, trastuzumab)... Les « Biomédicaments » approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) et l'EMA (Agence Européenne du Médicament) seraient produits dans 56 % des cas par des cellules de mammifère, 24 % par *E. coli*, 13 % par *S. cerevisiae*, 4 % par des cellules d'insecte et enfin 3 % par des animaux ou plantes transgéniques (Baeshen et al., 2014). En France, 168 Biomédicaments étaient commercialisés à la date du 31 mai 2013 (Etat des lieux 2013 LEEM) et plus de 800 seraient

actuellement en cours de développement, majoritairement des anticorps monoclonaux et des vaccins.

Cependant, les protéines toxiques et les protéines membranaires restent difficilement synthétisables. En effet, la surexpression des protéines membranaires en systèmes cellulaires *in vivo* entraîne fréquemment une toxicité cellulaire pouvant être due entre autre à leur agrégation spontanée (elles sont non solubles en solution aqueuse), à l'inhibition de la synthèse d'autres protéines de la cellule hôte ou à une trop forte densité pouvant bloquer le transport cellulaire voire même lyser la membrane cellulaire (Klammt et al., 2006; Klepsch et al., 2011). De plus, les protéines membranaires produites peuvent être non fonctionnelles suite à leur agrégation, à un mauvais repliement, à l'absence de ponts disulfure ou de modifications post-traductionnelles essentielles à leur activité... En conséquence, la quantité de protéines membranaires fonctionnelles produites avec les systèmes classiques *in vivo* reste généralement faible (0,1 à 15 µg/mL, soit 1000 fois moins que pour des protéines solubles).

L'amélioration de souches d'*E. coli* permet cependant d'améliorer la production de protéines membranaires (Schlegel et al., 2014). D'autres systèmes cellulaires, notamment le système baculovirus-cellules d'insecte et la levure *Pichia pastoris*, se sont également révélés intéressants. En effet, des cellules d'insectes infectées par du baculovirus contenant l'ADNc codant pour la protéine membranaire vont permettre d'une part la synthèse de la protéine membranaire au niveau de la membrane de la cellule d'insecte (Rotrosen et al., 1993), mais également la prolifération du virus et la présence de la protéine membranaire au niveau de l'enveloppe virale (Loisel et al., 1997). Ce baculovirus extracellulaire peut ensuite être fusionné avec des liposomes pour former des protéoliposomes (Fukushima et al., 2008). De même, les souches de *Pichia pastoris* ont été génétiquement modifiées et les conditions de synthèse optimisées ; elle se présentent donc à présent comme des systèmes très utiles pour la synthèse de protéines membranaires (Gonçalves et al., 2013).

3. Les systèmes d'expression acellulaires

Le principe de base des systèmes d'expression acellulaires est l'utilisation de la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle d'un organisme afin de produire, à partir d'une information génétique exogène, une protéine recombinante spécifique. Ces systèmes pourraient donc offrir une solution aux limites des systèmes cellulaires présentées ci-dessus. Depuis la 1^{ère} description faite en 1950 de l'utilisation de lysats cellulaires pour synthétiser des protéines *in vitro* (Borsook, 1950), cette technique a évolué. Ainsi, le premier système acellulaire traductionnel à partir d'ARNm et celui de

transcription/traduction couplées à partir d'ADN ont ainsi été développés en 1961 et 1967 respectivement (DeVries and Zubay, 1967; Nirenberg and Matthaei, 1961).

3.1. Description des systèmes d'expression acellulaires

Les systèmes acellulaires peuvent être caractérisés selon 3 principaux critères : l'origine de l'extrait cellulaire (généralement d'organismes procaryotes (bactéries) et eucaryotes (germe de blé, réticulocytes de lapin...)), le type de système de production et enfin la technique de production.

3.1.1. L'origine de l'extrait cellulaire

Préparation des extraits cellulaires

La préparation de l'extrait est très simple pour *E. coli* puisqu'il suffit de lyser les bactéries et d'éliminer les débris cellulaires ainsi que l'ADN bactérien (Kigawa et al., 2004; Swartz et al., 2004). C'est donc le système le plus populaire et de nombreux kits utilisant des extraits d'*E. coli* sont actuellement commercialisés.

Le germe de blé est utilisé depuis 1973 pour la production de protéines. Cependant, la préparation de l'extrait à partir des germes, également appelés embryons, reste laborieuse et très longue (Harbers, 2014; Takai and Endo, 2010). Grâce à la commercialisation de kits, ils sont également très utilisés actuellement.

La préparation du lysat à partir de réticulocytes de lapin est également assez complexe (Jackson and Hunt, 1983), mais des kits commercialisés facilitent ainsi l'emploi de ces lysats.

D'autres types d'extraits cellulaires peuvent également être utilisés comme des lysats de cellules d'insectes (Ezure et al., 2010) ou de mammifères (CHO) (Brödel et al., 2014) et même de cellules humaines comme les cellules HeLa (Mikami et al., 2010)

Contenu des extraits cellulaires

L'extrait issu de ces organismes contient les éléments nécessaires à la transcription et la traduction et éventuellement aux MPT : ARN polymérase T7 purifiée, ARNt, ribosomes, facteurs de régulation (initiation, élongation, terminaison), facteurs de transcription... Comme ces extraits peuvent également contenir des substances inhibitrices (nucléases, protéases, enzymes hydrolysant les nucléotides triphosphates NTP), des systèmes purifiés ont également vu le jour. Ainsi, la machinerie entière de traduction d'*E. coli* a été reconstituée *in vitro* à partir de plus de 100 composants purifiés et présente une grande efficacité de traduction (Ohashi et al., 2010; Shimizu et al., 2001).

L'ADN et l'ARNm endogènes issus de l'organisme dont est extrait le lysat sont éliminés afin d'éviter la synthèse de protéines contaminantes non désirées.

Choix du système d'expression

Comme pour les systèmes classiques cellulaires, le choix du système doit être déterminé en fonction du type de protéine (procaryote ou eucaryote) et des applications prévues. Les avantages et inconvénients des principaux systèmes d'expression acellulaires sont détaillés dans le Tableau 6. Pour revue, voir également (Chong, 2014).

Tableau 6. Avantages et inconvénients des principaux systèmes d'expression acellulaires.

	Avantages	Inconvénients
<i>E. coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Extrait simple et peu coûteux à préparer - Rendement de synthèse protéique élevé - Repliement possible de protéines complexes - Modifications génétiques des souches possibles 	<ul style="list-style-type: none"> - MPT très limitées - Nécessité d'optimiser les codons utilisés - Généralement petites protéines < 50 kD car tendance des grosses protéines à s'agréger
Germe de blé	<ul style="list-style-type: none"> - Rendement de synthèse protéique élevé - Large spectre de protéines eucaryotes synthétisables - Traduction de grandes protéines possibles - Pas ou peu de protéines endogènes synthétisées - Pas d'optimisation de codons nécessaire 	<ul style="list-style-type: none"> - Extraction du lysat long et complexe avec un rendement faible - Pas de glycosylation
Réticulocytes de lapin	<ul style="list-style-type: none"> - Production de protéines eucaryotes contenant des MPT spécifiques des mammifères 	<ul style="list-style-type: none"> - Manipulation complexe de tissus animaux - Pas de glycosylation - Co-expression de protéines endogènes possible

3.1.2. Le type de système de production

Le choix du système de production dépend de la forme sous laquelle est apportée l'information génétique servant de modèle : ADN (plasmide, produit PCR linéaire) ou directement ARNm.

Information génétique exogène

L'ADN modèle codant la protéine d'intérêt doit contenir dans sa séquence des éléments indispensables comme un promoteur fort pour la transcription (généralement le promoteur T7), un signal d'initiation de la traduction en 5' (séquence Shine-Dalgarno pour *E. coli* ou séquence Kozak pour les systèmes eucaryotes), et des séquences de terminaison de la transcription et de la traduction en 3' (He et al., 2011).

Les systèmes de production

Trois systèmes de production sont disponibles :

- Système traductionnel seul : l'information génétique est apportée sous forme d'ARNm directement (Figure 16).
- Système couplé : la transcription et la traduction sont réalisées en continu dans le même milieu réactionnel permettant ainsi de produire la protéine en une seule étape à partir de l'ADN. Ce système est très utilisé pour la synthèse des protéines procaryotes car elles ne nécessitent pas de modifications post-transcriptionnelles de l'ARNm (Figure 16).
- Système lié : la transcription et la traduction sont réalisées séparément à partir de l'ADN. Ce système est très utilisé pour la synthèse des protéines eucaryotes où une étape de maturation post-transcriptionnelle de l'ARNm est nécessaire : l'épissage pour éliminer les introns et l'ajout d'une

coiffe (M7 méthyl-guanosine) à l'extrémité 5' et d'une queue poly(A) en 3' pour ainsi éviter la dégradation précoce de l'ARNm.

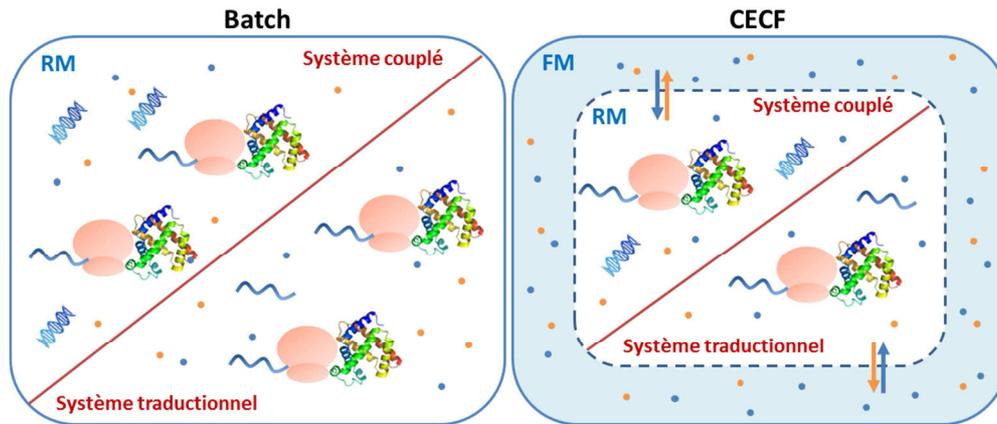


Figure 16. Les types de systèmes (traductionnel seul ou couplé) et les techniques de production (batch ou *continuous exchange cell-free*, CECF) en système acellulaire. RM = milieu réactionnel et FM = milieu d'alimentation, ces deux compartiments sont séparés par une membrane semi-perméable dans le système CECF (à droite). L'ADN et l'ARNm sont schématisés par une double hélice et une chaîne simple brin respectivement. Les points bleus représentent les substrats frais essentiels du milieu réactionnel et les points oranges les produits de dégradation. Schéma modifié d'après (Junge et al., 2011).

3.1.3. La technique de production

Les protéines peuvent être produites soit dans un seul compartiment (batch) soit dans un système à plusieurs compartiments :

- Batch : la durée de vie de cette technique de production est limitée à quelques heures notamment à cause de l'épuisement rapide des nutriments essentiels, la dégradation de l'ARNm et l'accumulation des produits de dégradation (Figure 16).
- Système de séparation de la chambre de réaction en 2 compartiments : le système de production CFCF (*continuous flow cell-free*) développé par Spirin en 1988 (Spirin et al., 1988) a été simplifié avec le développement de la méthode en CECF (*continuous exchange cell-free*) (Figure 16). Dans ces systèmes, la production peut être maintenue pendant de nombreuses heures (> 20h) grâce au retrait régulier des produits de dégradation du milieu réactionnel (RM = *reaction mix*) séparé du milieu d'alimentation (FM = *feeding mixture*) par une membrane semi-perméable et l'apport continu de précurseurs frais et substrats fournisseurs d'énergie ce qui augmente le rendement de production des protéines (Shirokov et al., 2007).

3.2. Optimisations de la production des protéines recombinantes

Il est nécessaire de connaître la structure de la protéine, les conditions de synthèse requises, les étapes de traitement post-synthèse (MPT) et la finalité de la protéine produite afin de déterminer le protocole adéquat à utiliser et les éléments à rajouter dans le milieu réactionnel (Carlson et al., 2012).

Il est ainsi indispensable d'optimiser des paramètres tels que la concentration en ions et acides aminés, la qualité et la concentration de l'ADN/ARNm servant de modèle, les dNTP et les ARNt à ajouter, la source d'énergie pour alimenter la synthèse protéique (glucose, glucose-6-phosphate ou ATP directement) ainsi que le système de régénération d'énergie, les conditions réductrices ou oxydantes... Par exemple, la création d'un milieu oxydant permet de favoriser la formation des ponts disulfures entre deux résidus de cystéine et donc le repliement correct de ces protéines (Kim and Swartz, 2004). Le système peut également être stabilisé par l'ajout d'inhibiteurs de protéases et de RNase, ou optimisé grâce à des cofacteurs, inhibiteurs ou substrats ayant un effet bénéfique sur la synthèse des protéines... L'utilisation d'acides aminés modifiés/marqués/mutés peut permettre la production d'une protéine marquée détectable par immunofluorescence ou par radioactivité, ou même biotinylée pour faciliter sa purification (Spirin, 2004).

Les systèmes classiques utilisant les extraits d'*E. coli*, germe de blé et réticulocytes de lapin sont incapables de réaliser des glycosylations (Tableau 5). Or, la glycosylation est l'une des plus importantes MPT et concerne notamment les protéines membranaires et les protéines sécrétées qui sont glycosylées immédiatement après leur entrée dans le réticulum endoplasmique. Des glycosylations ont pu être induites dans ces systèmes acellulaires en supplémentant le milieu réactionnel avec des vésicules microsomales provenant de la fragmentation du réticulum endoplasmique de cellules pancréatiques de chien (Lingappa et al., 1978), ou en ajoutant par exemple des composants purifiés extraits de la bactérie *Campylobacter jejuni* possédant une machinerie de N-glycosylation fonctionnelle (Guarino and DeLisa, 2012).

3.3. Production de protéines membranaires en systèmes d'expression acellulaires

Les protéines membranaires peuvent être produites en systèmes d'expression acellulaires selon deux principales méthodes : sous forme précipitée, ou sous forme soluble en présence de détergents ou de lipides (Junge et al., 2011). En effet, lorsqu'une protéine membranaire est produite en l'absence de compartiment hydrophobe, elle précipite spontanément ce qui peut ensuite avoir un impact négatif sur son activité après « re-solubilisation ». L'ajout de détergents ou de lipides crée alors un environnement hydrophobe essentiel pour la solubilité et la conformation correcte des protéines membranaires.

Synthèse en présence de détergents

La synthèse des protéines membranaires en présence de détergents conduit à la formation de protéomicelles. Or, certains détergents peuvent entraîner la dénaturation de la protéine, avoir un impact sur sa conformation et/ou son activité ou affecter la transcription/traduction en inactivant des composants essentiels (Klammt et al., 2005). De plus, les micelles ne miment pas tout à fait les

membranes cellulaires et les conséquences sur la structure et l'activité de la protéine membranaire ne sont pas totalement maîtrisées (Seddon et al., 2004).

Synthèse en présence de lipides

Les lipides peuvent être amenés dans le milieu réactionnel sous différentes formes (Figure 17) : liposomes de composition définie, fractions isolées de membrane cellulaire (par exemple vésicules produites à partir de membranes internes d'*E. coli*), microsomes, nanodisques (nanoparticules lipidiques formées d'une double couche phospholipidique plane entourée par un coating protéique de soutien) ou de bicelles (mélange de lipides et de détergents) (Sachse et al., 2014).

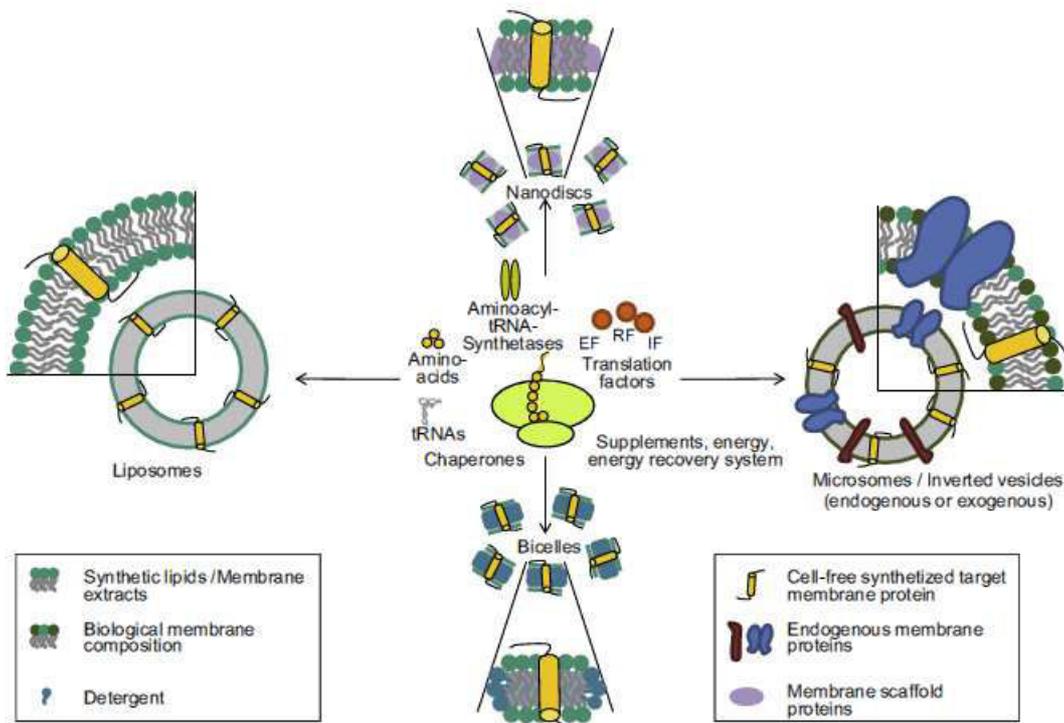


Figure 17. La synthèse de protéines membranaires en système acellulaire en présence de différentes sources de lipides. Lors de la synthèse de la protéine membranaire d'intérêt dans un milieu réactionnel contenant les éléments nécessaires (acides aminés, ARNt, ribosomes et autres réactifs), sa solubilisation peut être obtenue grâce à l'ajout de lipides sous forme de nanodisques, de microsomes ou vésicules, de liposomes ou de bicelles. D'après (Sachse et al., 2014).

Les principaux avantages des systèmes acellulaires sont leur rapidité (quelques heures contre 10-12 jours pour les systèmes cellulaires) et la production à haut débit de protéines recombinantes dans de petits volumes de réaction (μL à mL) conduisant à des taux de production de l'ordre du mg/mL de milieu réactionnel (pour des protéines solubles généralement). De plus, comme décrits plus haut, ces systèmes ouverts permettent des modifications faciles du milieu réactionnel et à tout moment en fonction de l'application prévue, le tout ayant pour objectif la production de protéines biologiquement fonctionnelles, de protéines toxiques pour les cellules ou de régulation ou instables. Ces techniques évoluent sans cesse afin d'augmenter le rendement, améliorer la fonctionnalité et la pureté des protéines produites. Celles-ci sont utilisables directement pour des études de

protéomique structurale (résonance magnétique nucléaire RMN ou cristallographie à rayon X) et des études fonctionnelles, de mutagénèse, la production de « puces à protéines » pour le criblage à haut débit de nouveaux médicaments-candidats contre des pathologies spécifiques mais également l'étude des processus biologiques comme la traduction protéique avec notamment le screening d'agents toxiques et l'identification d'inhibiteurs de la traduction (Carlson et al., 2012; He et al., 2011; Katzen et al., 2005; Klammt et al., 2006).

4. Les protéoliposomes : obtention, caractérisation et applications

4.1. Obtention des protéoliposomes

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, les protéoliposomes peuvent être obtenus en système d'expression acellulaire par fusion de protéomicelles avec des liposomes. Mais l'addition de liposomes directement dans le milieu réactionnel peut permettre l'obtention de protéoliposomes en une seule étape, et en moins d'un jour, car simultanément à leur traduction, les protéines membranaires vont s'insérer spontanément dans la bicouche lipidique des liposomes (Marques et al., 2007). L'avantage des liposomes est qu'ils vont notamment mimer l'environnement cellulaire normal de la protéine membranaire et donc favoriser son repliement correct voire même optimiser son activité fonctionnelle. Par contre, les conditions du système sont à optimiser intensivement pour chaque protéine : la quantité de liposomes (de trop fortes concentrations de liposomes peuvent inhiber le processus de transcription/traduction), le ratio lipides/protéines (un ratio compris entre 800 et 10 est généralement associé à une formation efficace des protéoliposomes alors qu'un ratio faible (< 10 car trop de protéines) entraîne un fort risque d'agrégation des protéines et une augmentation de la perméabilité des protéoliposomes) et enfin la charge des liposomes (des liposomes cationiques peuvent inhiber la traduction et des liposomes cationiques ou anioniques peuvent empêcher le repliement correct de la protéine synthétisée) (Rigaud and Lévy, 2003; Umakoshi et al., 2009).

Nous verrons tout d'abord les liposomes utilisés pour la formation des protéoliposomes ainsi que les différentes techniques de caractérisation des protéoliposomes, et nous finirons par donner quelques exemples de leurs applications.

4.2. Liposomes utilisés

Les liposomes sont des structures vésiculaires sphériques possédant un diamètre allant de 30 nanomètres à quelques micromètres. Ils sont constitués de lipides amphiphiles (à la fois hydrophile et hydrophobe) et bicaténaires (deux chaînes hydrocarbonées et une tête polaire). Grâce à leur capacité à encapsuler des solutions aqueuses et des composés hydrophiles ou lipophiles, ils sont parmi les plus anciens systèmes de transport de molécules utilisés. De plus, ils sont biocompatibles, biodégradables et présentent une faible toxicité. Ils ont été utilisés comme système modèle de membranes pour étudier les membranes cellulaires, dans les technologies de microfluidique, pour la production de nanogels, en cosmétique et en alimentaire, pour l'imagerie, comme outil de vectorisation de médicaments en pharmacologie et cancérologie, de matériel génétique pour la thérapie génique (ADN, ARN, siRNA, miRNA...), d'agents actifs en ingénierie tissulaire, et pour la médecine régénérative (Laouini et al., 2012; Monteiro et al., 2014).

Les propriétés des liposomes varient considérablement en fonction de leur composition en lipides, leur taille, leur méthode de préparation ou leur fonctionnalisation. Nous détaillerons donc brièvement ces quatre points.

4.2.1. La composition lipidique

Les phospholipides sont les composants majeurs de la membrane plasmique grâce à leur propriété amphiphile. Ainsi, parmi les phospholipides naturels, la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE) sont les plus souvent utilisées pour former les liposomes (Figure 18). Mais ces lipides naturels sont moins stables que les synthétiques qui sont formés par modification des phospholipides naturels, par exemple le 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) et le 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoéthanolamine (DOPE) (Figure 18). Comme dans la membrane plasmique, la fluidité et la mobilité des lipides au sein de la bicouche conditionnent les propriétés des liposomes. L'addition de cholestérol (Figure 18), un stéroïde hydrophobe point de départ de la synthèse de nombreuses hormones et jouant un rôle important dans la membrane plasmique, va modifier les propriétés de la bicouche lipidique en augmentant la densité de la zone hydrophobe ce qui aura pour conséquence une diminution de la fluidité et de la perméabilité à l'eau des liposomes et donc une plus grande résistance (Vemuri and Rhodes, 1995). Ainsi, des liposomes composés de phospholipides et cholestérol sont dits « conventionnels ». L'ajout de lipides chargés négativement (comme la PC ou la PE) permet d'éviter l'agrégation voire la fusion des liposomes. De plus, les membranes cellulaires étant chargées négativement, l'activité de nombreuses protéines membranaires va également dépendre de la présence de charges négatives à la surface des liposomes (Rigaud and Lévy, 2003).

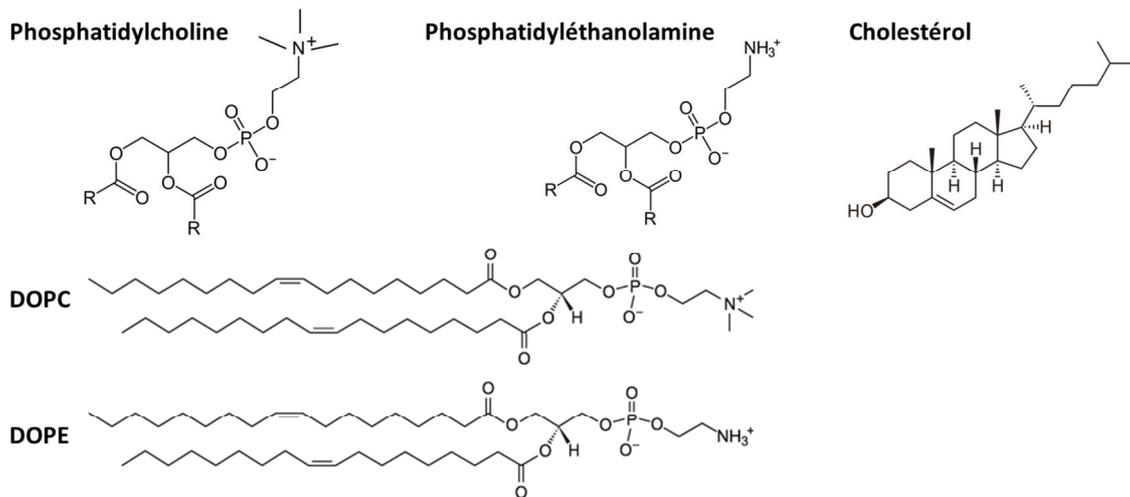


Figure 18. Les principaux lipides utilisés dans la composition des liposomes conventionnels.

4.2.2. La classification des liposomes

Les liposomes sont classés selon leur taille mais également selon le nombre de bicouches lipidiques (aussi appelé lamellarité) (Figure 19).

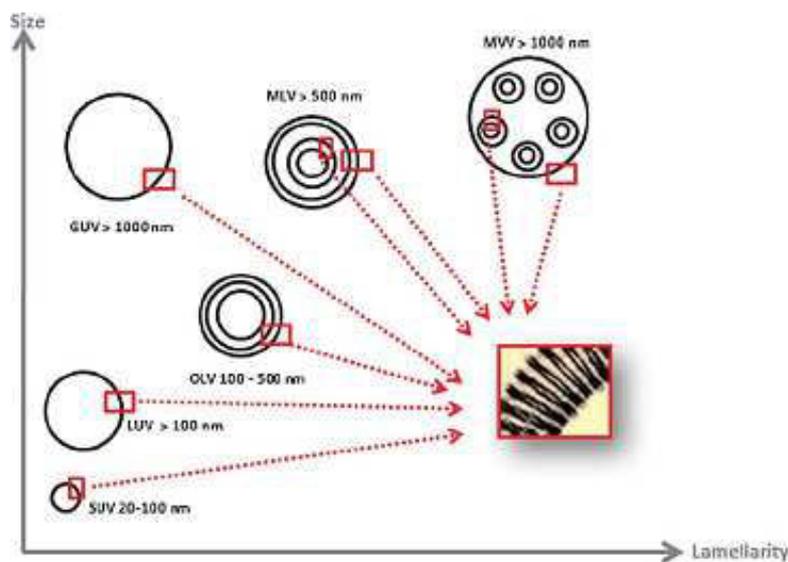


Figure 19. La classification des liposomes selon leur taille et leur lamellarité. Liposomes unilamellaires (ULV, unilamellar vesicle) petits (SUV, small unilamellar vesicle), gros (LUV, large unilamellar vesicle) ou géants (GUV, giant unilamellar vesicle) ; liposomes oligolamellaires (OLV, oligolamellar vesicle) ; liposomes multilamellaires (MLV, multilamellar vesicle) ; liposomes multivesiculaires (MVV, multivesicular vesicle). D'après (Laouini et al., 2012).

La taille des liposomes va conditionner leur stabilité ainsi que leur vitesse d'élimination de la circulation sanguine. Ainsi, leur stabilité est maximale entre 80 et 200 nm, et des liposomes de taille inférieure à 70 nm et supérieure à 300 nm vont être plus rapidement éliminés que des liposomes de taille d'environ 150-200 nm, avec une accumulation dans le foie pour les plus petits et dans la rate pour les plus gros (Litzinger et al., 1994).

Les liposomes peuvent également être classés selon leur composition et leur application *in vivo*. En dehors des liposomes conventionnels, il existe également des liposomes à longue durée de

circulation, des immunoliposomes, des liposomes chargés (cationiques ou anioniques) ou fluorescents (lipides fluorescents) et des liposomes sensibles au pH (Figure 20).

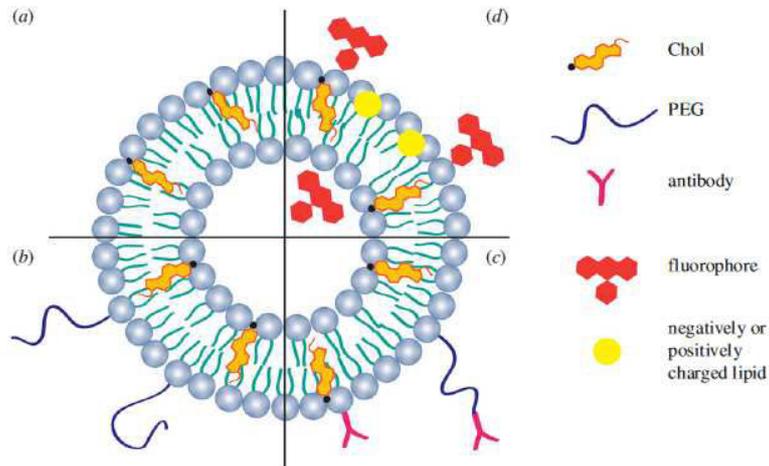


Figure 20. La classification des liposomes selon leur composition et leur application. (a) Liposomes conventionnels, (b) liposomes à longue durée de circulation oufurtifs, (c) immunoliposomes et (d) liposomes fluorescents ou chargés. D'après (Monteiro et al., 2014).

Liposomes conventionnels

Comme décrit précédemment, les liposomes conventionnels sont constitués de phospholipides (chargés ou non) et de cholestérol. Ils sont très couramment utilisés pour la vectorisation de médicaments. Cependant, ils sont généralement très rapidement éliminés de la circulation sanguine par les macrophages du foie et de la rate.

Liposomes à longue durée de circulation

Pour pallier à la courte durée de circulation sanguine des liposomes conventionnels, des modifications ont été apportées afin d'augmenter leur demi-vie. Ainsi, la liaison covalente de polymères hydrophiles synthétiques tels que le polyéthylène glycol (PEG) à la surface des liposomes change les propriétés de surface et leur confère notamment une certaine hydrophilie qui améliore leur pharmacocinétique *in vivo*. Les liposomes constitués de phospholipides, cholestérol et PEG sont appelés « *sterically stabilized liposomes* » ou «furtifs» ou liposomes PEGylés (Figure 20). Cette surface PEGylée formerait une barrière stérique empêchant l'adsorption de protéines notamment plasmatiques comme les opsonines à la surface des liposomes et empêcherait leur phagocytose par les cellules du système réticulo-endothélial (Woodle, 1998). Il semblerait cependant que l'administration répétée de liposomes PEGylés conduise à leur élimination rapide du sang par un phénomène de «clairance accélérée» [*accelerated blood clearance (ABC)*] due à une réponse immunogène avec apparition d'anticorps anti-PEG et conduisant à l'apparition d'effets indésirables pouvant être très graves (Wang et al., 2007). Ainsi, des polysaccharides naturels comme l'héparine, le chitosan, le dextran ou d'autres polymères naturels ou synthétiques se sont révélés intéressants pour remplacer le PEG (Knop et al., 2010).

Immunoliposomes

Des anticorps entiers ou des fragments d'anticorps spécifiques d'une cible antigénique peuvent être utilisés pour fonctionnaliser les liposomes avec comme objectif l'interaction des liposomes avec des antigènes ou des récepteurs de surface surexprimés sur la cellule cible. Les anticorps sont fixés directement au niveau de la bicouche lipidique ou à l'extrémité de la chaîne de PEG (Figure 20). Ces liposomes ainsi modifiés ont été appelés « *ligand-targeted liposomes* » ou immunoliposomes (Moles et al., 2015).

4.2.3. Les techniques de préparation des liposomes

De nombreuses méthodes de préparation des liposomes ont été développées, mais les trois principales techniques utilisées sont : l'hydratation d'un film phospholipidique, l'évaporation en phase inverse ou par injection de solvant (Laouini et al., 2012; Monteiro et al., 2014).

Ces techniques de préparation des liposomes produisent généralement des LUV ou des MLV. Et la plupart d'entre elles aboutissent à l'obtention de liposomes de taille hétérogène. Des méthodes physiques telles que l'extrudation ou la sonication permettent ensuite d'homogénéiser la taille. Les liposomes utilisés pour la formation des protéoliposomes sont classiquement des LUV mais leur taille est souvent hétérogène malgré les méthodes pour homogénéiser et il reste parfois des vésicules multilamellaires résiduelles (Katzen et al., 2009).

4.3. Caractérisation des protéoliposomes

Caractériser les protéoliposomes après leur production est indispensable pour contrôler leur qualité, leur stabilité, s'assurer de la reproductibilité de leur fabrication, prédire leur comportement *in vitro* et *in vivo*. Cette caractérisation est d'autant plus importante si l'objectif est une utilisation thérapeutique chez l'Homme.

4.3.1. Taille/diamètre moyen

La taille ou le diamètre moyen des liposomes peuvent être déterminés par différentes techniques parmi lesquelles :

- des techniques de diffusion d'un rayonnement comme la diffusion dynamique de la lumière ou *dynamic light scattering* (DLS), qui est assez rapide et permet de déterminer le diamètre hydrodynamique de particules ainsi que la distribution des tailles des particules dissoutes dans un solvant. La technique de diffusion statique de la lumière ou *static light scattering* (SLS) permet de mesurer la masse molaire absolue à partir de la relation entre l'intensité de la lumière diffusée par une molécule, sa taille et sa masse molaire. Et enfin, la diffusion des rayons X aux petits angles en

solution ou *small-angle X-ray scattering* (SAXS) dans laquelle les photons diffusés en traversant l'échantillon vont fournir des informations sur la forme, les dimensions et également la structure des liposomes (Laouini et al., 2012; Monteiro et al., 2014).

- des techniques de microscopie : la microscopie optique, la microscopie à transmission électronique (TEM, *transmission electron microscopy*), la microscopie de force atomique (AFM, *atomic force microscopy*) et la microscopie confocale à balayage laser (CLSM, *confocal laser scanning microscopy*) peuvent donner des informations sur la dimension et la forme des liposomes mais également sur leur structure interne ou leurs propriétés de surface (Pacllet et al., 2000; Ruozi et al., 2011).

- la cytométrie en flux permettrait également de mesurer la taille de chaque particule grâce au principe de diffusion de la lumière, en donnant des informations sur la distribution de leur taille dans un échantillon, mais elle requiert l'utilisation d'un cytomètre adapté à la détection de particules de taille < 0,5 μm ou fluorescentes (Nolte-t Hoen et al., 2012).

4.3.2. Le potentiel zêta (ζ)

Le potentiel zêta représente la charge électrique qu'une particule acquiert grâce aux ions qui l'entourent quand elle est en solution. Ainsi, en mesurant l'intensité des répulsions électrostatiques entre particules, il permet de prédire la stabilité d'une suspension de protéoliposomes. En effet, si les particules en suspension ont un potentiel zêta négatif ou positif important (> 30 mV en valeur absolue), elles vont avoir tendance à se repousser et il n'y aura pas de phénomène d'agrégation : elles sont considérées stables. Au contraire, des particules avec un potentiel zêta positif ou négatif faible vont avoir tendance à s'agréger (Laouini et al., 2012). L'électrophorèse laser Doppler ou *Laser Doppler electrophoresis* (LDE) est la technique la plus largement utilisée pour la mesure du potentiel zêta. L'électrophorèse capillaire s'est développée également dans le but de déterminer la migration électrophorétique et donc le potentiel zêta (Franzen et al., 2011).

4.3.3. L'efficacité d'incorporation des protéines membranaires

L'efficacité d'incorporation est définie comme la quantité totale de protéines encapsulées/intégrées dans les liposomes par rapport à la quantité initiale de protéines. La mise en œuvre d'une migration par SDS-PAGE suivie d'une détection par western blot permet de mettre en évidence de façon simple et rapide la présence des protéines d'intérêt au sein des protéoliposomes. Cependant, la méthode la plus précise mais aussi la plus lourde pour mesurer cette incorporation est le gradient de sucrose : la quantité de protéines et de lipides dans les différentes couches de sucrose est analysée par colorimétrie, marquage radioactif ou fluorescent (Rigaud and Lévy, 2003). Une autre technique très efficace est la cryofracture des protéoliposomes qui fait apparaître, de façon isolée, chacun des 2 feuillettes de la bicouche lipidique avec soit des protéines qui font saillie, soit des cavités vides. Les

feuilletés sont ensuite traités par pulvérisation de carbone et de platine et cette empreinte carbone-platine est analysée par microscopie électronique à transmission (Severs, 2007).

4.3.4. La pureté des protéines membranaires incorporées

Lors de la synthèse des protéoliposomes, des impuretés peuvent être incorporées en plus de la protéine d'intérêt. Ainsi, la présence de protéines non spécifiques comme des protéines cellulaires provenant de la cellule hôte dans les systèmes de production cellulaires ou à cause de la présence d'ADN ou ARNm résiduel dans le lysat dans les systèmes de production acellulaires peut être analysée par SDS-PAGE puis quantification après coloration au bleu de Coomassie ou à l'argent par exemple.

4.3.5. L'activité fonctionnelle de la protéine membranaire

Lorsque la protéine membranaire d'intérêt possède une activité particulière (transport, énergie, enzymatique,...), il est important de vérifier que cette activité est conservée dans les protéoliposomes. La détermination de cette activité est ainsi spécifique à chaque protéine membranaire (Rigaud and Lévy, 2003).

4.4. Principales applications des protéoliposomes

4.4.1. La thérapie protéique utilisant des protéoliposomes

Contrairement à la thérapie génique, la thérapie protéique vise à remplacer directement la protéine défectueuse et non le gène. Peu d'exemples de thérapies protéiques utilisant les protéoliposomes ont été publiés jusqu'à présent. Il est cependant à noter un fort potentiel de cette nouvelle technologie pour la vaccination anti-parasitaire (Migliaccio et al., 2008; Santos et al., 2006) et anti-bactérienne (Fernández et al., 2013; Tirado et al., 2015). Pour cela, des extraits d'agents pathogènes sont généralement intégrés au niveau de la membrane des protéoliposomes qui, après administration, vont induire une réponse humorale *in vivo*. Ces approches vaccinales sont pour l'instant au stade de l'expérimentation animale mais pourraient être utilisées chez l'Homme dans le futur. A l'inverse, des protéoliposomes ont déjà démontré leur efficacité dans un essai clinique de phase I chez des patients atteints de lymphome folliculaire : des protéines membranaires de la tumeur de chaque patient sont extraites et incorporées dans la membrane des liposomes en même temps que l'IL2 qui stimule la prolifération des lymphocytes T activés. Ces protéoliposomes ont induit une réponse immune dirigée contre les antigènes de la tumeur et permis la rémission complète chez un patient et une stabilisation de la maladie chez un second patient (Neelapu et al., 2007). Deux essais de phase III sont également actuellement en cours pour le traitement du cancer métastatique du sein après le succès de l'étude de phase II avec des protéoliposomes vaccinaux : des

protéoliposomes formés du ganglioside NeuGcGM3 exprimé par les cellules cancéreuses et inclus dans la membrane de *Neisseria meningitidis* déclenchent ainsi une réponse humorale et cellulaire ciblée qui a permis une meilleure survie des patientes vaccinées (Mulens et al., 2010). En thérapie protéique anti-cancéreuse proprement dite, notre équipe a réussi à induire l'apoptose des lignées cellulaires de carcinome colorectal *in vitro* grâce à l'apport, dans ces cellules, de la protéine pro-apoptotique Bak sous forme de protéoliposomes (Liguori et al., 2008). Bak est une protéine normalement localisée dans la membrane mitochondriale externe et participe à l'activation de la voie apoptotique intrinsèque. Récemment, ces protéoliposomes Bak ont notamment permis la régression tumorale *in vivo* de glioblastomes dans un modèle murin (Liguori et al., 2015).

L'utilisation de protéoliposomes pour le transport de protéines membranaires produites par des systèmes acellulaires est une avancée récente. Leurs applications sont pour l'instant encore peu développées mais il est très probable qu'elles le deviennent dans les années futures.

4.4.2. Les autres applications des protéoliposomes

Production d'anticorps monoclonaux – Des protéines membranaires entières, purifiées, dans leur conformation correcte, et présentes avec une haute densité à la surface des protéoliposomes représentent un antigène idéal pour la production d'anticorps monoclonaux dirigés contre ces protéines. Il a ainsi été montré que l'injection des protéoliposomes à des souris ou des lapins induisait la production d'anticorps spécifiques de récepteurs membranaires couplés aux protéines G (RCPG). Cela permettrait ainsi de disposer d'anticorps thérapeutiques contre ces récepteurs impliqués dans la plupart des réponses cellulaires à des hormones, neurotransmetteurs, etc. (Takeda et al., 2015).

Diagnostic - Les protéoliposomes ont également démontré leur intérêt dans le diagnostic de certaines pathologies caractérisées par la production d'auto-anticorps. Dans le cas des maladies thyroïdiennes comme la maladie d'Hashimoto par exemple des protéoliposomes ayant incorporé le récepteur à la TSH (*thyroid-stimulating hormone*) permettent de détecter directement la présence d'auto-anticorps dirigés contre le TSHR dans le sang du patient (Fukushima et al., 2009). De même, d'autres applications diagnostiques sont en développement comme l'utilisation des protéoliposomes comme « capteurs biomimétiques » permettant la détection d'anticorps ou de paramètres biologiques comme le glucose (Bally et al., 2010; Ciancaglini et al., 2012; Gayet and Lenormand, 2015). En plus du diagnostic, cette approche miniaturisée (« protein array ») s'avérerait très utile pour le screening et le développement de molécules thérapeutiques (Bally et al., 2010).

Détermination de la structure des protéines membranaires – L'incorporation des protéines membranaires dans des protéoliposomes ou des protéomicelles a représenté une avancée majeure

dans l'élucidation de leur structure par des techniques de cristallographie rayon X (Deniaud et al., 2010) ou par spectroscopie par RMN (Koglin et al., 2006; Murray et al., 2014).

Détermination de la fonction des protéines membranaires – Comprendre la fonction d'une protéine membranaire est également possible grâce aux protéoliposomes. On peut citer l'exemple de la porine OEP24 issues de chloroplastes (Liguori et al., 2010), d'une autre protéine avec une fonction de canal ionique (Kreir et al., 2008) et très récemment du transporteur GLUT4 de rat impliqué dans l'homéostasie du glucose (Kraft et al., 2015).

OBJECTIFS DE LA THESE

La Granulomatose Septique Chronique est une maladie génétique rare de l'immunité innée dans laquelle les patients atteints souffrent d'infections graves et récurrentes mettant en jeu leur pronostic vital. Actuellement, le manque de stratégies thérapeutiques dans cette pathologie ainsi que de modèles cellulaires et animaux pertinents sont évidents.

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail de thèse étaient multiples :

1) Produire des modèles cellulaires physiopathologiques de la CGD à partir de cellules souches iPS générées à partir de fibroblastes de patients atteints de CGD. Au cours de ce travail, trois formes génétiques de CGD ont été modélisées : CGDX, CGDAR22 et CGDAR47, pour deux types de cellules phagocytaires : neutrophiles et macrophages. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'un article publié en Décembre 2014 qui est présenté dans la prochaine section.

2) Développer une approche de thérapie protéique basée sur l'utilisation de protéoliposomes. Le but était de faire la preuve de concept de l'utilisation de protéoliposomes vectorisant le complexe protéique membranaire *cytb₅₅₈* dans des macrophages CGDX pour restaurer une activité NADPH oxydase fonctionnelle *in cellulo*. Un article est actuellement en cours de rédaction et, bien que certaines expériences restent à réaliser, la version actuelle de cet article est présentée ici.

3) Générer des modèles murins « humanisés » de la CGD. Une optimisation des conditions de culture pour induire la différenciation hématopoïétique des cellules iPS est également en cours afin de produire des cellules hématopoïétiques CD34⁺ capables de reconstituer un système hématopoïétique humain après transplantation dans des souris immunodéficientes. Les résultats préliminaires réalisés pour évaluer la faisabilité de cette approche sont détaillés dans la section suivante également.

**REVUE SUR LES DESORDRES GENETIQUES ASSOCIES A
LA DEFICIENCE EN FRO**

Présentation de la revue

O'Neill S, Brault J, Stasia MJ, Knaus UG. (2015). Genetic disorders coupled to ROS deficiency. *Redox Biology*.6:135–156.

Chez l'Homme, la famille des NADPH oxydases contient 7 isoformes de la sous-unité catalytique (NOX1-5 et *dual oxidase* DUOX1-2). Chaque isoforme est unique en termes de distribution tissulaire, structure, interaction avec les sous-unités cytosoliques (p22^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, Rac1/2, NOXO1, NOXA1, DUOXO1, DUOXA1) et mécanisme d'activation. Cette famille peut être divisée en 2 classes : les enzymes NOX associées à p22^{phox} (NOX1, 2, 3 et 4) et celles régulées par le calcium (NOX5, DUOX1 et DUOX2) (Bedard and Krause, 2007).

Jusque dans les années 1990, la NADPH oxydase phagocytaire (contenant NOX2) était la seule connue ; mais d'autres NOX ont par la suite été détectées dans des cellules non phagocytaires. Elles sont par exemple retrouvées associées ou non à NOX2 dans les cellules endothéliales (NOX2, NOX4 et NOX5), les cellules du muscle lisse (NOX1, NOX2 et NOX4), les cellules souches hématopoïétiques (NOX1, 2 et 4), les neurones (NOX2 et 4), le côlon (NOX1), le rein (NOX4), l'épithélium pulmonaire (NOX1, DUOX1), les cellules thyroïdiennes (DUOX1 et 2), l'oreille interne (NOX3), etc (Bedard and Krause, 2007; Lambeth, 2004). Leur niveau de production de FRO est cependant 100 fois plus faible que dans les cellules phagocytaires activées. La notion du rôle des FRO comme seconds messagers a alors émergé, et leur implication dans les mécanismes cellulaires comme l'angiogenèse, l'hématopoïèse, la réparation tissulaire, la prolifération, l'apoptose, la sénescence et la migration cellulaire, le contrôle de la réponse inflammatoire, etc. a été largement démontrée (Brieger et al., 2012; Lambeth, 2004).

Le niveau des FRO est finement régulé dans l'organisme et des variations importantes peuvent donc avoir un impact physiologique majeur. La diversité des atteintes est liée à la localisation tissulaire ubiquitaire de ces enzymes et à leur implication dans de nombreux processus. La production excessive de FRO, surpassant les mécanismes de défense anti-oxydante naturelle de l'organisme, est délétère pour les cellules car elle induit l'oxydation des lipides ou d'autres protéines, des mutations dans l'ADN ou l'hyper-activation des voies de signalisation dépendantes des FRO, ce qui peut donc entraîner l'apparition de maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, cancers... A l'inverse, l'importance des FRO comme molécules de signalisation pourrait expliquer certaines conséquences physiopathologiques induites par une déficience en NOX ou en facteurs cytosoliques (Brieger et al., 2012).

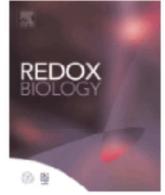
Comme cela a été très largement abordé dans l'introduction, la NADPH oxydase phagocytaire joue un rôle essentiel dans les phagocytes pour la défense anti-infectieuse. Ainsi, le déficit de NOX2,

ou également des autres sous-unités du complexe, dans les cellules phagocytaires est responsable de l'apparition de la CGD ; il s'agit de l'exemple le plus connu et le plus étudié. Des mutations spécifiques dans le gène *CYBB* peuvent conduire à l'inhibition complète (X^0 et X^+) ou partielle (X^-) de son activité. L'étude de ces variants (et de leurs mutations) a permis de comprendre la structure de NOX2 et ses interactions avec les autres protéines du complexe (Stasia and Li, 2008). Contrairement aux idées reçues associant les FRO à l'inflammation, ceux-ci sont également essentiels à la résolution de l'inflammation et de la réponse immune ainsi qu'à la protection vis-à-vis des maladies auto-immunes (Schäppi et al., 2008). L'hyperinflammation retrouvée chez les patients atteints de CGD pourrait être due à un défaut de production de FRO conduisant à différents mécanismes discutés dans cette revue tels qu'un défaut d'apoptose des cellules inflammatoires, l'accumulation de débris cellulaires, l'absence d'inactivation de médiateurs pro-inflammatoires conduisant à une réponse inflammatoire prolongée mais aussi le dysfonctionnement de l'autophagie entraînant l'activation de l'inflammasome NLP3 avec production anormale d'IL1 β (de Luca et al., 2014)

Cependant, d'autres atteintes peuvent être induites par le déficit en NOX2 ou en facteurs cytosoliques dans les cellules non phagocytaires du fait de leur expression ubiquitaire. Ainsi, l'absence d'expression de NOX2 au niveau vasculaire (endothélium, adventice, plaquettes...) ou dans les neurones pourrait être responsable de maladies vasculaires (dilatation artérielle par exemple) ou de maladies cérébrales (déficit synaptique et défaillance de la mémoire) respectivement (Kishida et al., 2006; Violi et al., 2009). De même, il existerait un lien entre la déficience en $p47^{phox}$ et l'apparition de diabète (NOX2 et 4 dans les cellules pancréatiques β) ainsi que de maladies rénales ou cardiovasculaires (NOX2) (Leiding et al., 2013). Enfin, la déficience en NOX2 ainsi que certains variants de *CYBA*, *NCF1*, *NCF2*, *NCF4*, *NOX1* et *DUOX1* sont reconnus comme un facteur de susceptibilité pour le développement de maladies inflammatoires de l'intestin (maladie de Crohn, colite ulcéreuse). Il n'est donc pas surprenant que des atteintes gastro-intestinales soient fréquemment rencontrées chez les patients CGD (près de 33 %) (Marciano et al., 2004). L'étude de la littérature montre également que d'autres variants dans les gènes codants pour les différents composants de la NADPH oxydase pourraient être des facteurs de susceptibilité pour d'autres pathologies (infections mycobactériennes, hypertension, arthrite rhumatoïde, lupus...).

Les DUOX1 et 2 sont responsables de la production d' H_2O_2 dans les cellules thyroïdiennes et sont essentielles pour la synthèse des hormones thyroïdiennes. Des mutations dans l'hétérodimère DUOX2/DUOXA2 notamment sont donc impliquées dans l'hypothyroïdie congénitale (Moreno et al., 2002). Plus de 40 variants de DUOX2 ont été répertoriés dans la littérature, certains sont associés à un hypothyroïdisme transitoire alors que d'autres conduisent à des formes sévères permanentes. Cette revue présente, dans ce contexte, la conséquence des variants sur la structure de l'enzyme et sur sa fonction de synthèse des hormones thyroïdiennes.

Les modèles cellulaires, notamment les cellules PLB-985 pouvant être différenciées en « pseudo-neutrophiles », ont été très largement utilisés pour les études de relation structure-fonction de NOX2 et ces études sont résumées dans cette revue. Cependant, grâce à la technologie des cellules iPS, plusieurs équipes ont pu obtenir de véritables phagocytes possédant les caractéristiques morphologiques et phénotypiques des neutrophiles et des macrophages physiologiques et ce, à partir de cellules somatiques de souris *knock-out* pour *CYBB* (CGDX) et de patients CGD. Nous détaillons brièvement ici les techniques de différenciation hématopoïétique mises en œuvre pour produire des neutrophiles ou des macrophages, ce qui n'avait pas encore été rapporté dans les revues précédentes sur le sujet (Kang and Malech, 2012; Kaufmann et al., 2014). Les avancées des approches de thérapie génique rendues possibles grâce à ces nouveaux modèles cellulaires ainsi que les applications futures des cellules iPS dans le cas de la CGD sont également abordées.



Review Article

Genetic disorders coupled to ROS deficiency

Sharon O'Neill^a, Julie Brault^{b,c}, Marie-Jose Stasia^{b,c}, Ulla G. Knaus^{a,*}^a Conway Institute, University College Dublin, Dublin, Ireland^b Université Grenoble Alpes, TIMC-IMAG Pôle Biologie, CHU de Grenoble, Grenoble, France^c CGD Diagnosis and Research Centre, Pôle Biologie, CHU de Grenoble, Grenoble, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 June 2015

Received in revised form

15 July 2015

Accepted 16 July 2015

Available online 17 July 2015

Keywords:

NADPH oxidase

Chronic granulomatous disease

Inflammatory bowel disease

Hypothyroidism

NOX

DUOX

Genetic disease

Reactive oxygen species (ROS)

ABSTRACT

Maintaining the redox balance between generation and elimination of reactive oxygen species (ROS) is critical for health. Disturbances such as continuously elevated ROS levels will result in oxidative stress and development of disease, but likewise, insufficient ROS production will be detrimental to health. Reduced or even complete loss of ROS generation originates mainly from inactivating variants in genes encoding for NADPH oxidase complexes. In particular, deficiency in phagocyte Nox2 oxidase function due to genetic variants (*CYBB*, *CYBA*, *NCF1*, *NCF2*, *NCF4*) has been recognized as a direct cause of chronic granulomatous disease (CGD), an inherited immune disorder. More recently, additional diseases have been linked to functionally altered variants in genes encoding for other NADPH oxidases, such as for *DUOX2/DUOXA2* in congenital hypothyroidism, or for the Nox2 complex, *NOX1* and *DUOX2* as risk factors for inflammatory bowel disease. A comprehensive overview of novel developments in terms of Nox/Duox-deficiency disorders is presented, combined with insights gained from structure–function studies that will aid in predicting functional defects of clinical variants.

© 2015 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Contents

1. Introduction	136
2. Chronic granulomatous disease – the new faces of the disease	136
2.1. Background	136
2.2. Are absence of ROS and hyperinflammation paradoxical in CGD?	136
2.3. Pathologies associated to CGD	138
2.3.1. Nox2 deficiency and vascular diseases	138
2.3.2. Nox2 deficiency and brain diseases	138
2.3.3. p47 ^{phox} deficiency, diabetes, renal and cardiovascular diseases	139
2.4. Rare variants in X-CGD are useful to decipher Nox2 structure and function	139
2.4.1. Functional domains of Nox2	139
2.4.2. Structural domains of Nox2	141
2.5. Refined analysis of recent <i>NCF1</i> and <i>NCF2</i> variants	142
2.5.1. <i>NCF1</i> and <i>NCF1</i> pseudogenes	142
2.5.2. <i>NCF2</i> gene	142
2.6. Induced pluripotent stem cells – potent cellular models for pathophysiological studies and therapeutic development	142
3. Inflammatory bowel disease – reduced ROS as risk factor	144
3.1. Genetic susceptibility to IBD–CGD and beyond	144
3.2. Mucosal NADPH oxidases as novel IBD susceptibility genes – <i>NOX1</i> and <i>DUOX2</i>	145
4. Hypothyroidism – spotlight on <i>DUOX2/DUOXA2</i>	146
4.1. Duox biochemistry and regulation	147
4.2. <i>DUOX2</i> variants in hypothyroidism	147
4.3. DuoxA2 biochemistry and <i>DUOXA2</i> variants in hypothyroidism	150

* Correspondence to: Conway Institute, School of Medicine, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland.
E-mail address: ulla.knaus@ucd.ie (U.G. Knaus).

5. Discussion	151
Conflict of interest	151
Acknowledgments	151
References	151

1. Introduction

Oxidative stress, the imbalance between the generation of reactive oxygen species (ROS) and the ability of antioxidant defense systems to scavenge ROS, has been recognized as a risk and contributing factor for various forms of pathophysiology, including inflammation and tissue injury, neurodegeneration, and carcinogenesis. Many enzyme systems can be the source of superoxide ($O_2^{\bullet-}$) or hydrogen peroxide (H_2O_2), the initial ROS produced, and even more proteins are involved in adduct reactions involving oxygen radicals, generating for instance hypochlorous acid or peroxynitrite. A similar variety exists in antioxidant systems. The overall redox balance is critical for propagation and termination of essential signaling pathways in cells and tissues, while specialized functions in certain cells such as phagocytes require a regulated burst of ROS. Undesirable consequences of increased ROS, due to deregulated ROS overproduction or failure of antioxidant systems, can be detected by changes in cellular responses such as increased apoptosis or cell proliferation, and even in cases of overall cellular adaptation by the appearance of oxidative modifications on DNA, proteins or lipids.

The dichotomy of ROS being vital signaling molecules in a plethora of physiological processes while also propagating disease often impedes a clear distinction between beneficial and harmful ROS, but a comprehensive study of genetic disorders can reveal the overall consequences for health when the redox balance is permanently altered. For example, sequence alterations in mitochondrial DNA, superoxide dismutases, catalase and glutathione synthetase usually augment ROS levels. In contrast, NADPH oxidases (Nox/Duox), the only enzyme family whose sole known purpose is the regulated generation of ROS, are downregulated or inactivated in genetic variants. NADPH oxidases have been associated with pathologically elevated ROS mainly by linking gene/protein expression profiles with ROS levels and oxidative modifications, but inferring a causal relationship of increased ROS with disease has been more challenging. The only potential gain-of-function variants of a gene directly required for terminal NADPH oxidase activation are certain *CYBA* (p22^{phox}) polymorphisms that may increase Nox1–4 activity and confer an elevated risk for cardiovascular disease [1–4]. On the other hand, loss-of-function variants in genes required for formation and catalytic activity of active Nox/Duox complexes are increasingly recognized as risk factors, or as origin of inherited or spontaneous genetic diseases that are characterized by reduced or abolished ROS production. The NADPH oxidase family comprises seven members (Nox1–5, Duox1–2) in humans, all of which assemble as multimeric complexes regulated by protein–protein interactions and by the small GTPase Rac (Nox1–3), requiring phosphorylation, calcium flux or lipid binding to generate $O_2^{\bullet-}$ or H_2O_2 by catalyzing the transfer of electrons from NADPH to molecular oxygen. Their largely tissue-specific expression profiles correlate well with specific genetic diseases linked to Nox/Duox deficiency. Here, disorders associated with gene variants in NADPH oxidases including chronic granulomatous disease, inflammatory bowel disease and congenital hypothyroidism will be discussed in the context of functional consequences initiated by structural changes due to missense variants.

2. Chronic granulomatous disease – the new faces of the disease

2.1. Background

Chronic granulomatous disease (CGD) is a rare inherited immunodeficiency syndrome (frequency 1/200,000 to 1/250,000) characterized by mutations in one of the genes encoding the components of the Nox2 NADPH oxidase complex in phagocytic cells. In most patients, diagnosis occurs early in childhood due to recurrent and life-threatening infections with bacterial and fungal pathogens (mainly catalase-positive bacteria, e.g. *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia* and *Nocardia* species, and fungi e.g. *Aspergillus* and *Candida* species). These infections cannot be contained due to deficient generation of superoxide by a functionally impaired or structurally labile (and often absent) NADPH oxidase in innate immune cells, as pathogens cannot be killed even when phagocytosed efficiently [5,6].

Understanding the composition of the multimeric phagocyte Nox2 oxidase was greatly aided by studies on neutrophils collected from CGD patients [7–9]. CGD is a genetically heterogeneous disease with all ethnic groups equally affected. The molecular basis of CGD is characterized by two types of transmission and four main genetic forms. The major genetic form of CGD is X-linked CGD caused by mutations in the *CYBB* gene (OMIM number 306400) encoding gp91^{phox} (renamed Nox2) (Fig. 1). X-CGD represents about 70% of the total cases reported to date [10]. The other forms of CGD are autosomal recessive (AR), characterized by mutations in *CYBA* (OMIM number 233690), *NCF1* (OMIM number 233700) and *NCF2* (OMIM number 233710) encoding p22^{phox}, p47^{phox} and p67^{phox} respectively [11]. Whereas AR-CGD22⁰ and AR-CGD67⁰ are extremely rare (less than 5% of cases), AR-CGD47⁰ occurs with high frequency (about 25% of CGD cases) due to the presence of two *NCF1* pseudogenes carrying the main mutation. Up to now only one case of AR-CGD in *NCF4*, encoding p40^{phox}, was described [12]. Nox2 oxidase activity additionally requires activation of the small GTP-binding protein Rac, which was discovered concomitantly by Knaus et al [13] and Abo et al. [14] in neutrophils. The importance of Rac2 was underlined by a case of severe immunodeficiency diverging from classical CGD in a 5-week-old child that was traced back to a dominant negative mutation in *RAC2* [15,16]. For *CYBB*, *CYBA*, *NCF1* and *NCF2* many variants harboring deletions, frame shifts, missense, nonsense and splice site mutations have been identified and are accessible at the immunodeficiency (ID) bases (<http://structure.bmc.lu.se/idbase/>).

2.2. Are absence of ROS and hyperinflammation paradoxical in CGD?

The link between absent or decreased ROS production in CGD and defective killing mechanisms including autophagy is well established, but in contrast to the prevailing notion of ROS initiating or exacerbating tissue damage, hyperinflammation is often documented in CGD patients. Initially, decreased degradation of phagocytosed material in the absence of ROS production was considered the cause of the observed proinflammatory phenotype. Thereby, phagocytosed microorganisms could accumulate in NADPH oxidase deficient phagocytes leading to persistent cell

Abbreviations

ALS	amyotrophic lateral sclerosis	MPO	myeloperoxidase
CD	Crohn's disease	NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
CFU-G	colony forming unit-granulocyte	NCF1/2/4	neutrophil cytosolic factor 1/2/4
CGD	chronic granulomatous disease	NF- κ B	nuclear factor-kappa B
CH	congenital hypothyroidism	NIS	NADPH domain insertion sequence
CV	cardiovascular	NO	nitric oxide
DSS	dextran sulfate sodium	NOX1-5	NADPH oxidase 1-5
DUOX	dual oxidase	NOXA1	NADPH oxidase activator 1
DUOXA	DUOX maturation factor	NOXO1	NADPH oxidase organizer 1
EB	embryoid body	O ₂ ⁻	superoxide
ER	endoplasmic reticulum	OMIM	online Mendelian inheritance in man
ESC	embryonic stem cell	OxLDL	oxidized low-density lipoprotein
FAD	flavin adenine dinucleotide	phox	phagocyte oxidase
FMD	flow-mediated arterial dilation	PIOD	partial iodide organification defect
FNR family	fumarate-nitrate reductase regulator protein family	PMA	phorbol 12-myristate-13-acetate
GEF	guanine nucleotide exchange factor	PO	peroxidase
GI tract	gastrointestinal tract	ROS	reactive oxygen species
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor	SCH	subclinical hypothyroidism
GWAS	genome-wide association study	SIN	self-inactivating
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide	SLE	systemic lupus erythematosus
IBD	inflammatory bowel disease	SNP	single nucleotide polymorphism
IDO	indolamine 2,3 dioxygenase	SOD	superoxide dismutase
IEC	intestinal epithelial cell	TG	thyroglobulin
IFN- γ	interferon gamma	ThOX	thyroid oxidase
IL-1	interleukin-1	TIOD	total iodide organification defect
iNOS	inducible nitric oxide synthetase	TLR	toll-like receptor
iPSC	induced pluripotent stem cell	TM	transmembrane
IYD	iodotyrosine deiodinase	TNBS	trinitrobenzene sulfonic acid
KO	knockout	TPO	thyroid peroxidase
LPO	lactoperoxidase	TSH	thyroid stimulating hormone
LPS	lipopolysaccharide	TSHR	thyroid stimulating hormone receptor
LTP	long term potentiation	UC	ulcerative colitis
t-T ₄	L-thyroxine/levothyroxine	VEOIBD	very early onset inflammatory bowel disease
		WBS	Williams-Beuren Syndrome
		ZFN	zinc finger nuclease

activation. In addition, ROS can induce neutrophil apoptosis of inflammatory cells limiting inflammation. Efferocytosis, the uptake of apoptotic cells, conducted by macrophages through phosphatidyl serine receptors, is also reduced in CGD [17]. The overall consequence will be unbalanced neutrophil necrosis, an increase

of proteases and toxic oxygen-derived components, as well as release of proinflammatory cytokines, all contributing to local inflammation. CGD macrophages are also severely compromised in their ability to produce anti-inflammatory mediators due to a delay in apoptotic debris clearance [18].

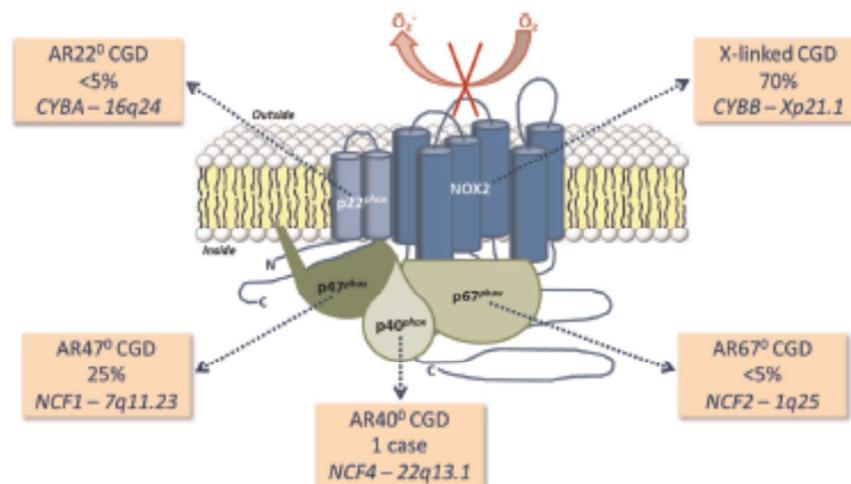


Fig. 1. Molecular basis of chronic granulomatous disease. CGD is caused by alterations in *CYBB*, *CYBA*, *NCF1*, *NCF2* or *NCF4* encoding *Nox2*, *p22^{phox}*, *p47^{phox}*, *p67^{phox}* and *p40^{phox}* respectively. The main genetic form is X-linked CGD representing about 70% of total cases. Three autosomal recessive CGD forms, AR-CGD47^p, AR-CGD67^p, and AR-CGD22^p, represent the rest of the cases described, the AR-CGD47^p being the most frequent form (25% of cases). Only one *NCF4* variant has been described up to now.

Another factor that may explain hyperinflammation in tissues of CGD patients are alterations in intracellular signaling. ROS are essential for regulating signaling pathways and in particular the absence of ROS in CGD phagocytes favors proinflammatory responses [19,20]. Thus, ROS act as anti-inflammatory mediators that control gene expression, for example via NF- κ B activation, thereby limiting the development of inflammatory disorders [21]. In addition, expression of certain innate immune receptors such as Toll-like receptor 5 that recognizes bacterial flagellin, or complement receptor, are reduced in CGD neutrophils [22]. However, how this decrease of immune receptors at the cell surface contributes to inflammatory manifestations in CGD patients remains unexplained.

The role of indolamine 2,3-dioxygenase (IDO) in CGD hyperinflammation is not yet resolved. IDO, mainly expressed in dendritic cells and monocytes, converts ϵ -tryptophan into ϵ -kynurenine, which acts as an anti-inflammatory agent by a poorly understood mechanism. ϵ -kynurenine can induce cell death in pro-inflammatory Th17 and $\gamma\delta$ T cells, leading to immune tolerance in several autoimmune disorders such as chronic inflammatory bowel disease, rheumatoid arthritis, maternal tolerance or tolerance against malignant tumors [23–25]. IDO was also crucial for survival of CGD mice challenged with *Aspergillus*, suggesting that IDO activity depends on superoxide production [26]. However, several experimental findings in humans did not support these animal studies. First, human CGD macrophages exposed to IFN- γ or LPS degraded tryptophan like healthy donor cells, suggesting that superoxide is not essential for IDO activity [27]. IFN- γ induced normal levels of ϵ -kynurenine in cultured monocytes, neutrophils and dendritic cells purified from CGD patients [28]. In addition, levels of ϵ -kynurenine and other tryptophan metabolites were normal to elevated in CGD patients. While the kynurenine pathway is well-studied in mammals, bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa* (commonly present in CGD patients) also use this pathway, which produces quinolone signaling molecules as virulence factors [29–31]. Recent studies show that IDO (KynA in bacteria) in *P. aeruginosa* is responsible for the production of kynurenines when in contact with phagocytes [32]. The production of kynurenines circumvents the innate immune response by scavenging released neutrophil superoxide, thereby promoting bacterial survival. Thus, KynA might be an interesting target to combat infections with *P. aeruginosa*. However, this observation suggests that ϵ -kynurenine restores the immune tolerance in immune cells, while favoring bacterial virulence by its ROS scavenging ability. The exact role of IDO in hyperinflammation and immune tolerance still remains an open question.

Hyperinflammation in CGD can also be linked to defective autophagy, the major intracellular degradation process [33,34]. TLR activation, which is sometimes compromised in CGD, connects phagocytosis to the autophagy pathway in macrophages [35]. Upon TLR or Fc γ receptor stimulation Nox2-mediated ROS production seems to play a role in regulating the activation and recruitment of the autophagy machinery to phagosomes [36]. However, uric acid crystal-induced NLRP3 inflammasome activation in CGD monocytes generated a 4-fold increase in IL-1 β secretion, indicating that IL-1 β production is not dependent on Nox2 activity [37]. Rather, ROS seem to dampen inflammasome activation, possibly explaining the granuloma formation and hyperinflammation occurring in CGD patients. The link between autophagy and inflammasome activation in CGD has recently been further clarified [38]. ROS deficiency in CGD phagocytes caused autophagy dysfunction, which contributed to increased production of proinflammatory IL-1 β . Two CGD patients treated with Anakinra[®], an IL-1 receptor blocker, showed rapid and sustained improvement in colitis and this drug restored defective autophagy in CGD mice and human CGD phagocytic cells. These results open up

the possibility of clinical trials in order to study the efficacy of IL-1 antagonists to ameliorate CGD granulomas or Crohn's-like disease (see Section 3, Inflammatory Bowel Disease).

2.3. Pathologies associated to CGD

Components of the phagocytic Nox2 complex are expressed in cells and tissues other than phagocytes, and thus inactivating mutations or deletions in these proteins (Nox2, p22^{phox}, p47^{phox} and p67^{phox}) have pathophysiological consequences unrelated to immunodeficiency syndromes. Consequences of polymorphisms in *CYBA*, *NCF1* or *NCF2* will not be discussed here in detail, but are to some extent featured later in the context of inflammatory bowel disease. Many pathological effects of Nox2 complex deficiency were demonstrated in *CYBB* or *NCF1* knockout mice, but we will mainly report results obtained in clinical studies involving CGD patients.

2.3.1. Nox2 deficiency and vascular diseases

The expression of several NADPH oxidases including Nox1, Nox2, Nox4 and Nox5 have been described in the vasculature, including the smooth muscle layer, the endothelium and the adventitia [39,40]. Superoxide is involved in the modulation of the arterial tone via rapid degradation of nitric oxide (NO), a well-known vasodilator. Data obtained in studies with Nox1 and Nox2 knockout mice suggest that these oxidases control vascular function via modulation of NO bioactivity [41,42]. In 2009, a multicenter study conducted with 25 X-CGD patients and 25 healthy subjects linked Nox2 deficiency with enhanced arterial dilatation [43]. Platelet Nox2 expression, urinary isoprostanes and oxLDL (both markers of oxidative stress) were reduced in X-CGD patients compared with healthy subjects. However, nitrite and nitrate levels were significantly higher in X-CGD patients and correlated with flow-mediated arterial dilatation (FMD). FMD also correlated inversely with platelet Nox2 expression and isoprostanes. This was the first time that a ROS-generating pathway controlled by Nox2 was connected to arterial tone modulation in humans.

More than 10 years ago, Krotz et al. demonstrated that NADPH oxidase dependent O₂ formation enhanced platelet aggregation and platelet-dependent thrombosis in vitro [44]. Afterwards Violi et al. reported that soluble sCD40 L- and P (sP)-selectin, two markers of in vivo platelet activation, were reduced in X-CGD patients. Platelet isoprostane was downregulated, while platelet NO generation was enhanced. In addition, platelet Nox2 expression was directly associated with plasma levels of sCD40L and sP-selectin according to correlation analysis. Thus, this study provides the first evidence that in vivo platelet activation might be directly associated with Nox2 activity. Platelet Nox2 appears to be a novel target for anti-thrombotic treatment [45].

2.3.2. Nox2 deficiency and brain diseases

Superoxide generation is required for hippocampal synaptic plasticity, especially long-term potentiation (LTP) and hippocampus-dependent memory [46]. Although the mitochondrial respiratory chain is considered the main ROS source in the brain, Nox2-deficient mice demonstrated impaired memory and synaptic deficit, pointing to a role of NADPH oxidase in these processes [47,48]. However, clinical studies in children with CGD were rather ambiguous. In the first study the cognitive function in a cohort of 23 CGD patients, most of them suffering from X-CGD, was assessed [49]. A 23% prevalence rate of cognitive deficits (IQ < 70) was found in this selected CGD population, which is higher than the 1–3% low IQ prevalence in the general population. However, it is not clear whether this decrease in cognitive function reflects the sequelae of recurrent infections or the defect in superoxide generation. The second study compared the average cognitive ability

of CGD patients with patients who had received a hematopoietic stem cell transplant to cure CGD [50]. Children with CGD (22 X-CGD), either treated conservatively with antimicrobial prophylaxis or curatively with hematopoietic stem cell transplantation, had normal IQ scores and cognitive ability was in the normal range. However, for both studies the low number of subjects impacted statistical significance. Furthermore, the applied WAS-I test may not be able to detect subtle cognitive deficits. These findings deserve further prospective studies with a larger cohort of X-CGD patients. In particular, it will be necessary to pay attention to the precise description of infections and their after effects, and to the adequate cognitive function test employed.

Expression of NADPH oxidase components was analyzed in brain tissues derived from human autopsies [51]. Particularly, Nox2 was overexpressed in microglia and infiltrating macrophages in patient tissues with initial multiple sclerosis lesions. This suggests that an inflammation-associated oxidative burst could play an important role in demyelination and tissue injury in multiple sclerosis and degenerative diseases. Indeed, the expression of Nox2 in microglia was inducible, and involved in motor neuron degeneration in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis [52,53]. However, it is not yet known if CGD patients with Nox2 deficiency are less prone to develop degenerative brain diseases than the general population.

2.3.3. *p47^{phox}* deficiency, diabetes, renal and cardiovascular diseases

A recent clinical study conducted with 229 CGD patients at the National Institute of Health revealed that diabetes, renal and cardiovascular diseases occur more often and with greater severity in *p47^{phox}*-deficient CGD patients than in Nox2-deficient CGD (or X-CGD) patients [54]. Six of 64 AR47⁰-CGD patients developed Type 1 diabetes (~10% of cases) in contrast to none of the 165 X-CGD patients. Among the six diabetes patients, two patients presented with severe cardiovascular (CV) disease (coronary artery disease, myocardial infarction, cerebral aneurysms), which could be a consequence of diabetes. One AR47⁰-CGD patient presented with pulmonary hypertension and mitral/aortic regurgitation without underlying diabetes. Despite comparable treatment with antifungal/nephrotoxic drugs AR47⁰-CGD patients developed chronic kidney disease more frequently than X-CGD patients. In general, the residual superoxide production is higher in AR47⁰

patients compared to those with X-CGD, which contributes to their improved survival [5,55]. However, the increased incidence of non-immune related disease may indicate distinct features of the AR47⁰-CGD phenotype, likely beyond the generation of superoxide alone.

2.4. Rare variants in X-CGD are useful to decipher Nox2 structure and function

2.4.1. Functional domains of Nox2

As the Nox2 crystal structure has not yet been resolved, homology modeling offers the best tool for understanding structure–function relationships. The N-terminal half of the protein appears to be embedded in the plasma membrane and is structured into six α -helices, two cytosolic loops (named B and D), and three external loops (A, C, and E), and contains two non-identical hemes coordinated by four histidine residues located in the third and fifth transmembrane helices. Nox2 is glycosylated on asparagine residues in the C and E loops (Fig. 2). The B and D intracytosolic loops are essential for oxidase assembly and electron transfer in Nox2 [56–58]. The D loop might also participate in folding and interaction with p22^{phox} (a 2 TM or 4 TM domain protein), as was recently shown for Nox4 [59]. The C-terminal half of Nox2 constitutes a cytosolic region required for catalysis and regulation of NADPH oxidase activity. The first three-dimensional homology model of the Nox2 C-terminal domain was based on sequence homology of this region with members of the FNR family [60]. This model provided an extremely useful structural image and indicated the presence of FAD and NADPH binding sites, thus the current terminology “dehydrogenase domain”. In 2000, a crystal structure of the NADPH binding domain of Nox2 was released in the Protein Data Bank (PDB 3A1F) by Sumimoto and colleagues. This unpublished structure confirmed homology of this domain with the FNR family.

One approach for deciphering structure–function relationships in Nox2 is studying naturally occurring CYBB mutations causing X⁺-CGD. In this case mutated Nox2 is expressed normally, but is not catalytically active in neutrophils. This feature can be used to obtain insights into the importance of certain regions, but due to the scarcity of patient material, model systems are usually employed for detailed studies. In the CYBB KO PLB-985 cell model

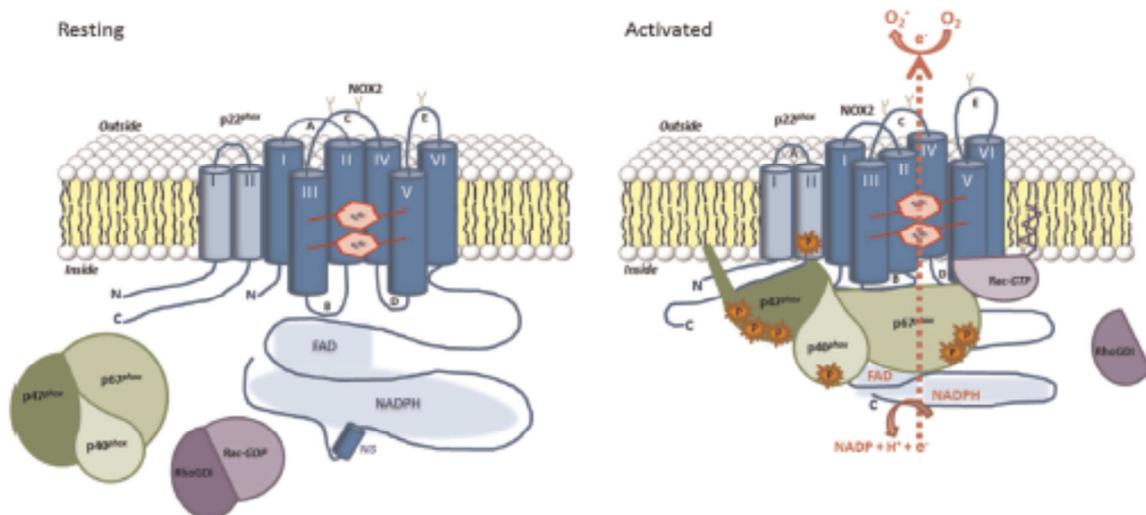


Fig. 2. Molecular mechanisms of NADPH oxidase complex activation. The NADPH oxidase complex of phagocytic cells is dissociated in resting phagocytes. Cytochrome b_{558} composed of Nox2 and p22^{phox} is localized in the plasma membrane and the cytosolic factors p47^{phox}, p67^{phox} and p40^{phox} form a complex in the cytoplasm. The small GTP-binding protein Rac associates with Rho-GDI in its inactive GDP form. Upon activation, signaling events cause phosphorylations and conformational changes of the NADPH oxidase subunits leading to their assembly. Activated Rac-GTP translocates, anchors in the membrane and binds to the NADPH oxidase complex. The fully assembled NADPH oxidase complex is able to trigger electron transfer from NADPH to FAD and hemes to reduce molecular oxygen into superoxide.

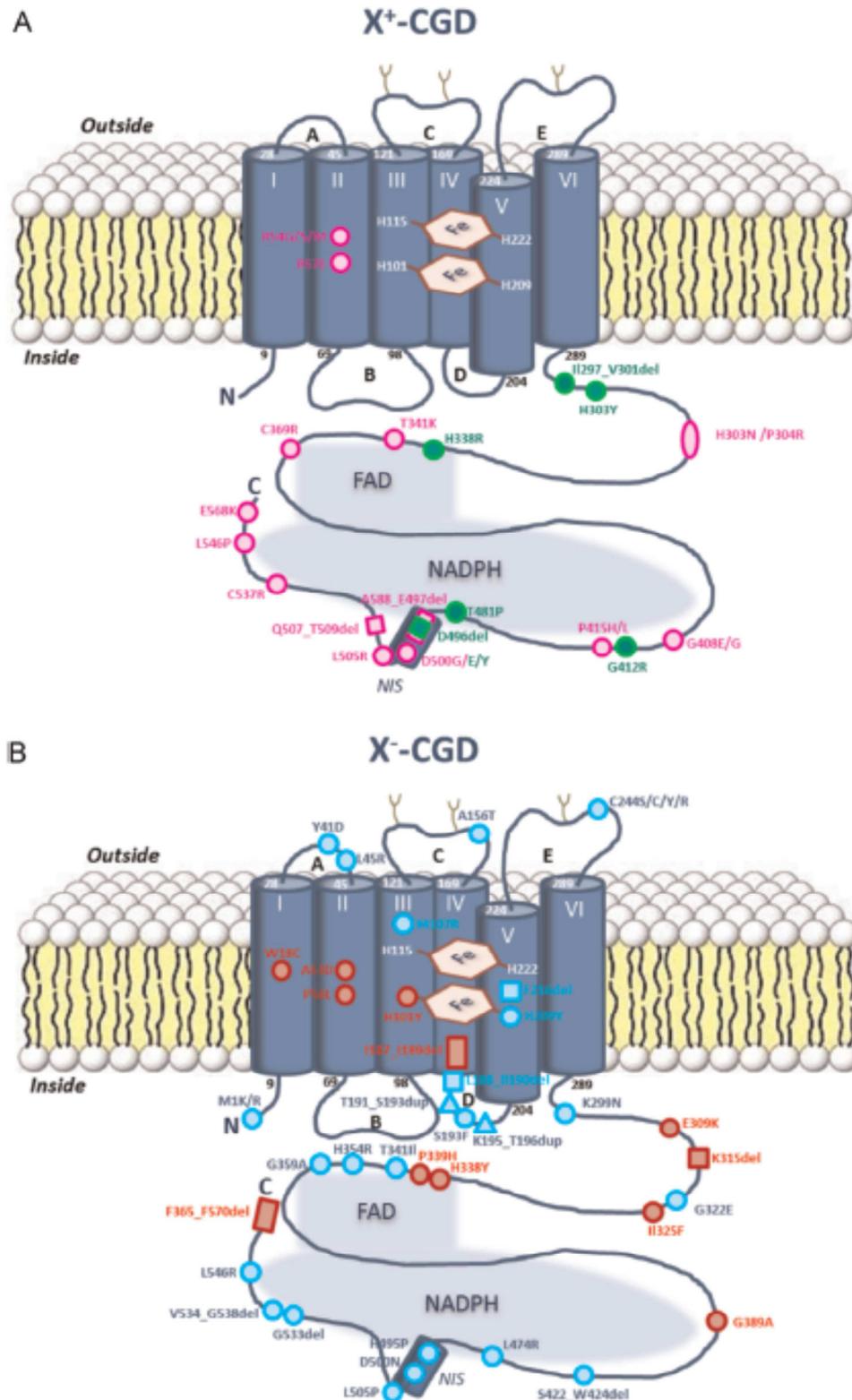


Fig. 3. Localization of X⁺- and X⁻-CGD mutations in Nox2. The N-terminal part of the Nox2 protein is embedded in the plasma membrane and is structured into six α -helices, two cytosolic loops (B, D), and three external loops (A, C, E), and contains two non-identical hemes coordinated by four histidine (H) residues located in the third and fifth transmembrane helices. Nox2 is glycosylated on asparagines in C and E loop (Y). In the cytosolic “dehydrogenase domain” of Nox2, the FAD/NADPH-binding domains are illustrated as gray clouds. Variants causing X⁺-CGD are preferentially located in the C-terminal part of Nox2 (A). Green and pink circles and squares correspond to X⁺-CGD missense variants [10]. Pink circles are variants studied in the PLB-985 cell model [57,62,63,65–67,247]. Blue and red circles, squares and triangles correspond to X⁻-CGD missense variants, deletions or duplications respectively [10]. Red circles are additional variants studied in the PLB-985 cell model [67,78]. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

NADPH oxidase activity can be restored by transferring wild type Nox2 cDNA, while introduction of mutant Nox2 cDNA will mimic the phenotype of the patient's neutrophils [61,62]. To date about 26 X⁺-CGD mutations have been reported [10]. Most of them are missense mutations or small deletions, and are primarily located in the C-terminal cytosolic tail of Nox2, confirming the importance of this region in catalytic activity, but not in structural stability. Eighteen X⁺-CGD mutations were reproduced in the PLB-985 cell line by mutagenesis, stable transfection and clonal selection for functional studies [57,63–67] (Fig. 3A).

Nox2 contains an insertion of twenty amino acids in the dehydrogenase domain, which is absent in FNR family members (designated NOX-NIS for NOX-NADPH-domain Insertion Sequence, amino acid residues 484–504 in Nox2). As this insertion appears to be ideally positioned at the start of the NADPH binding site, Taylor et al. proposed that the insertion, modeled as an α -helix, may control access of NADPH to the binding site [60] (Fig. 3A). This would explain the need for an activation step in Nox enzymes in contrast to FNR-type enzymes, which are constitutively active. Three X⁺-CGD mutations-L505R, Q507_T509del and D500G-within this region were reproduced in the PLB-985 cell model to decipher the role of the NOX2-NIS [57,65,66]. Asp500 was essential for proper assembly of the Nox2 complex to facilitate the electron transfer from NADPH to FAD upon oxidase activation. The kinetic parameters of purified Nox2 L505R demonstrated that Leu505 affects the p67^{phox}-dependent activation of the Nox2-p22^{phox} heterodimer, thus controlling access of NADPH to its binding site. The short Q507_T509del Nox2 deletion partially inhibited the assembly of the oxidase and electron transfer from NADPH to FAD (diaphorase or iononitrotetrazolium (INT) reductase) similar to the Nox2 L505R mutation. In addition, Nox2 was shown to be phosphorylated by protein kinase C in human neutrophils, thereby enhancing catalytic activity and assembly of the complex [68]. Recent results from our laboratory indicate that the insertion NOX-NIS is likely a dynamic switch for Nox2 activation by functionally linking to the Nox2 phosphorylation sites. This data highlights a new step in the Nox2 activation mechanism involving the NIS sequence [66].

Analyzing the X⁺-CGD mutations T341K, P415H, P415L and C537R in the PLB-985 cell model confirmed the location of the NADPH and FAD binding sites in the dehydrogenase domain of Nox2 [66] (Fig. 3A). Indeed, T341 is strictly conserved in Nox homologs and belongs to the putative FAD binding motif ³³⁸HPF³⁴¹. The Nox2 residues P415 and C537 are located in the ⁴¹⁰GIGVTP⁴¹⁵ and ⁵³⁵FLCGPE⁵⁴⁰ sequences respectively, which were proposed to be part of the active site pocket of the dehydrogenase domain with the first motif being the binding site of the NADPH isoalloxazine ring and the second motif forming the NADPH nicotinamide ring binding site. Indeed, the mutation of Thr341 to Lys inhibited the FAD incorporation into Nox2, whereas the Nox2 mutations P415H/L and C537R had no effect. All three mutations disturbed the diaphorase activity, but not the assembly of the NADPH oxidase complex. Thus, these mutations led to steric hindrance probably incompatible with the correct orientation of NADPH in respect to FAD within the active site. Another set of X⁺-CGD mutants, Nox2 C369R, G408E, G408R, and E568K, had common and global functional effects when expressed in the PLB-985 cell model. These mutants inhibited NADPH oxidase activity by affecting FAD incorporation and translocation of p47^{phox} and p67^{phox} to phagosomal membranes [66]. Nox2 Gly408 and Glu568 residues are probably located in sequences necessary to maintain the integrity of the FAD/NADPH binding domains. Due to its surface exposed location, Cys369 seems not to be critical for the overall structural integrity of Nox2, but it might be a docking site for cytosolic factors influencing modulation of the FAD environment during the oxidase activation process.

The second transmembrane passage of Nox2 is essential to maintain structural stability and electron transfer of the NADPH oxidase complex [67]. The preponderance of X-CGD mutations in a "hot spot" of five residues from Ala53 to Cys59, located in the putative second transmembrane α -helix, denotes the importance of this membrane region. Nox2 P56L and C59F mutations drastically reduced Nox2 expression, indicating that these residues are important for the structural stability of Nox2. The Nox2 A53D, R54G, R54M, and R54S mutations inhibited superoxide production, but did not affect spectral properties of the oxidized/reduced Nox2-p22^{phox} complex, oxidase complex assembly, FAD binding, or diaphorase activity, suggesting that amino acids 53 and 54 are essential for electron transfer from FAD. In addition, the second transmembrane passage (and especially the Nox2 A57E mutation) negatively influenced the function of the first intracytosolic B-loop in terms of regulating diaphorase activity of Nox2. Indeed, Jackson et al. demonstrated that the B-loops of Nox2 and Nox4 provide an interface between the dehydrogenase domains and the transmembrane domains of Nox enzymes [69].

2.4.2. Structural domains of Nox2

The synthesis of the membrane-bound oxidase heterodimer (cytochrome *b₅₅₈*) is a complex process, because it involves not only the presence of both subunits, Nox2 and p22^{phox}, but also several maturation steps, including heme incorporation, heterodimer formation and glycosylation of Nox2 [70–72]. The association of Nox1–4 with p22^{phox} seems to be a prerequisite for stabilization of the complex and localization of the heterodimer to specific membrane compartments [73,74]. The exact interaction surfaces and binding regions of Nox enzymes with p22^{phox} are not yet known, although several residues and motifs have clearly functional relevance [75–77]. For Nox2, deciphering the molecular mechanism of cytochrome *b₅₅₈* synthesis was aided by focusing on decisive regions in CYBB-CGD disease variants termed X minus (X⁻). X⁻-CGD mutants are characterized by a partial defect of cytochrome *b₅₅₈* synthesis associated with no or diminished oxidase activity. The genetic defects in CYBB found in these variants (~36 different mutations) are often missense mutations, small deletions or insertions localized in the coding region (Fig. 3B) [10]. The clinical severity of these CGD variants is variable and likely correlates with the residual oxidase activity found in X⁻-CGD neutrophils derived from these patients. Ten X⁻-CGD mutations were reproduced in the KO PLB-985 cells in order to study their impact on different steps of the cytochrome *b₅₅₈* synthesis process [78]. These mutations were chosen in mutational hot-spot regions such as the D-loop, a cytosolic region close to the last transmembrane passage, the FAD-binding site, the extreme N-terminal region of Nox2 and isolated residues including W18C and G389A (Fig. 3B). Many of these residues are highly conserved in Nox1–4, suggesting a common and important role, possibly the interaction with p22^{phox}. One group of mutations (Nox2 H338Y, P339H and F556-F570del) in the FAD-binding pocket of Nox2 led to loss of NADPH oxidase activity and was associated with variable levels of Nox2 expression, suggesting that the FAD domains are not only essential for electron transfer, but are also involved in the structural integrity of Nox2. Surprisingly, Nox2 H338Y and P339H mutants showed an abnormal accumulation of Nox2 in intracellular compartments, suggesting that these mutations disturbed Nox2 targeting or proper degradation. In another group of mutations (Nox2 W18C, E309K, K315del, I325F), decreased expression levels led to a proportional decrease in ROS generation. Thus, residues located in the first transmembrane passage, or in an intermediate region between the membrane domain and the dehydrogenase domain of Nox2, are involved in the structural stability and synthesis of cytochrome *b₅₅₈*. For the Nox2 W18C, E309K and I325F mutants, an intracellular accumulation of the 65 kDa

precursor of Nox2 was observed. Furthermore, a defect in dimer formation with p22^{phox}, and thus in the final maturation of cytochrome *b₅₅₈*, occurred. These results suggest that the first transmembrane passage and the intermediate region between the membrane and the cytosolic dehydrogenase domains of Nox2 are involved in association with p22^{phox}.

In conclusion, functional studies of human defects, as demonstrated here for selected X-CGD variants, can identify essential sequences required for structural stability and/or functionality of Nox2. This approach establishes an example that can be used for the study of various clinical cases at the molecular level, which in turn may aid in predicting clinical outcome or treatment options.

2.5. Refined analysis of recent NCF1 and NCF2 variants

2.5.1. NCF1 and NCF1 pseudogenes

In contrast to the considerable heterogeneity found in most CGD variants, a common variant has been identified in approximately 90% of affected NCF1 alleles analyzed worldwide [11]. This variant is a GT deletion (Δ GT) in a GTGT tandem repeat, corresponding to the first four bases of exon 2 in NCF1 [79]. However, a few other alterations are present in the NCF1 gene [80]. AR47⁰-CGD presents as a mild clinical form with higher cumulative survival and is usually diagnosed later than X-CGD or AR22⁰-CGD [5,55]. Phagocytic AR47⁰-CGD cells exhibit higher residual ROS generation underscoring the point that p47^{phox} contributes to NADPH oxidase activity as an adapter, facilitating assembly of the oxidase, but is not as essential as properly formed cytochrome *b₅₅₈*. Supporting this notion is the fact that the extremely rare AR67⁰-CGD is associated with severe disease, as NCF2 (p67^{phox}) is essential for optimal functioning of the Nox2 oxidase [81,82].

The NCF1 Δ GT mutation predominates as most normal individuals (>95%) have two NCF1 pseudogenes (ϕ NCF1) on each allele. Both pseudogenes, located close to NCF1 at 7q11.23, exhibit the Δ GT deletion with more than 99% identity with the NCF1 gene. These ϕ NCF1 are the best-conserved, unprocessed pseudogenes known [83]. The predominance of the Δ GT mutation arises from recombination events between NCF1 and the highly homologous pseudogenes ϕ NCF1 [84,85]. At least three different cross-over points exist within the NCF1 gene cluster, indicating that autosomal AR47⁰-CGD is genetically heterogeneous [86]. The biological relevance of the presence of ϕ NCF1 is not yet clear. The ratio of NCF1/ ϕ NCF1 varies in different human tissues and in human populations [87]. An increased copy number of NCF1 was linked to protection for developing rheumatoid arthritis [88]. Extremely rare cases of CGD can be associated with Williams-Beuren syndrome (WBS) [89,90]. This neurodevelopmental disorder with multi-systemic manifestations is caused by a heterozygous segmental deletion at chromosomal band 7q11.23. This deletion can include the NCF1 gene and if an NCF1 mutation occurs simultaneously on the other allele by inheritance, the patient will present with both diseases. It has been postulated that WBS patients with two functional NCF1 genes were more susceptible to hypertension than WBS patients with only one functional NCF1 gene [91]. However, one of the two patients suffered from hypertension, indicating that factors other than vascular NADPH oxidase activity are likely involved in the development of hypertension [92]. A possible explanation is inclusion of the *ELN* locus in the classical WBS deletion, which codes for elastin, a protein essential for elasticity of the vasculature.

2.5.2. NCF2 gene

Most of the time gene variants lead to the absence of the mutated protein due to instability of the mRNA or synthesis of an unfolded and/or truncated protein. Very rare variants can abolish or reduce NADPH oxidase activity, but lead to normal (superscript

+) or diminished (superscript -) expression of oxidase components in phagocytes [10,93]. Recently, an A67⁻-CGD patient with extremely late diagnosis of CGD was described. CGD was diagnosed in two brothers in their 50s, who harbored a splice variant in NCF2, generating several splice products of exons 11 and 12 [94]. Even though exons 11 and 12 of NCF2 seem to be necessary for optimal oxidase activity, the encoded p67^{phox} protein remained partially expressed and had functional properties. The deletion of exons 11 and 12 does not affect any known functional domains, but is responsible for shortening the distance between the first SH3 domain (a putative Nox2 interaction domain) and the PB1 domain, a binding motif for p40^{phox}.

One case of hypomorphic mutation in the activation domain of p67^{phox} (12 amino acids, 199–210) was found in three CGD patients from two distinct families with mild clinical profiles [95]. The A202V change in p67^{phox} led to a slight decrease of p67^{phox} expression in neutrophils of CGD patients. Surprisingly, NADPH oxidase activity and translocation of p67^{phox} to the phagosomal membrane varied depending on the stimulus. Upon PMA stimulation, but not with opsonized zymosan, ROS generation and p67^{phox} translocation were reduced. This suggests that the conformation of the activation domain of p67^{phox} is involved directly or indirectly in the binding to Nox2, thus affecting NADPH oxidase activity. The discrepancy between both stimuli might be linked to differential phosphorylation events of the activation domain of p67^{phox} in response to each stimulus, but this remains to be resolved experimentally.

2.6. Induced pluripotent stem cells – potent cellular models for pathophysiological studies and therapeutic development

At the moment, the only cellular model mimicking CGD phagocytes is the KO PLB-985 cell line [62]. These cells can be differentiated into neutrophil-like cells, reproducing the X-CGD phenotype, and are very useful for structure-function relationship studies as described above. However, differentiated PLB-985 cells are still an imperfect model as they are lacking certain important neutrophil features. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) represent a revolution in the field of stem cell research, permitting the establishment of cellular models of pathologies. A cocktail of four transcription factors is able to reprogram murine and human somatic cells to a pluripotent state similar to embryonic stem cells (ESCs) [96,97]. iPSCs can be differentiated into many cell types, their use is not hampered by ethical issues, and they are useful cell models for physiological studies, toxicity screening and cell therapy among others. Most importantly, iPSCs derived from somatic cells of patients, can be differentiated to produce cellular models of the disease that are very useful for drug development, and in the future for regenerative medicine after correction of the genetic defect [98,99].

Since 2011, four teams have modeled several genetic forms of CGD from iPSCs (Table 1). The first CGD cellular model was obtained from mouse fibroblasts isolated from X-CGD mice and reprogrammed into X-CGD iPSCs [100]. The hematopoietic differentiation involved the formation of embryoid bodies (EBs), culture on collagen IV to isolate FLK1⁺ cells, followed by co-culture on OP9 stromal cells in the presence of hematopoietic cytokines. Finally, X-CGD neutrophils obtained as CFU-G (colony forming unit-granulocytes) colonies in 24–31 days with a purity of around 71% were unable to produce ROS after PMA stimulation. Gene correction of the EBs with self-inactivating (SIN) lentiviral vectors encoding a codon-optimized gp91^{phox} transgene successfully led to the generation of CFU-G containing neutrophils with restored NADPH oxidase activity [101]. This group demonstrated for the first time that X-CGD iPSC-derived neutrophils were a suitable tool to test new gene therapy approaches. Of importance, no difference

Table 1
List of reported murine and human CGD iPSCs.

	Type	Cell model	Genetic form	Modeled variant	Ref
Mukherjee et al.	Mouse	Neutrophils	X-CGD	CYBB knockout	[100]
Zou et al.	Human	Neutrophils	X ⁰ -CGD	CYBB: nonsense mutation; 458T > G in exon 5	[102]
Jiang et al.	Human	Macrophages	X ⁻ -CGD	CYBB: point mutation in intron 1 (-11T > G)	[106]
			X ⁰ -CGD	CYBB: large deletion including exon 1–3	
			AR47 ⁰ -CGD	NCF1: GT deletion in exon 2	
Brault et al.	Human	Neutrophils and macrophages	X ⁰ -CGD	CYBB: nonsense mutation 469C > T in exon 5	[107]
			AR22 ⁰ -CGD	CYBA: deletion c.295_301delGTGCCCG in exon 5	
			AR47 ⁰ -CGD	NCF1: GT deletion in exon 2	

in the differentiation process between control and X-CGD iPSC cells in the process of generating neutrophils was observed, suggesting that Nox2-derived ROS generation is not required. In the same year, a human model of X-CGD neutrophils was published [102,103]. The iPSCs were generated from mesenchymal stem cells isolated from an X-CGD patient and differentiation into neutrophils was obtained using a protocol developed for ESCs involving EB formation and OP9 co-culture [104]. Although purity was lower (30–40%) and the timing longer (34 days) than in the previous work, neutrophils from X-CGD iPSCs were characterized for morphology, surface markers, phagocytosis and ROS production, confirming the successful generation of mature neutrophils mimicking the CGD neutrophils of the patient. Correction of the CGD phenotype was accomplished by genome editing using a zinc finger nuclease (ZFN) approach developed in 2009 with iPSCs [102,105]. Contrary to Mukherjee et al. who transduced EBs, iPSCs were directly transduced with ZFN, followed by selection of transduced iPSC clones with one single allele AAVS1 locus insertion. This resulted in restored NADPH oxidase activity and a high level of Nox2 expression. In 2012, Jiang et al. produced the first X-CGD and AR47 human macrophages [106]. They used a co-culture-free protocol involving EBs formation and culture in suspension with hematopoietic cytokines. Monocytes emerged in the supernatant, which upon differentiation into mature macrophages were able to phagocytose zymosan particles and to secrete cytokines in response to stimulation. Thus, X-CGD and AR47⁰-CGD macrophages could be modeled from iPSCs.

Recently, our group optimized protocols to differentiate iPSCs from X⁰-, AR47⁰- and AR22⁰-CGD patients' fibroblasts into neutrophils and macrophages [107]. Unlike other protocols described for CGD modeling, iPSCs were directly differentiated using adapted

and optimized protocols from Choi et al. for the production of neutrophils and macrophages separately [108,109]. The average production of CD34⁺ progenitors was 1.5×10^6 cells after 10 days of differentiation of 10×10^6 iPSCs. Extensive characterization of CGD iPSC-derived neutrophils confirmed the presence of primary, secondary and tertiary granules in the cytoplasm (Fig. 4A, B). Cells were terminally differentiated into about 3×10^5 neutrophils or 3×10^7 macrophages in 25–28 days. CGD neutrophils and macrophages exhibited an oxidase-negative phenotype characterized by the absence of NADPH oxidase activity related to the absence of Nox2 and p22^{phox} expression in X⁰-CGD and AR22⁰-CGD cells (Fig. 4C). CGD iPSC-derived macrophages were able to phagocytose opsonized *S. aureus* or zymosan particles and produced pro- and anti-inflammatory cytokines after stimulation. iPSC-derived macrophages expressed classical CD14, CD45, and CD11b antigen surface markers and were HLA-DR⁻, CCR7⁻, and MR⁺, specific to the M2c subtype of macrophages, which are regulatory macrophages involved in immunosuppression and wound healing/tissue repair [107].

Faithful cellular models of the three genetic forms of CGD (X⁰, AR22⁰ and AR47⁰) are now available for the development of new therapies for CGD, although an iPSC model for p67^{phox}-deficient neutrophils and macrophages is still lacking. Today, scientific efforts are focusing on gene therapy to correct CGD using iPSCs or EBs. This will represent a source of "healthy" autologous cells for one-time treatment. However, safe iPSC reprogramming methods including xeno-free, feeder-free cell cultures, and flawlessly mastered gene therapy will be necessary to correct iPSCs derived from CGD patients before transplantation. "Safe made" autologous iPSCs are used already to treat age-related macular degeneration with iPSC-derived retinal pigment epithelium cells at the RIKEN Center

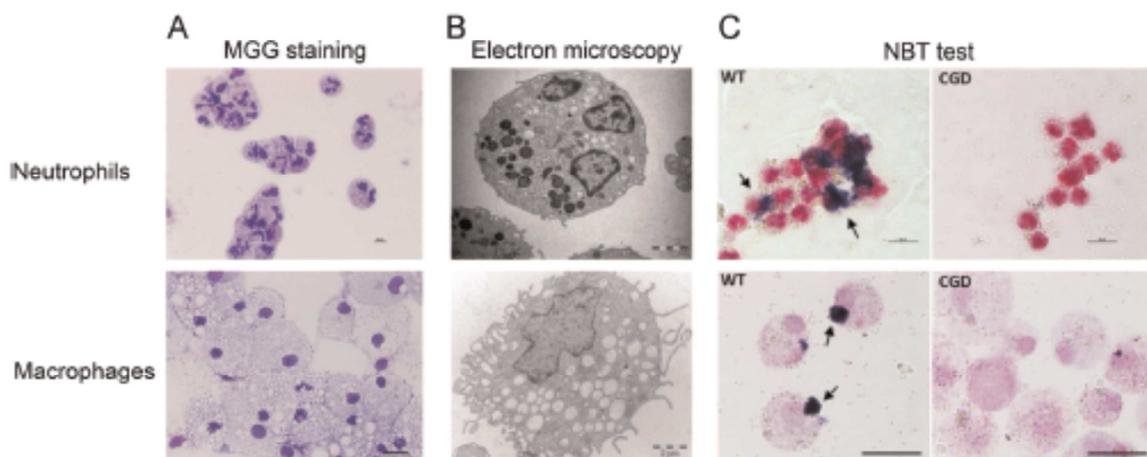


Fig. 4. Phenotypic and functional characterization of neutrophils and macrophages derived from WT and CGD iPSCs. (A) MGG staining showing the characteristic morphology of neutrophils (upper panel, scale bar 10 μ m) and macrophages (lower panel, scale bar 20 μ m). (B) Electron microscopy shows the presence of cytoplasmic granules in neutrophils and vacuoles in macrophages (scale bar 2 μ m). (C) NBT reduction assay on opsonized latex bead-activated WT or CGD iPSC-derived neutrophils (upper panel, scale bar 10 μ m) and macrophages (lower panel, scale bar 20 μ m). ROS-mediated NBT reduction is shown as blue for mazaan precipitates in WT neutrophils and macrophages (black arrows). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

for Developmental Biology in Kobe, Japan. This is the first human clinical trial for evaluating the efficiency of this approach.

3. Inflammatory bowel disease - reduced ROS as risk factor

Inflammatory bowel disease (IBD) is the common term for a group of chronic or recurring inflammatory conditions of the gut [110,111]. The main IBD disorders are Crohn's disease (CD), characterized by inflammatory patches and deep ulcers all along the digestive tract, and ulcerative colitis (UC), which affects the mucosal lining of the entire colon. The symptoms can be very similar, ranging from abdominal pain, diarrhea, and intestinal bleeding to weight loss, colon cancer and extra-intestinal manifestations. IBD is emerging as a global disease as incidence and prevalence are increasing with time, and the gap of affected populations in terms of economic, ethnic and racial differences is shrinking (www.cdc.gov). The annual incidence and overall prevalence is highest in Europe and North America [112], and in particular the incidence of pediatric IBD is rapidly increasing [113,114]. Very early onset (VEO) IBD, classified as disease in children < 6 years of age according to the modified Paris classification [115], presents predominantly as pancolitis and occasionally perianal disease, with patients responding poorly to conventional anti-inflammatory and immunomodulatory therapy, resulting in increased morbidity and mortality [116]. VEOIBD patients often have an underlying rare genetic disorder causing primary immunodeficiency that cannot be detected in genome-wide association studies. Exome-targeted, candidate gene or whole-genome sequencing has identified several rare gain-of-function and loss-of-function variants in VEOIBD [116]. Considering the link between the intestinal immune response and the microbiota, IBD-associated shifts in the microbiome and virome, and the emergence of pro-inflammatory pathogens in IBD [117,118], it is not surprising that dysfunction of NADPH oxidases is now a recognized risk factor for IBD.

3.1. Genetic susceptibility to IBD-CGD and beyond

The 35–40% prevalence of IBD with CD-like features in CGD patients places impairment of the Nox2 complex prominently as a risk factor for intestinal disease. Histologically this disease can be distinguished from CD by the presence of multiple granulomas in the lamina propria and large pigment-laden histiocytes [119–121]. The susceptibility for developing CGD-CD is associated with inactivating *CYBB* variants rather than with *NCF1* variants or with the remaining ROS output in stimulated neutrophils [55,119]. What exactly determines the manifestation of gastrointestinal disease in

CGD patients at some point in their lives is still unresolved. It is likely due to particular genetic *CYBB* variants in combination with other susceptibility loci and the presence of hereditary and environmental factors.

In contrast to the often polygenic nature of adult IBD, VEOIBD is considered a monogenic defect [116]. Several functionally altered variants in Nox2 complex components have been identified in VEOIBD [122–124]. Most of the variants are characterized by heterozygous single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the coding sequence, occur in autosomal recessive genes coding for cytosolic Nox2 complex components and do not lead to severe immunodeficiency, indicating that the remaining ROS generation is above the threshold required for full onset of CGD [55]. While certain variants were only present in a single patient, some SNPs in *NCF1* and *NCF2* seemed common (up to 10%) in the analyzed VEOIBD cohort. Although only a single *CYBB* variant (rs141756032; NOX2 p.G364R) was identified [124], this missense mutation will likely cause a significant reduction in ROS production in male carriers due to its location directly adjacent to the second FAD binding site. Functional data of this variant are not available and this *CYBB* variant has not been associated with CGD (<http://structure.bmc.lu.se/idbase/CYBBbase>). An identified SNP in the *CYBA* promoter (rs72550704) is part of the Sp1 transcription factor consensus sequence [2], thus interfering with Sp1 binding and leading to a 20% reduction in p22^{phox} expression.

The majority of recently identified NADPH oxidase-related variants occur in genes involved in Nox2 assembly and electron transfer (Fig. 5). A previously characterized *NCF1* SNP (rs13447; p47^{phox} R90H) [88] identified in 12/122 VEOIBD patients, is located in the phospholipid (PX) binding domain, leading to reduced ROS generation presumably due to altered membrane association. Five missense *NCF2* mutations with varying prevalence were identified in a Canadian VEOIBD cohort [124]. These mutations are located either in the first tetratricopeptide repeat (T1) motif (rs147415774, p67^{phox} R38Q), in the Phox and Bem1 (PB1) domain (rs17849502, p67^{phox} H389Q, rs35012521, p67^{phox} N419I), in the C-terminal SH3 binding domain (p67^{phox} G501R) or in exon 15. These domains are required for protein interactions, namely for Rac-GTP binding (T1–4), for Vav1 guanine nucleotide exchange factor (GEF) and p40^{phox} binding, and for p47^{phox} binding, respectively [125]. Protein associations are required for retaining the p47^{phox}-p67^{phox}-p40^{phox} complex in the cytosol in the dormant oxidase, and for reassembly of these components in their phosphorylated form with membrane-bound Nox2-p22^{phox} and the GEF-Rac-GTP module when oxidase activation takes place. Functional analysis of *NCF2* variants revealed decreased protein-protein associations when binding partners were immunoprecipitated after their overexpression in

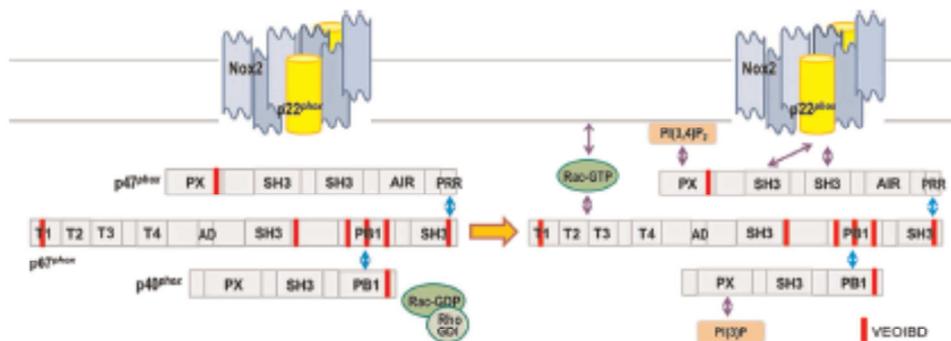


Fig. 5. Missense mutations in cytosolic Nox2 complex components associated with VEOIBD without leading to CGD. NADPH oxidase activation triggers multiple phosphorylations and structural rearrangements, exposing domains masked by intramolecular interactions and permitting novel interactions required for assembly of the oxidase complex. Constitutive interactions are indicated by blue arrows, stimulus-induced interactions by purple arrows. Location of variants indicated in red. For domain explanation see text except: AIR (autoinhibitory region) PRR (proline-rich region), AD (activation domain). Adapted from [125]. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

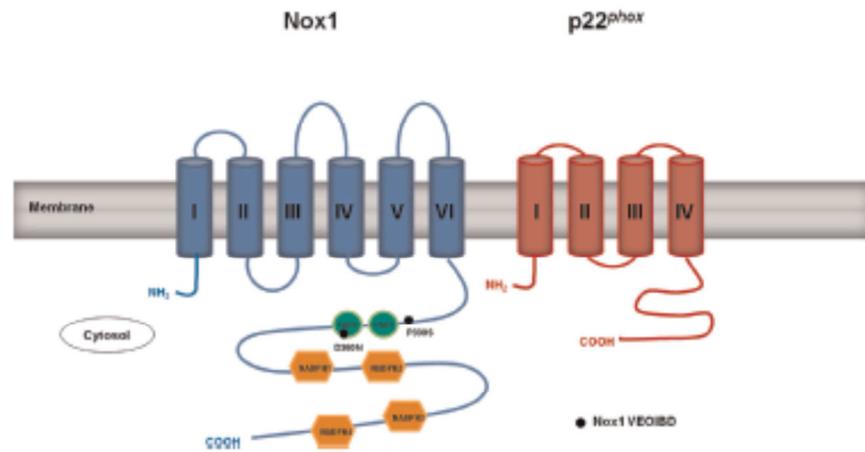


Fig. 6. *NOX1* variants identified as VEOIBD risk factor. Two functionally altered *NOX1* variants were recently identified in VEOIBD patients, one located upstream of the first FAD binding domain, while the other is located within the second FAD domain (indicated by black dots). *p22^{phox}* is represented as a 4 transmembrane (TM) domain protein, although models with 2 or 3 TM exist.

model cell lines. It would be important to determine the influence of *p67^{phox}* sequence changes on Nox2 catalytic activity in a fully reconstituted system and in the presence of an appropriate receptor-mediated stimulus. Furthermore, one VEOIBD patient was identified with a *NCF4* variant (rs141160114, *p40^{phox}* R308Q), which negatively influenced *p40^{phox}* PB1 binding to *p67^{phox}*. A common SNP in *NCF4* (rs4821544, intron 1) has been previously associated with ileal adult CD in genome-wide association studies (GWAS) [126,127]. Neutrophils isolated from CD patients carrying this *NCF4* risk allele produced less superoxide when primed with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) prior to stimulation with the chemoattractant fMLF [128]. This defect suggests that the *NCF4* SNP alters regulation of Erk1/2-mediated *p47^{phox}* phosphorylation [129]. *NCF4* as a CD susceptibility gene could not be replicated in two other large scale studies [130,131]. Albeit the number of identified variants in VEOIBD associated with the Nox2 complex is still limited, a trend towards affecting mainly cytosolic components combined with reduced, but not substantial loss of ROS production is noticeable.

Several NADPH oxidases (Nox1–3) require Rac activity for ROS generation, and thus variants in *RAC1* (rs35761891, rs10951982) or *RAC2* (rs739041, rs1476002) will likely influence oxidase function [122,124]. The observed changes in expression, i.e. upregulated Rac1 versus downregulated Rac2, may reflect involvement of Rac1 in oxidase regulation of cell types other than neutrophils, although alteration of Rac expression will affect many other signaling outputs, cytoskeletal rearrangements and mucosal barrier maintenance. Interestingly, several SNPs in *NOS2* (inducible nitric oxide synthetase, iNOS) were identified in VEOIBD cohorts [132]. The most prominent *NOS2* SNP (rs2297518, iNOS S608L) showed increased nitric oxide production in transfected cells. This is important in the context of NADPH oxidase function as nitrosylation of oxidase components inhibits Nox2-dependent ROS generation ([133], Hayes and Knaus, unpublished observations), once more reinforcing the link between genetic susceptibility to VEOIBD and decreased NADPH oxidase activity.

3.2. Mucosal NADPH oxidases as novel IBD susceptibility genes – *NOX1* and *DUOX2*

Intestinal epithelial cells (IECs) are on the forefront of maintaining barrier function and mucosal homeostasis, and genetic alterations compromising their response to the gut environment can be considered the gateway for inflammatory processes. IECs express the NADPH oxidases Nox1 and Duox2, with the Duox2/DuoxA2 complex being highly responsive to microbial-induced

upregulation. Expression of both Duox2 and DuoxA2 is upregulated by viral and bacterial infections and during inflammatory gut disease [118,134–136]. Grasberger and colleagues [137] used L-thyroxine supplemented *duoxa^{-/-}* mice infected with *Helicobacter felis* to characterize the role of Duox2 in stomach infections. Mucosal colonization with *H. felis* was increased in *duoxa^{-/-}* mice. This increased bacterial load resulted in enhanced shedding of bacterial antigens and virulence factors, leading to severe gastritis in *duoxa^{-/-}* mice. These results suggest that the release of H₂O₂ by Duox2 at the apical surface of the gastric epithelium controls growth of *H. felis* in its niche, the overlying mucus layer [137].

In general, ROS generation by Nox1 can be considered the earliest engagement of an NADPH oxidase in the GI tract, followed by Duox2 upregulation and Nox2 activation in recruited neutrophils. If rare variants in ROS-generating enzymes associate with IBD development, one needs to consider *NOX1* and *DUOX2* as potential susceptibility genes. Indeed, we recently identified the first functionally altered *NOX1* and *DUOX2* variants in VEOIBD patients [138]. Two variants of X-linked *NOX1* were identified in VEOIBD patients (Fig. 6). A patient with severe pancolitis harbored *NOX1* p. P330S, a missense variant located directly upstream of the first FAD binding domain, which reduced ROS generation by 50–60%, likely by decreasing binding affinity for FAD. The second variant, *NOX1* p.D360N (rs34688635), was discovered in two patients, both presenting with severe pancolitis. This sequence change occurred directly in the second FAD binding domain, leading to a 60–80% decrease in ROS production in a model cell line and in vivo reconstituted crypts of Nox1 knockout mice. The localization of both Nox1 variants was not altered, but as suggested by our previous work [139], antimicrobial host defense was severely impaired. The same study linked two *DUOX2* variants to VEOIBD. *DUOX2* p.R1211C, a missense variant in the third intracellular loop (Nox D-loop) was present in one patient with recurrent pancolitis, perforation and colectomy. Reconstitution of the Duox2 R1211C-DuoxA2 complex in cells revealed intact localization patterns, but reduced H₂O₂ generation. Another patient with pancolitis harbored *DUOX2* p.R1492C (rs374410986), an arginine to cysteine change in the highly conserved GRP sequence in the third NADPH binding domain. Despite proper localization and stimulus-dependent translocation, this variant showed a 5-fold decrease in H₂O₂ release and consequently a 50% increase in bacterial invasion. This study links for the first time *NOX1* variants to human disease, and identifies the NADPH oxidases Nox1 and Duox2 as risk factors for IBD. Even though these variants are rare, the importance of Nox1 and Duox2 in mucosal host defense will likely reveal additional

NOX1 and *DUOX2* variants in the future, or even variants in genes required for assembly of functional oxidase complexes (*CYBA*, *NOXA1*, *NOXO1*, *DUOXA2*).

3.3. Challenges in NADPH oxidase IBD research – from man to mice. Understanding how NADPH oxidases contribute to the development of IBD is hampered by the scarcity of animal models reflecting human gut disease and the often weak correlation between phenotypes of genetically modified mice and IBD patients. The polygenic nature of the disease, the contribution of the microbial gut community of the host to development of pathogenesis, and diet/environment-related influences are likely responsible and need to be methodically altered to obtain better suited models. While mice deficient in *cybb* (*Nox2*) and *ncf1* (*p47^{phox}*) recapitulate many hallmarks of human CGD, they never develop CGD-CD. These mice were reported as either protected or more susceptible to dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis [140–142], while showing increased weight loss and injury in acute 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-mediated necrosis of the distal colon [38,143]. Deficiency in *ncf4* (*p40^{phox}*), an integral component of the *Nox2* complex, was associated with exacerbated DSS colitis, which does not reflect the *Nox2* knockout phenotype in the same model [140,144]. Similarly, the susceptibility to VEOIBD in male patients harboring the two inactivating X-linked *NOX1* variants, which exhibited a 60–80% reduction of ROS generation in transduced crypts [138], seems not to be reflected in DSS or TNBS colitis models, where a protective phenotype for *Nox1* deficiency was observed [145,146]. Only when combining *Nox1* knockout with IL-10 deficiency in mice, a permanent colitis phenotype could be obtained [146]. For *Duox2* conflicting data indicate higher susceptibility of patients with functionally inactivating *DUOX2* variants for VEOIBD [138], while analysis of the general population of IBD patients indicated substantial upregulation of *DUOX2* [118,147,148]. While *Duox2*-deficiency early in life predisposes to VEOIBD, presumably due to compromised mucosal host defense, the upregulation in adult IBD may correlate with the involvement of *Duox2* in repair mechanisms or oxidative stress. This paradox and other inconsistencies will need to be addressed with detailed studies in mice by varying the genetic background and environmental impact, and by introducing other susceptibility genes. The rather intimate connections between NADPH oxidase genes and prominent IBD susceptibility genes regulating immune recognition or autophagy are well documented and supported by patient data and cell-based assays, suggesting that modulation of the redox balance is indeed an important determinant in inflammatory intestinal disease, albeit predominantly not involving exacerbation of inflammation by oxidative stress, but by a decline in ROS production.

3.4. NADPH oxidase variants as risk factor for other diseases. Loss of or diminished *Nox2* NADPH oxidase function is not only connected to the disorders presented here. A predisposition of CGD patients for developing mycobacterial infections has been recognized for some time [149–151], but recently, susceptibility to this disease in otherwise healthy subjects has been reported [152]. Two *CYBB* variants (*Nox2* T178P, *Nox2* Q231P) were linked to impaired macrophage NADPH oxidase function and mycobacterial disease, while ROS generation in neutrophils and monocytes was not affected. This observation reflects not only the critical role of ROS in the macrophage-mounted defense against *Mycobacterium tuberculosis*, but also how the context of a particular cell type can shape the (non-)functionality of gene variants. Furthermore, some *CYBA* variants in the promoter region (e.g. A-675T, A-930G) have been associated with hypertension in population-based or animal studies [13,153], although increased oxidative stress by *p22^{phox}* overexpression has not been functionally characterized or

attributed to a particular *Nox* family member.

The development of rheumatoid arthritis has been linked to a lower copy number of *NCF1* [88]. This association has been replicated in *p47^{phox}* mutant rodents [154–156] and has culminated in the successful use of oxidative burst stimulants for arthritis therapy [157]. A strong association of several *NCF2* SNPs with systemic lupus erythematosus (SLE) susceptibility was reported [158–160]. One of these variants (*rs17849502*, *p67^{phox}* H389Q) also conferred susceptibility to VEOIBD, as discussed earlier [123,158]. Similar to *p67^{phox}* H389Q, some of the other lupus-associated *NCF2* variants (*rs13306575*, *p67^{phox}* R395W; *rs35937854*, *p67^{phox}* A297V) are located in protein–protein interaction domains and may weaken association of oxidase components [125,159]. Functional consequences of these *p67^{phox}* mutations have not been verified in model cell systems or in blood-derived cell types. A protective role for functional *Nox2* in SLE was strengthened when *cybb*-deficient mice crossed with lupus-prone mice displayed exacerbated disease [161].

4. Hypothyroidism – spotlight on *DUOX2/DUOXA2*

Congenital hypothyroidism (CH), caused by thyroid hormone deficiency present at birth, is the most common congenital endocrine disorder. CH occurs in approximately 1/3000–4000 births [162] and can lead to delayed growth and neurodevelopmental disorders if untreated. With the ease and relative low cost of screening, most cases of congenital hypothyroidism are caught early and treated accordingly. The majority of CH cases result from defects in the development of the thyroid gland [163] with only 15–20% of cases being caused by thyroid dysmorphogenesis. The production of H_2O_2 by the NADPH oxidase *Duox2* at the apical membrane of thyroid follicular cells is crucial for the organification of iodide, the rate-limiting step in thyroid hormone synthesis, which is catalyzed by thyroid peroxidase (TPO) [164]. Iodide is transported from the extracellular space to the follicular lumen in two stages: active transport across the basolateral plasma membrane and passive transport across the apical plasma membrane. Iodide is easily absorbed from the blood by thyrocytes, which contain a Na^+/I^- symporter on their plasma membrane that acts as an iodine trap and transports iodide into the cell. Once iodide is inside the cell, it is transported with thyroglobulin into the follicular lumen and oxidized at the apical membrane by *Duox2*-TPO. Pendrin, encoded by the *PDS* gene, was initially proposed as the potential iodide transporter responsible for transporting iodide across the apical plasma membrane [165,166]. However, a recent study by Twyffels et al. suggested that Anoctamin-1, and not pendrin, is responsible for the export of iodide into the follicular lumen [167].

Many loss-of-function variants have been identified in several of the genes implicated in thyroid dysmorphogenesis – thyroglobulin (*TG*) [168,169], thyroperoxidase (*TPO*) [170–172], the sodium-iodide symporter/NIS (*SLC5A5*) [173–175], pendrin (*SLC26A4*) [176,177], iodotyrosine deiodinase (*IYD*) [178,179], *DUOX2* [180–196] and *DUOXA2* [197–200]. All of these genes possess clearly characterized roles in the thyroid hormone synthesis pathway [201] with hypothyroidism due to mutations in the *Duox2/DuoxA2* heterodimer being the most common form of thyroid dysmorphogenesis with an estimated prevalence of 1/44000 [189]. The importance of *Duox2* in thyroid hormone synthesis grows ever more apparent with the identification of new *DUOX2/DUOXA2* variants and their link to congenital hypothyroidism (CH), most of which rather display a partial iodide organification defect (PIOD) than a total iodide organification defect (TIOD).

4.1. Duox biochemistry and regulation

The NADPH oxidases Duox1 and Duox2 were originally identified in thyroid tissue resulting in their initial characterization as the thyroid oxidases, ThOX1 and ThOX2 [164,202]. However, expression of Duox1 and Duox2 proteins is not restricted to the thyroid. Since their initial identification, they have also been found on the mucosal surfaces of the trachea and bronchi [203], in airway epithelial cells [204,205] and in the colon [206]. Furthermore, recent studies reported that differential upregulation of Duox1 vs Duox2 occurs in selected tissue types or tumors [207,208]. The human Duox1 and Duox2 proteins are 1551 and 1548 amino acids in length, respectively, and share 83% sequence homology. In the thyroid, TPO oxidizes iodide in the presence of H₂O₂ generated by Duox2. Co-immunoprecipitation experiments revealed that Duox and TPO are located in close proximity on the plasma membrane, and that their association is upregulated by the protein kinase C (PKC) pathway and downregulated by protein kinase A (PKA) [209]. Duox activity seems to be regulated by the local H₂O₂ levels, stimulating Duox activity at low concentrations [210], while inhibiting it at high concentrations [211]. Low intracellular levels of H₂O₂ may support physiological functions such as signal transduction, but an excess may result in mutagenesis, carcinogenesis or apoptosis [212].

The original term dual oxidases for Duox enzymes transpired from an additional N-terminal domain that is homologous to peroxidases including myeloperoxidase (MPO), thyroid peroxidase (TPO) and lactoperoxidase (LPO) in addition to a Nox2 homology domain at the C-terminus [213]. The N-terminal domain shares approximately 20% sequence homology with MPO and as such has been labeled a peroxidase (PO)-like domain. Linking this extracellular PO-like domain and the Nox domain prototype conserved in all NADPH oxidases is an additional transmembrane domain and a cytosolic linker harboring two EF-hand motifs involved in calcium binding, reminiscent of those found in Nox5 [213]. Although peroxidases are heme-containing proteins, the PO-like domains of Duox1 and Duox2 lack the conserved histidine residues, which are present in all other peroxidases [214,215]. This suggests that the release of H₂O₂ observed for Duox proteins is associated with distinct intermolecular features of the Duox/DuoxA complex. Structurally, the PO-like domain sets Duox apart from the other members of the NADPH oxidase family, and this unique region could be directly involved in the conversion of superoxide to H₂O₂, even though it lacks classical peroxidase activity [216]. Expression and purification of the human and *Caenorhabditis elegans* Duox1 peroxidase domains (hDuox1 and CeDuox1, respectively) revealed that heme was associated with CeDuox1, but not with hDuox1 [216]. Both CeDuox1 and hDuox1 were examined for peroxidase and superoxide dismutase (SOD) activity. In comparison to LPO, hDuox1 exhibited no peroxidase activity, while only modest activity was observed for CeDuox1. The ability of Duox1 to act as SOD was also ruled out, as binding of metals required for SOD activity such as copper, zinc and manganese [217,218], was absent, and hDuox1 and CeDuox1 PO-like domains failed to react with superoxide [216]. Conversely, others reported that IFN- γ treatment of human tracheobronchial epithelial cells expressing Duox2 induced peroxidase activity that was inhibitable by sodium azide, suggesting heme peroxidase activity [219]. Despite their high level of sequence homology Duox1 and Duox2 are regulated by different phosphorylation pathways: Duox1 is activated by protein kinase A (Gs-PKA pathway), while Duox2 activation occurs through protein kinase C (Gq-phospholipase C (PLC) pathway) [220]. The transcriptional regulation of Duox1 and Duox2 by inflammatory cytokines in the lung epithelium suggests distinct roles for Duox1 and Duox2 proteins in host defense [205]. The Th-2 cytokines IL-4 and IL-13 increased Duox1 expression by

up to 5-fold, while Duox2 was induced up to 25-fold, either with IFN- γ treatment (a Th-1 cytokine) or with the viral mimic polyinosine-polycytidylic acid (poly (I:C)), indicating a role for Duox2 in viral clearance, which was confirmed in several subsequent studies [136,205,221,222].

Both Duox1 and Duox2 are highly glycosylated with five putative N-glycosylation sites in the PO-like domains of both proteins (N94, N342, N354, N461 and N534 in Duox1; N100, N348, N382, N455 and N537 in Duox2) [223], and it appears that glycosylation is important for transport to the plasma membrane and cell surface expression of the active protein [223,224]. In a recent study by Wang et al. [193], a mutation in one of these glycosylation sites, N100D, was identified in a young Chinese patient. However, the patient was too young to assess the clinical outcome and type of CH. Deglycosylation experiments revealed two N-glycosylation states of both Duox1 and Duox2, corresponding to 190 and 180 kDa proteins [224]. Treatment of canine thyrocytes and Duox1/2-expressing Cos7 cells with N-glycosidase F or endoglycosidase H resulted in a drop in molecular mass to 160 kDa. Only the 190 kDa form of the protein was resistant to treatment with endoglycosidase H, indicating that this form is completely processed and capable of cell surface expression [224]. Early studies showed that many model cell lines when transfected with Duox cDNA were incapable of expressing active Duox at the plasma membrane [224], pointing to the presence of an unidentified component required for Duox maturation. Using data mining, Grasberger and Refetoff [225] identified two genes, *DUOX1* and *DUOX2*, required for Duox maturation and escape from the endoplasmic reticulum (ER).

4.2. DUOX2 variants in hypothyroidism

To date, over 40 Duox2 mutations have been described that directly affect thyroid dysmorphogenesis, resulting in transient to severe congenital hypothyroidism (Fig. 7, Table 2). In an initial study by Moreno et al. [180], four *DUOX2* variants were identified in a cohort of CH patients. One patient with severe and permanent CH carried a homozygous inactivating mutation in Duox2 R434X, while the other patients were heterozygous for inactivating mutations (Duox2 Q686X, R701X and S965fsX994) and showed a less severe, transient form of CH. It was concluded that biallelic inactivating mutations in Duox2 abolish the functional protein leading to the absence of proper thyroid hormone synthesis and permanent congenital hypothyroidism, while monoallelic inactivation of Duox2 result in the milder transient form of CH [180]. This initial hypothesis on biallelic vs monoallelic mutations and their outcome has since been challenged with the identification of patients with transient CH harboring compound heterozygous mutations in Duox2 [185,190]. It is conceivable that the transient or late-onset nature of CH in these patients is either due to the nature of the *DUOX2* variant present, or to the pairing of a null mutation with a partially functional mutation, thereby alleviating the defect as in the Duox2 E327X/H678R mutant [190], or to patients harboring additional, gain-of-function variants or genetic modifiers that alter ROS generation. The VEOIBD patients harboring inactivating heterozygous *DUOX2* variants showed normal thyroid function at diagnosis. One needs also to take into consideration that the entire Duox promoter region on chromosome 15q15 is prone to epigenetic modifications [226], which alter Duox/DuoxA expression levels.

More than 20 Duox2 mutations have been described in the PO-like domain. Several are nonsense mutations – E327X [190], R434X [180,192], K530X [185] – or frameshifts – G418fsX482 [182], L479SfsX2 [185], Q202RfsX93 [194] – which generate a premature stop codon resulting in a truncated Duox2 protein with a partial PO-like domain. Functionally, these mutations were deficient in

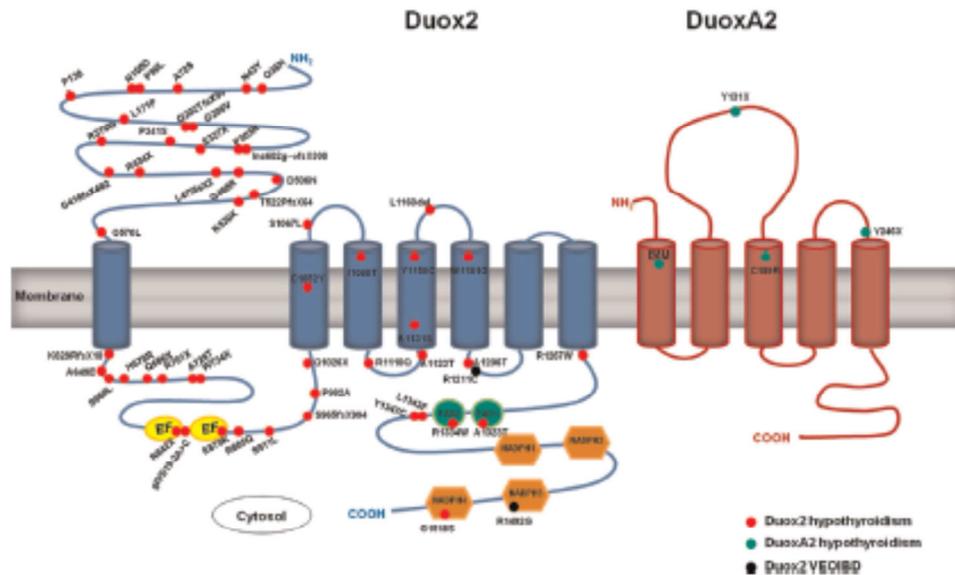


Fig. 7. *DUOX2* variants associated with hypothyroidism or VEOIBD. Mutations in *Duox2* and *DuoxA2* are prevalent in congenital hypothyroidism (CH). To date, over 40 *DUOX2* variants and 4 *DUOXA2* variants have been characterized. *Duox2* CH mutations span the entire protein and are depicted as red dots, while *DuoxA2* CH mutations are shown in green. Two *DUOX2* variants, recently identified as risk factors for VEOIBD, are indicated by black dots. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

H_2O_2 production. The *Duox2* R434X mutant was associated with severe permanent CH in patients harboring the variant on both alleles [180,192]. *Duox2* K530X was identified in two sisters from a Japanese cohort of patients with transient CH and was present as compound heterozygous *Duox2* E876K:S1067L mutant [185]. Elevated TSH levels were recorded at birth, which returned to the normal range following two years of L- T_4 supplementation. It is still unresolved why heterozygous *Duox2* mutations cause either complete deficiency in H_2O_2 generation or result in transient CH. One might speculate that the closely related *Duox1* enzyme, which is expressed in the thyroid at much lower levels [164], is capable of generating sufficient H_2O_2 to compensate for inadequate *Duox2* activity. The recent development of *Duox1* vs *Duox2* specific antibodies might shed light on potential compensatory co-localization of *Duox1* with TPO in patient tissue [227,228].

In addition to the peroxidase homology domain, a large number of *Duox2* mutations have been described in the first cytosolic loop containing the EF-hand motifs. Two particular mutants, *Duox2* R842X and E879K, reside within the EF-hand domains and were identified in patients with compound heterozygosity (*Duox2* R376W/R842X, *Duox2* K530X/E879K), leading to transient CH [181,185]. It is likely that mutations occurring in these domains reduce calcium binding and thus diminish *Duox2* activity; however no functional studies were undertaken. De Marco et al. [188] described five *Duox2* mutations within this cytosolic region (H678R, R701Q, A728T, S965fsX994 and P982A) in Italian patients with CH or subclinical hypothyroidism (SCH). Functional studies revealed that the *Duox2* S965fsX994 and A728T mutants were defective in H_2O_2 production, while *Duox2* H678R, R701Q and P982A were functional in model cell lines upon transfection. The *Duox2* H678R mutant, located between the first transmembrane helix and the first EF hand domain, is a common variant found among the Japanese population and appears to occur with high frequency in transient CH [185,189,190,195]. Cell-based studies revealed that *Duox2* H678R is a functional SNP retaining approximately 80% of its H_2O_2 -generating capacity [189]. A case of pseudodominant inheritance (the inheritance of an autosomal recessive trait imitating an autosomal dominant pattern) in transient CH was reported in a Japanese family, where the patient and her two siblings presented with the compound heterozygous

mutation *Duox2* H678R/Y1347C [195]. The mother presented with SCH due to a biallelic *Duox2* H678R mutation, while the father was symptom-free, harboring a monoallelic *Duox2* Y1347C mutation. The replacement of Tyr1347 with Cys may affect FAD binding in *Duox2*. While expression levels of *Duox2* Y1347C were comparable to wild type protein, this mutant generated 40% less H_2O_2 , suggesting a partial defect in electron transfer [195]. One explanation for the occurrence of pseudodominant inheritance is a high carrier frequency for the autosomal recessive trait. Interestingly, Japanese individuals who are homozygous for *Duox2* H678R are not necessarily affected by CH, since the frequency of the genotype (1/820) is higher than the prevalence of CH [189].

Although it is evident that *Duox2* mutations play a prominent role in CH, the extent to which other factors (epigenetics, iodide status of the mother during pregnancy) may influence the onset of the disease is still uncertain. Wang et al. [193] reported two patients with the same monoallelic *Duox2* mutation, A1206T, located in the last intracellular loop (termed D-loop in Nox). Both were diagnosed with CH after neonatal screening, however, upon treatment with L- T_4 and subsequent withdrawal of this treatment, one patient was diagnosed with transient CH, while the other patient was diagnosed with permanent CH. Although TPO and TG mutations were not detected, it cannot be ruled out that a second loss-of-function mutation in the other allele may have occurred [193]. The first adult case of *Duox2*-associated CH was described by Ohye et al. [184], identifying a novel R1110Q mutation in the second intracellular domain of *Duox2* (termed B-loop in Nox). The patient was homozygous for *Duox2* R1110Q and, although biallelic mutations are believed to result in total organification defect, the onset of the disease did not occur until the patient was in her 40s and the perchlorate discharge test, performed at age 56, was suggestive of PIOD. Although no functional analysis was performed on *Duox2* R1110Q, a previous study by von Lohneysen et al. [74] indicated that ROS production by Nox2 and Nox4 was dependent on the respective Nox B-loops. Thus, it is plausible that any mutation in this region of *Duox2* could have a dramatic effect on the H_2O_2 -generating ability of the protein. The *Duox2* missense mutant R1334W, located in the second FAD-binding motif of *Duox2*, was identified in a cohort of Korean families, who presented with CH in conjunction with eutopic thyroid glands [194].

Table 2
Summary of Duox2 mutations in congenital hypothyroidism.

Duox2 mutation	ROS production	Protein expression	Hypothyroidism (permanent/transient)	Literature
Q36H	N.D.	N.D.	Persistent	Varela et al.
N43Y	Decreased	N.D.	Permanent	Jin et al.
A72S	Decreased	N.D.	Permanent	Jin et al.
P96L	Decreased	N.D.	Permanent	Jin et al.
N100D	N.D.	N.D.	N.D.	Wang et al.
P138L	Mildly increased	N.D.	Permanent	Muzza et al.
L171P	Unchanged	N.D.	Permanent	Muzza et al.
Q202T5X99	Decreased	N.D.	Permanent	Jin et al.
G206V	Mildly decreased	N.D.	Permanent/transient	Jin et al.
P303R	Mildly decreased	N.D.	Permanent	Muzza et al.
ins602g → fsX300	N.D.	N.D.	N.D.	Pfarr et al.
E327X	N.D.	N.D.	Transient	Kasahara et al.
P341S	Decreased	N.D.	N.D.	Muzza et al.
R376W	N.D.	N.D.	Persistent mild	Vigone et al.
G418fsX482	N.D.	N.D.	Persistent	Varela et al.
R434X	N.D.	N.D.	Permanent	Moreno et al., Gangul et al.
L479fsX2	N.D.	N.D.	Transient	Maruo et al., Yoshizawa et al.
G488R	Decreased	N.D.	Transient	Narumi et al., Jin et al., Yoshizawa et al.
D506N	N.D.	N.D.	N.D.	Pfarr et al.
T522PfsX64	N.D.	N.D.	Permanent	Muzza et al.
K530X	N.D.	N.D.	Transient	Maruo et al.
Q570L	Decreased	N.D.	Permanent	Muzza et al.
K628RfsX10	N.D.	N.D.	Transient	Maruo et al.
A649E	N.D.	N.D.	Transient	Maruo et al.
S660L	N.D.	N.D.	Permanent	Wang et al.
H678R	Mildly decreased	Unchanged	Permanent/transient	Maruo et al., Abe et al., De Marco et al., Narumi et al., Jin et al., Kasahara et al., Muzza et al.
Q686X	N.D.	N.D.	Transient	Moreno et al.
R701X	Mildly Decreased	Unchanged	Transient	Moreno et al., Muzza et al., De Marco et al.
A728T	Decreased	Decreased at cell surface	Transient	De Marco et al.
W734X	N.D.	N.D.	Permanent	Wang et al.
R842X	N.D.	N.D.	Persistent mild	Vigone et al.
gIVS19-2A > C	N.D.	N.D.	Persistent	Varela et al.
M866R	Abolished	N.D.	Permanent	Muzza et al.
E879K	Decreased	N.D.	Permanent/transient	Jin et al.
R885Q	Decreased	N.D.	Permanent/transient	Maruo et al., Jin et al.
S911L	Decreased	Decreased et cell surface	Mild persistent	Tonacchera et al.
S965fsX994	Decreased	Decreased at cell surface	Permanent/transient/Subclinical	Moreno et al., Varela et al., De Marco et al.
P966SfsX29	N.D.	N.D.		Muzza et al.
P982A	Unchanged	Unchanged	Permanent/transient	De Marco et al., Muzza et al.
C1052Y	Decreased	Decreased at cell surface	Subclinical	Tonacchera et al., Muzza et al.
S1067L	Mildly increased	N.D.	Mild persistent/transient	Maruo et al., Muzza et al.
R1110Q	Decreased	N.D.	Transient	Ohye et al., Narumi et al., Wang et al., Jin et al.
I1080T	Decreased	N.D.	Late-onset/permanent	Narumi et al.
A1123T	Decreased	N.D.	Transient	Jin et al.
A1131S	N.D.	N.D.	Permanent	Wang et al.
Y1150C	Decreased	Decreased at cell surface	Permanent	De Marco et al., Muzza et al.
L1160del	Decreased	N.D.	Subclinical	Narumi et al.
W1181G	N.D.	N.D.	Transient	Wang et al.
A1206T	N.D.	N.D.	Transient	Wang et al.
R1267W	N.D.	N.D.	Transient	Wang et al.
A1323T	N.D.	N.D.	N.D.	Saitoh et al.
R1334W	Decreased	N.D.	Normal thyroid at birth	Jin et al.
L1343F	N.D.	N.D.	Permanent	Saitoh et al.
Y1347C	Decreased	Unchanged	Normal thyroid at birth	Abe et al.
G1518S	Abolished	Decreased at cell surface	Transient	Hoste et al.
E1546G	Decreased	N.D.	Transient Permanent	Muzza et al.

*N.D.=not determined.

Functionally, this Duox2 mutation generated approximately 50% less H₂O₂ than wild type Duox2. Recently, a second Duox2 variant affecting the first FAD-binding domain has been identified [196]. This Duox2 A1323T mutation was found in association with a second Duox2 mutation (L1343F) on the same allele, and a

heterozygous mutation for TSHR (R450H) on the second allele. This patient developed CH at the age of 20 months and required a dose of L-T₄ usually administered to children with permanent CH to keep serum TSH levels within the normal range [196]. It is likely that the combination of Duox2 and TSHR variants contributed to

the severity of the phenotype in this particular case.

4.3. DuoxA2 biochemistry and DUOXA2 variants in hypothyroidism

Both *DUOX* and *DUOXA* genes are located in a head-to-head orientation on chromosome 15, with each of the *DUOXA* genes sharing the core promoter region with their respective partner *DUOX* gene, enabling co-expression of Duox/DuoxA complexes [225]. Co-expression of DuoxA2 with Duox2 was critical for the exit of Duox2 from the ER and allowed surface expression of the protein [225]. Although the DuoxA proteins were initially characterized as ER-resident proteins allowing the transition of Duox from the ER to the Golgi [225], later studies showed that DuoxA1 and DuoxA2 could escape the ER and translocate as heterodimers with their matched Duox partner to various membrane compartments [227,229]. In both studies, Duox1 and Duox2 were co-expressed with DuoxA1, DuoxA2 and several DuoxA1 splice variants to explore their ability to form stable complexes, thereby facilitating targeting to the cell surface and catalytic activity. Of the four DuoxA1 splice variants investigated (DuoxA1-1, DuoxA1-2, DuoxA1-3 and DuoxA1-4), Duox1/DuoxA1-3 formed the preferred heterodimer for optimal Duox1 activity. Both DuoxA2 and DuoxA1-3 were capable of targeting Duox2 to the plasma membrane, albeit to different membrane subdomains. Dependent on the cellular context, H₂O₂ generation was somewhat more efficient for the Duox2/DuoxA2 complex [227,229]. The mismatched pairs, Duox2/DuoxA1-3 and Duox2/DuoxA1-4 generated low levels of superoxide, suggesting that forced formation of mismatched heterodimers leads to superoxide leakage due to incorrect complex formation [229]. A recent study using truncated and chimeric DuoxA1 and DuoxA2 constructs [230], revealed that in the Duox1/DuoxA1 complex, the C-terminus of DuoxA1 was crucial for H₂O₂ generation, whereas in Duox2/DuoxA2 the N-terminal domain of DuoxA2 was involved in promoting the catalytic activity of the complex. Therefore, if Duox2 is capable of forming a functional complex with both DuoxA1 and DuoxA2, it seems plausible that Duox2 can be present, for example in the thyroid, in two different active conformations, generating superoxide if it is matched with DuoxA1 and H₂O₂ when preferentially paired with DuoxA2. Ueyama et al. [231] recently identified the first extracellular loop of Duox proteins as an area that prevents superoxide leakage, with the Duox1 loop being more effective. This superoxide leakage seems to occur when the stabilization and maturation of the Duox/DuoxA complex is disrupted. Additionally, three N-glycosylation sites (N84, N109 and N121), located in the large first extracellular loop between transmembrane domains 2 and 3 have been identified in both DuoxA1 and DuoxA2, but their contribution to complex formation with Duox1/Duox2 is unknown [225].

As heterodimerization is essential for the correct localization and catalytic activity of the Duox2/DuoxA2 complex, it is not surprising that *DUOXA2* variants have been identified in CH. So far, four mutations associated with congenital hypothyroidism have been identified in DuoxA2-I26M, Y131X, C189R and Y246X [197,199,200]. The first mutation, DuoxA2 Y246X, was identified in a Chinese patient with CH due to PIOD, leading to a truncated protein lacking the fifth transmembrane region and C-terminal cytoplasmic domain [200]. Cell-based studies suggested that the mutant DuoxA2 Y246X protein may undergo rapid turnover at the site of synthesis, leading to lower steady-state expression compared to the wild type protein. Analysis of DuoxA2 Y246X revealed diminished protein expression and loss of DuoxA2 function upon co-transfection of Duox2 in model cell lines. N-glycosylation of the mutant DuoxA2 protein was not altered, as determined by immunoblot analysis, suggesting that the remaining protein was correctly inserted into the membrane [200]. Although the patient was homozygous for the DuoxA2 Y246X nonsense mutation, a

milder form of CH was observed, possibly indicating that DuoxA1 may compensate for DuoxA2. Co-expression of Duox2 with DuoxA1 supported this hypothesis, since Duox2 was shown to be partially rescued by DuoxA1, although superoxide instead of H₂O₂ was generated [200]. The Y246X mutation is described in 3 out of 4 studies examining DuoxA2 mutations [197,198,200], indicating that this specific variant may occur at a high frequency in Chinese cohorts with congenital hypothyroidism. Liu et al. [198] recently described a novel heterozygous missense DuoxA2 mutation, I26M, in a patient with mild transient CH, where the steady-state expression of the protein was comparable to wild type DuoxA2 despite complete deficiency in H₂O₂ generation. It is conceivable that replacement of DuoxA2 Ile26 with Met introduces an alternative start site, deleting the N-terminus of DuoxA2, which is important for activity of the Duox2/DuoxA2 complex.

Cysteine residues play a key role in the structure and function of proteins by promoting stability and in some cases by reversible deactivation mechanisms through the formation of disulfide bonds [232]. Mutations of certain Duox2 cysteine residues caused ER retention [232,233]. Similarly, mutating Cys579 in Duox1 and the corresponding Cys582 in Duox2 completely blocked trafficking to the membrane [234]. Examining the role of specific cysteine residues in the PO-like domain revealed an intramolecular disulfide bond between Cys124 in the PO-like domain and Cys162 in the second extracellular loop of the Nox domain, which was crucial for structure and functionality of Duox2 [235]. The formation of this disulfide bond in the ER appears to be a key step in transporting the Duox2/DuoxA2 complex to the membrane. An additional pair of cysteines, Duox2 Cys568 and Cys582, also located in the PO-like domain, were part of intermolecular disulfide bridges with Cys167 and Cys233 in the extracellular loops of DuoxA2, once again promoting the stability of the overall complex [235]. Interestingly, Cys167 is conserved in both DuoxA1 and DuoxA2, possibly also permitting linkage of DuoxA1 to Duox2 as this complex is functionally active [227,229]. These studies did not address the importance of Cys189, although replacing this conserved cysteine with arginine (DuoxA2 C189R) caused mild CH in a patient [199]. Functional cell-based experiments revealed the absence of protein expression or ROS generation when DuoxA2 C189R was co-transfected with Duox2 in HeLa cells, suggesting that the Duox2 C189R protein is unstable and rapidly degraded, preventing complex formation [199].

Mutation or deletion of Duox2 and/or DuoxA2 in mice mimicked human disease by causing congenital hypothyroidism [236,237]. Grasberger et al. [237] reported that mice deficient in DuoxA1 and DuoxA2 (*duoxa*^{-/-}) showed severe delays in post-natal development, impaired linear growth of long bones and considerably enlarged thyroid glands. These traits, taken together with decreased T₄ and serum T₃ levels, and markedly elevated TSH, were indicative of severe hypothyroidism in *duoxa*^{-/-} mice. Daily L-T₄ replacement treatment of these mice completely reversed this phenotype, with bone growth, weight gain, fertility and circulating levels of T₃ in *duoxa*^{-/-} mice indistinguishable from that of wild type littermates. Functionally, deletion of DuoxA in these mice led to a maturation defect of Duox proteins, with mice expressing both Duox proteins in the immature, ER-resident form. As expected, deficiency in H₂O₂ production in the thyroid tissue of *duoxa*^{-/-} mice was observed, reiterating the necessity of DuoxA for functional expression of Duox and the role of Duox in thyroidal H₂O₂ generation [237]. Studies in *duox2*^{thyd/thyd} mice harboring a Duox2 V674G mutation have provided a genetic model for studying Duox2 function in the thyroid [238]. Mice homozygous for the *thyd* mutation showed reduced weight (50% less) and thin bones. The thyroid glands of mutant mice were goitrous and contained few normal follicles, with serum T₄ levels approximately 10-fold lower than wild type controls and

significantly increased TSH levels [238]. Transfection of the Duox2 V674G mutant into a DuoxA2-containing model cell system showed complete loss of catalytic activity [236]. This loss of activity was due to a combination of factors such as decreased protein expression and insufficient targeting to the plasma membrane. However, when Val674 was mutated to either Leu or Thr, ROS production returned to levels comparable to Duox2 wild type, suggesting a need for bulkier aliphatic and/or hydrophobic amino acids at the Duox2 Val674 site [236]. Only Duox2, but not Duox1, is required for thyroid hormone synthesis, as Donko et al. [239] reported normal growth and serum thyroxin levels in Duox1 knockout mice.

Since the first description of *DUOX2* variants as genetic cause of congenital hypothyroidism, it has become apparent that additional factors influence the degree of disease progression associated with individual mutations. In some cases, mutations in other genes associated with CH, such as TPO or TSHR, have been identified [189,194]; in others, the iodine status of the mother at the time of birth may have played a role in the nature of CH observed [190]. Similarly, epigenetic factors cannot be excluded in the determination of whether certain Duox2 mutations lead to permanent or transient congenital hypothyroidism in individual cases. Regardless of additional contributing factors, it is apparent that deficiency in ROS production due to the absence or inefficiency of Duox2 catalytic activity, results in the manifestation of congenital hypothyroidism.

5. Discussion

Pathologies causally linked to ROS deficiency due to loss-of-function mutations in genes encoding for various NADPH oxidase complexes demonstrate not only the importance of ROS for specialized functions (microbial killing, thyroid hormone synthesis), but also indicate hyperinflammation as result of reduced or absent ROS generation. This rather unexpected phenotype is connected to ROS due to their role as a key intracellular signaling molecule, controlling redox-regulated pathways and transcription factors, and altering the activity of kinases, phosphatases and GTPases by oxidative modification. Other enzymes capable of generating ROS as a byproduct of their principal functions will cause disease when disabled by mutational events, but variants of these enzymes often produce even more ROS, and directly associating increased ROS levels causally with the observed pathology is challenging. For example, mtDNA mutations in NADH dehydrogenase subunit 6 cause deficiency in the activity of the respiratory complex I (CI), leading to overproduction of ROS. These mutations were connected to an increased metastatic potential of tumor cells in mice [240], although other studies connected CI mutations to modulation of tumor proliferation via stabilization of hypoxia-inducible factor 1 α and not by ROS involvement [241].

If disrupting the redox balance is linked to inflammatory disease, one might expect that genetic polymorphisms in antioxidant genes constitute a risk factor. Only very little information is currently available in this regard. For rheumatoid arthritis (RA), common polymorphisms in *SOD2*, *SOD3* or *CAT* were either not associated with risk or severity of RA [242,243], or showed a lower mean disease activity score [243]. The same *CAT* promoter region polymorphism (C-262T) was proposed to be a risk factor for ulcerative colitis, although the patient cohort was rather limited [244]. The over 170 *SOD1* variants associated with familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS) may not lead to disease due to their loss of the enzyme's antioxidant function. Recent studies highlight changes in localization, folding and subsequent aggregation as unfavorable *SOD1* alterations reflecting the clinical phenotypes of ALS [245,246]. In contrast to the genetic association of Nox2 and

Duox2 oxidases to disease (CGD, hypothyroidism), which is reflected in experimental mouse models, the observed susceptibility to disease due to inherited or private polymorphisms or mutations in redox-associated genes will necessitate interrogating other risk genes or environmental factors, as IBD genetics indicate beyond doubt. Knowledge regarding the interplay between these factors is steadily increasing, and will inform future therapeutic options.

Conflict of interest

None.

Acknowledgments

This work was supported by Science Foundation Ireland (10/IN.1/B2988) (U.G.K.), the University Joseph Fourier, Faculty of Medicine, the Regional Clinical Research Department, DRCI, Grenoble University Hospital, the CGD Research Trust Grant award reference J4G/09/09 and the National Institutes of Health Grant N01-AI-30070 from the Immunodeficiency Network and the Primary Immunodeficiency Disease Consortium (M-J.S.). S.O.N. was part of the MolCellBiol Programme, funded under the Programme for Research in Third-Level Institutions and co-funded under the European Regional Development Fund. Several authors of this review were supported by the European Cooperation in Science and Technology (COST Action BM1203/EU-ROS).

References

- [1] M.U. Moreno, G. San Jose, A. Fortuno, et al., A novel *CYBA* variant, the -675A/T polymorphism, is associated with essential hypertension, *J. Hypertens.* 25 (2007) 1620–1626.
- [2] M.U. Moreno, G. San Jose, J. Orbe, et al., Preliminary characterisation of the promoter of the human *p22(phox)* gene: identification of a new polymorphism associated with hypertension, *FEBS Lett.* 542 (2003) 27–31.
- [3] Y.W. Qin, J. Peng, B.Y. Liang, et al., The A930G polymorphism of *p22(phox)* (*CYBA*) gene but not C242T variation is associated with hypertension: a meta-analysis, *PLoS ONE* 8 (2013) e82465.
- [4] M.U. Moreno, G. Zalba, *CYBA* gene variants as biomarkers for coronary artery disease, *Drug News Perspect.* 23 (2010) 316–324.
- [5] J.M. van den Berg, E. van Koppen, A. Ahlin, et al., Chronic granulomatous disease: the European experience, *PLoS ONE* 4 (2009) e5234.
- [6] S.M. Holland, Chronic granulomatous disease, *Hematol. Oncol. Clin. N. Am.* 27 (2013) 89–99.
- [7] A.W. Segal, O.T. Jones, D. Webster, et al., Absence of a newly described cytochrome b from neutrophils of patients with chronic granulomatous disease, *Lancet* 2 (1978) 446–449.
- [8] A.W. Segal, A.R. Cross, R.C. Garcia, et al., Absence of cytochrome b-245 in chronic granulomatous disease. A multicenter European evaluation of its incidence and relevance, *N. Engl. J. Med.* 308 (1983) 245–251.
- [9] Y. Ohno, E.S. Buescher, R. Roberts, et al., Reevaluation of cytochrome b and flavin adenine dinucleotide in neutrophils from patients with chronic granulomatous disease and description of a family with probable autosomal recessive inheritance of cytochrome b deficiency, *Blood* 67 (1986) 1132–1138.
- [10] D. Roos, D.B. Kuhns, A. Maddalena, et al., Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (third update), *Blood Cells Mol. Dis.* 45 (2010) 246–265.
- [11] D. Roos, D.B. Kuhns, A. Maddalena, et al., Hematologically important mutations: the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease (second update), *Blood Cells Mol. Dis.* 44 (2010) 291–299.
- [12] J.D. Matute, A.A. Arias, N.A. Wright, et al., A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in *p40 phox* and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity, *Blood* 114 (2009) 3309–3315.
- [13] U.G. Knauts, P.G. Heyworth, T. Evans, et al., Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2, *Science* 254 (1991) 1512–1515.
- [14] A. Abo, A. Boyhan, I. West, et al., Reconstitution of neutrophil NADPH oxidase activity in the cell-free system by four components: *p67-phox*, *p47-phox*, *p21rac1*, and cytochrome b-245, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 16767–16770.
- [15] D.R. Ambuso, C. Knall, A.N. Abell, et al., Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 4654–4659.

- [16] D.A. Williams, W. Tao, F. Yang, et al., Dominant negative mutation of the hematopoietic-specific Rho GTPase, Rac2, is associated with a human phagocyte immunodeficiency, *Blood* 96 (2000) 1646–1654.
- [17] N. Rieber, A. Hector, T. Kuipers, et al., Current concepts of hyperinflammation in chronic granulomatous disease, *Clin. Dev. Immunol.* 2012 (2012) 252460.
- [18] J.R. Brown, D. Goldblatt, J. Buddle, et al., Diminished production of anti-inflammatory mediators during neutrophil apoptosis and macrophage phagocytosis in chronic granulomatous disease (CGD), *J. Leukoc. Biol.* 73 (2003) 591–599.
- [19] J. Bylund, K.L. MacDonald, K.L. Brown, et al., Enhanced inflammatory responses of chronic granulomatous disease leukocytes involve ROS-independent activation of NF-kappa B, *Eur. J. Immunol.* 37 (2007) 1087–1096.
- [20] K.L. Brown, J. Bylund, K.L. MacDonald, et al., ROS-deficient monocytes have aberrant gene expression that correlates with inflammatory disorders of chronic granulomatous disease, *Clin. Immunol.* 129 (2008) 90–102.
- [21] L. Bjorkman, C. Dahlgren, A. Karlsson, et al., Phagocyte-derived reactive oxygen species as suppressors of inflammatory disease, *Arthritis Rheum.* 58 (2008) 2931–2935.
- [22] D. Hartl, N. Lehmann, F. Hoffmann, et al., Dysregulation of innate immune receptors on neutrophils in chronic granulomatous disease, *J. Allergy Clin. Immunol.* 121 (375–382) (2008) e9.
- [23] J.L. Harden, N.K. Egilmez, Indoleamine 2,3-dioxygenase and dendritic cell tolerogenicity, *Immunol. Investig.* 41 (2012) 738–764.
- [24] T.S. Johnson, D.H. Munn, Host indoleamine 2,3-dioxygenase: contribution to systemic acquired tumor tolerance, *Immunol. Investig.* 41 (2012) 765–797.
- [25] G.C. Prendergast, C. Smith, S. Thomas, et al., Indoleamine 2,3-dioxygenase pathways of pathogenic inflammation and immune escape in cancer, *Cancer Immunol. Immunother.* 63 (2014) 721–735.
- [26] L. Romani, F. Fallarino, A. De Luca, et al., Defective tryptophan catabolism underlies inflammation in mouse chronic granulomatous disease, *Nature* 451 (2008) 211–215.
- [27] B. Jurgens, D. Fuchs, J. Reichenbach, et al., Intact indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human chronic granulomatous disease, *Clin. Immunol.* 137 (2010) 1–4.
- [28] S.S. De Ravin, K.A. Zarembek, D. Long-Priel, et al., Tryptophan/tryptophan metabolism in human leukocytes is independent of superoxide and is fully maintained in chronic granulomatous disease, *Blood* 116 (2010) 1755–1760.
- [29] O. Kurmasov, I. Jablonski, B. Polanuyer, et al., Aerobic tryptophan degradation pathway in bacteria: novel kynurenine formamidase, *FEMS Microbiol. Lett.* 227 (2003) 219–227.
- [30] J.M. Farrow 3rd, E.C. Pesci, Two distinct pathways supply anthranilate as a precursor of the *Pseudomonas* quinolone signal, *J. Bacteriol.* 189 (2007) 3425–3433.
- [31] S. Chugani, E.P. Greenberg, LuxR homolog-independent gene regulation by acyl-homoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107 (2010) 10673–10678.
- [32] C. Genestet, A. Le Gouellec, H. Chaker, et al., Scavenging of reactive oxygen species by tryptophan metabolites helps *Pseudomonas aeruginosa* escape neutrophil killing, *Free Radic. Biol. Med.* 73 (2014) 400–410.
- [33] B. Levine, V. Deretic, Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 7 (2007) 767–777.
- [34] A. Orvedahl, B. Levine, Eating the enemy within: autophagy in infectious diseases, *Cell Death Differ.* 16 (2009) 57–69.
- [35] M.A. Sanjuan, C.P. Dillon, S.W. Tait, et al., Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis, *Nature* 450 (2007) 1253–1257.
- [36] J. Huang, V. Canadien, G.Y. Lam, et al., Activation of antibacterial autophagy by NADPH oxidases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106 (2009) 6226–6231.
- [37] E.L. van de Veerdonk, S.P. Smeekens, L.A. Joosten, et al., Reactive oxygen species-independent activation of the IL-1beta inflammasome in cells from patients with chronic granulomatous disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107 (2010) 3030–3033.
- [38] A. de Luca, S.P. Smeekens, A. Casagrande, et al., IL-1 receptor blockade restores autophagy and reduces inflammation in chronic granulomatous disease in mice and in humans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111 (2014) 3526–3531.
- [39] K. Bedard, K.H. Krause, The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology, *Physiol. Rev.* 87 (2007) 245–313.
- [40] B. Lassegue, A. San Martin, K.K. Griendling, Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system, *Circ. Res.* 110 (2012) 1364–1390.
- [41] O. Jung, J.G. Schreiber, H. Geiger, et al., gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension, *Gratulation* 109 (2004) 1795–1801.
- [42] K. Matsuno, H. Yamada, K. Iwata, et al., Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice, *Circulation* 112 (2005) 2677–2685.
- [43] F. Violi, V. Sarguigni, R. Carnevale, et al., Hereditary deficiency of gp91(phox) is associated with enhanced arterial dilatation: results of a multicenter study, *Gratulation* 120 (2009) 1616–1622.
- [44] F. Krotz, H.V. Sohn, T. Gloe, et al., NAD(P)H oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment, *Blood* 100 (2002) 917–924.
- [45] F. Violi, P. Pignatelli, Platelet NOX, a novel target for anti-thrombotic treatment, *Thromb. Haemost.* 111 (2014) 817–823.
- [46] Z. Nayermia, V. Jaquet, K.H. Krause, New insights on NOX enzymes in the central nervous system, *Antioxid. Redox Signal.* 20 (2014) 2815–2837.
- [47] K.T. Kishida, C.A. Hoeffler, D. Hu, et al., Synaptic plasticity deficits and mild memory impairments in mouse models of chronic granulomatous disease, *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 5908–5920.
- [48] K.T. Kishida, M. Pao, S.M. Holland, et al., NADPH oxidase is required for NMDA receptor-dependent activation of ERK in hippocampal area CA1, *J. Neurochem.* 94 (2005) 299–306.
- [49] M. Pao, E.A. Wiggs, M.M. Anastacin, et al., Cognitive function in patients with chronic granulomatous disease: a preliminary report, *Psychosomatics* 45 (2004) 230–234.
- [50] T.S. Cole, F. McKendrick, A.J. Cant, et al., Cognitive ability in children with chronic granulomatous disease: a comparison of those managed conservatively with those who have undergone hematopoietic stem cell transplant, *Neuropediatrics* 44 (2013) 230–232.
- [51] M.T. Fischer, R. Sharma, J.L. Jim, et al., NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury, *Brain* 135 (2012) 886–899.
- [52] L.J. Wu, Microglial voltage-gated proton channel Hv1 in ischemic stroke, *Transl. Stroke Res.* 5 (2014) 99–108.
- [53] D.C. Wu, D.B. Re, M. Nagai, et al., The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 12132–12137.
- [54] J.W. Leiding, B.E. Marciano, C.S. Zerbe, et al., Diabetes, renal and cardiovascular disease in p47phox-/- chronic granulomatous disease, *J. Clin. Immunol.* 33 (2013) 725–730.
- [55] D.B. Kuhns, W.G. Alvord, T. Heller, et al., Residual NADPH oxidase and survival in chronic granulomatous disease, *N. Engl. J. Med.* 363 (2010) 2600–2610.
- [56] K.J. Biberstine-Kinkade, L. Yu, M.C. Dinuer, Mutagenesis of an arginine- and lysine-rich domain in the gp91(phox) subunit of the phagocyte NADPH-oxidase flavocytochrome b558, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 10451–10457.
- [57] X.J. Li, D. Grunwald, J. Mathieu, et al., Crucial role of two potential cytosolic regions of Nox2, 191TSSTKTRRS200 and 484DESQANHFVHHDEKDS00, on NADPH oxidase activation, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 14962–14973.
- [58] L. Carrichon, A. Picciocchi, F. Debeurme, et al., Characterization of superoxide overproduction by the d-Loop(Nox4)-Nox2 cytochrome b(558) in phagocytes – differential sensitivity to calcium and phosphorylation events, *Biochim. Biophys. Acta* 1808 (2011) 78–90.
- [59] K. von Lohneysen, D. Noack, P. Hayes, et al., Constitutive NADPH oxidase 4 activity resides in the composition of the B-loop and the penultimate C terminus, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 8737–8745.
- [60] W.R. Taylor, D.T. Jones, A.W. Segal, A structural model for the nucleotide binding domains of the flavocytochrome b-245 beta-chain, *Protein Sci.* 2 (1993) 1675–1685.
- [61] K.A. Tucker, M.B. Lilly, L. Heck Jr., et al., Characterization of a new human diploid myeloid leukemia cell line (PLB-985) with granulocytic and monocytic differentiating capacity, *Blood* 70 (1987) 372–378.
- [62] L. Zhen, A.A. King, Y. Xiao, et al., Gene targeting of X chromosome-linked chronic granulomatous disease locus in a human myeloid leukemia cell line and rescue by expression of recombinant gp91phox, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 9832–9836.
- [63] L. Yu, A.R. Cross, L. Zhen, et al., Functional analysis of NADPH oxidase in granulocytic cells expressing a delta488-497 gp91(phox) deletion mutant, *Blood* 94 (1999) 2497–2504.
- [64] C. Bionda, X.J. Li, R. van Bruggen, et al., Functional analysis of two-amino acid substitutions in gp91 phox in a patient with X-linked flavocytochrome b558-positive chronic granulomatous disease by means of transgenic PLB-985 cells, *Hum. Genet.* 115 (2004) 418–427.
- [65] X.J. Li, F. Fieschi, M.H. Padet, et al., Leu505 of Nox2 is crucial for optimal p67phox-dependent activation of the flavocytochrome b558 during phagocytic NADPH oxidase assembly, *J. Leukoc. Biol.* 81 (2007) 238–249.
- [66] F. Debeurme, A. Picciocchi, M.C. Dagher, et al., Regulation of NADPH oxidase activity in phagocytes: relationship between FAD/NADPH binding and oxidase complex assembly, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 33197–33208.
- [67] A. Picciocchi, F. Debeurme, S. Beaumel, et al., Role of putative second transmembrane region of Nox2 protein in the structural stability and electron transfer of the phagocytic NADPH oxidase, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 28357–28369.
- [68] H. Raad, M.H. Padet, T. Boussetta, et al., Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox, *FASEB J.* 23 (2009) 1011–1022.
- [69] H.M. Jackson, T. Kawahara, Y. Nisimoto, et al., Nox4 B-loop creates an interface between the transmembrane and dehydrogenase domains, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 10281–10290.
- [70] T.M. Wallach, A.W. Segal, Analysis of glycosylation sites on gp91phox, the flavocytochrome of the NADPH oxidase, by site-directed mutagenesis and translation in vitro, *Biochem. J.* 321 (Pt 3) (1997) 583–585.
- [71] L. Yu, L. Zhen, M.C. Dinuer, Biosynthesis of the phagocyte NADPH oxidase cytochrome b558. Role of heme incorporation and heterodimer formation in maturation and stability of gp91phox and p22phox subunits, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 27288–27294.
- [72] L. Yu, M.T. Quinn, A.R. Cross, et al., Gp91(phox) is the heme binding subunit of the superoxide-generating NADPH oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 7993–7998.
- [73] L. Yu, E.R. Deleo, K.J. Biberstine-Kinkade, et al., Biosynthesis of

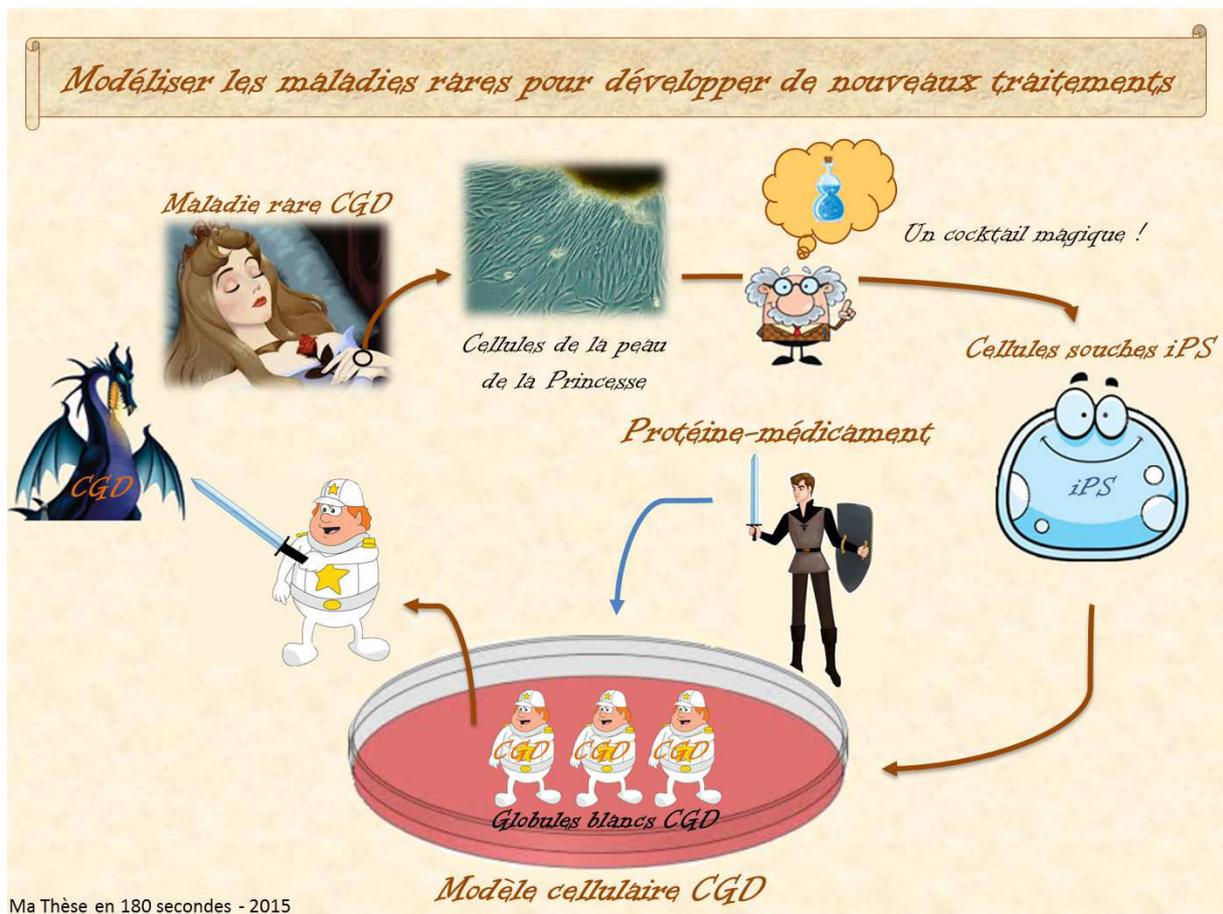
- flavocytochrome b558. gp91(phox) is synthesized as a 65-kDa precursor (p65) in the endoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 4364–4369.
- [74] K. von Lohneysen, D. Noack, M.R. Wood, et al., Structural insights into Nox4 and Nox2: motifs involved in function and cellular localization, *Mol. Cell. Biol.* 30 (2010) 961–975.
- [75] T. Kawahara, D. Ritsick, G. Cheng, et al., Point mutations in the proline-rich region of p22phox are dominant inhibitors of Nox1- and Nox2-dependent reactive oxygen generation, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 31859–31869.
- [76] Y. Zhu, C.C. Marchal, A.J. Casbon, et al., Deletion mutagenesis of p22phox subunit of flavocytochrome b558: identification of regions critical for gp91phox maturation and NADPH oxidase activity, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 30336–30346.
- [77] K. von Lohneysen, D. Noack, A.J. Jesaitis, et al., Mutational analysis reveals distinct features of the Nox4-p22 phox complex, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 35273–35282.
- [78] S. Beaumel, D. Grunwald, F. Fieschi, et al., Identification of NOX2 regions for normal biosynthesis of cytochrome b558 in phagocytes highlighting essential residues for p22phox binding, *Biochem. J.* 464 (2014) 425–437.
- [79] D. Noack, J. Rae, A.R. Cross, et al., Autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by defects in NCF-1, the gene encoding the phagocyte p47-phox; mutations not arising in the NCF-1 pseudogenes, *Blood* 97 (2001) 305–311.
- [80] D. Roos, M. de Boer, M.Y. Koker, et al., Chronic granulomatous disease caused by mutations other than the common GT deletion in NCF1, the gene encoding the p47phox component of the phagocyte NADPH oxidase, *Hum. Mutat.* 27 (2006) 1218–1229.
- [81] C.H. Han, J.L. Freeman, T. Lee, et al., Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox), *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 16663–16668.
- [82] P.M. Dang, A.R. Cross, B.M. Babior, Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67PHOX and cytochrome b558, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 3001–3005.
- [83] A. Gorlach, P.L. Lee, J. Roesler, et al., A p47-phox pseudogene carries the most common mutation causing p47-phox-deficient chronic granulomatous disease, *J. Clin. Investig.* 100 (1997) 1907–1918.
- [84] N. Vazquez, T. Lehmbecher, R. Chen, et al., Mutational analysis of patients with p47-phox-deficient chronic granulomatous disease: the significance of recombination events between the p47-phox gene (NCF1) and its highly homologous pseudogenes, *Exp. Hematol.* 29 (2001) 234–243.
- [85] P.G. Heyworth, D. Noack, A.R. Cross, Identification of a novel NCF-1 (p47-phox) pseudogene not containing the signature GT deletion: significance for A47 degrees chronic granulomatous disease carrier detection, *Blood* 100 (2002) 1845–1851.
- [86] A. Hayrapetyan, P.C. Dencher, K. van Leeuwen, et al., Different unequal crossover events between NCF1 and its pseudogenes in autosomal p47(phox)-deficient chronic granulomatous disease, *Biochim. Biophys. Acta* 1832 (2013) 1662–1672.
- [87] T. Brunson, Q. Wang, I. Chambers, et al., A copy number variation in human NCF1 and its pseudogenes, *BMC Genet.* 11 (2010) 13.
- [88] L.M. Olsson, A. Nerstedt, A.K. Lindqvist, et al., Copy number variation of the gene NCF1 is associated with rheumatoid arthritis, *Antioxid. Redox Signal.* 16 (2012) 71–78.
- [89] T. Kabuki, T. Kawai, Y. Kin, et al., A case of Williams syndrome with p47-phox-deficient chronic granulomatous disease, *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 26 (2003) 299–303.
- [90] E. Gilbert-Barness, T. Fox, G. Morrow, et al., Williams syndrome associated with Crohn disease, multiple infections, and chronic granulomatous disease, *Fetal Pediatr. Pathol.* 23 (2004) 29–37.
- [91] M. Del Campo, A. Antonell, L.F. Magano, et al., Hemizyosity at the NCF1 gene in patients with Williams-Beuren syndrome decreases their risk of hypertension, *Am. J. Hum. Genet.* 78 (2006) 533–542.
- [92] M.J. Stasia, M. Mollin, C. Martel, et al., Functional and genetic characterization of two extremely rare cases of Williams-Beuren syndrome associated with chronic granulomatous disease, *Eur. J. Hum. Genet.* 21 (2013) 1079–1084.
- [93] M.J. Stasia, X.J. Li, Genetics and immunopathology of chronic granulomatous disease, *Semin. Immunopathol.* 30 (2008) 209–235.
- [94] J. Roesler, F. Segerer, H. Morbach, et al., P67-phox (NCF2) lacking exons 11 and 12 is functionally active and leads to an extremely late diagnosis of chronic granulomatous disease (CGD), *PLoS ONE* 7 (2012) e34296.
- [95] D. Roos, J.D. van Buijl, A.T.J. Tool, et al., Two CGD families with a hypomorphic mutation in the activation domain of p67phox, *J. Clin. Cell. Immunol.* 5 (2014) 1–8.
- [96] K. Takahashi, S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell* 126 (2006) 663–676.
- [97] J. Yu, M.A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, et al., Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells, *Science* 318 (2007) 1917–1920.
- [98] H. Inoue, N. Nagata, H. Kurokawa, et al., iPS cells: a game changer for future medicine, *EMBO J.* 33 (2014) 409–417.
- [99] V.K. Singh, M. Kalsan, N. Kumar, et al., Induced pluripotent stem cells: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery, *Front. Cell. Dev. Biol.* 3 (2015) 2.
- [100] S. Mukherjee, G. Santilli, M.P. Blundell, et al., Generation of functional neutrophils from a mouse model of X-linked chronic granulomatous disorder using induced pluripotent stem cells, *PLoS ONE* 6 (2011) e17565.
- [101] G. Santilli, E. Almaraz, C. Brendel, et al., Biochemical correction of X-CGD by a novel chimeric promoter regulating high levels of transgene expression in myeloid cells, *Mol. Ther.* 19 (2011) 122–132.
- [102] J. Zou, C.L. Sweeney, B.K. Chou, et al., Oxidase-deficient neutrophils from X-linked chronic granulomatous disease iPS cells: functional correction by zinc finger nuclease-mediated safe harbor targeting, *Blood* 117 (2011) 5561–5572.
- [103] C.L. Sweeney, R.K. Merling, U. Choi, et al., Generation of functionally mature neutrophils from induced pluripotent stem cells, *Methods Mol. Biol.* 1124 (2014) 189–206.
- [104] Y. Yokoyama, T. Suzuki, M. Sakata-Yanagimoto, et al., Derivation of functional mature neutrophils from human embryonic stem cells, *Blood* 113 (2009) 6584–6592.
- [105] D. Hockemeyer, F. Soldner, C. Beard, et al., Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases, *Nat. Biotechnol.* 27 (2009) 851–857.
- [106] Y. Jiang, S.A. Cowley, U. Siler, et al., Derivation and functional analysis of patient-specific induced pluripotent stem cells as an in vitro model of chronic granulomatous disease, *Stem Cells* 30 (2012) 599–611.
- [107] J. Brault, E. Goutagny, N. Telugu, et al., Optimized generation of functional neutrophils and macrophages from patient-specific induced pluripotent stem cells: ex vivo models of X(O)-linked, AR22(O)- and AR47(O)- chronic granulomatous diseases, *Biores. Open Access* 3 (2014) 311–326.
- [108] K.D. Choi, M.A. Vodyanik, U. Shulvin, Generation of mature human myelomonocytic cells through expansion and differentiation of pluripotent stem cell-derived lin-CD34+CD43+CD45+ progenitors, *J. Clin. Investig.* 119 (2009) 2818–2829.
- [109] K.D. Choi, M. Vodyanik, U. Shulvin, Hematopoietic differentiation and production of mature myeloid cells from human pluripotent stem cells, *Nat. Protoc.* 6 (2011) 296–313.
- [110] C. Abraham, J.H. Cho, Inflammatory bowel disease, *N. Engl. J. Med.* 361 (2009) 2066–2078.
- [111] F. Biasi, G. Leonarduzzi, P. Oteiza, et al., Inflammatory bowel disease: mechanisms, redox considerations, and therapeutic targets, *Antioxid. Redox Signal.* 19 (2013) 1711–1747.
- [112] N.A. Molodecky, L.S. Soon, D.M. Rabi, et al., Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review, *Gastroenterology* 142 (46–54) (2012) e42.
- [113] E.I. Benchimol, D.R. Mack, G.C. Nguyen, et al., Incidence, outcomes, and health services burden of very early onset inflammatory bowel disease, *Gastroenterology* 147 (2014) 803–813 e7, quiz e14–5.
- [114] B. Hope, R. Shahdadpuri, C. Dunne, et al., Rapid rise in incidence of Irish paediatric inflammatory bowel disease, *Arch. Dis. Child.* 97 (2012) 590–594.
- [115] K. Eszter Muller, P. Laszlo Lakatos, M. Papp, et al., Incidence and Paris classification of pediatric inflammatory bowel disease, *Gastroenterol. Res. Pract.* 2014 (2014) 904307.
- [116] H.H. Uhlig, T. Schwert, S. Koletzko, et al., The diagnostic approach to monogenic very early onset inflammatory bowel disease, *Gastroenterology* 147 (990–1007) (2014) e3.
- [117] D. Gevers, S. Kugathasan, L.A. Denson, et al., The treatment-naïve microbiome in new-onset Crohn's disease, *Cell Host Microbe* 15 (2014) 382–392.
- [118] Y. Haberman, T.L. Tickle, P.J. Dexheimer, et al., Pediatric Crohn disease patients exhibit specific ileal transcriptome and microbiome signature, *J. Clin. Investig.* 124 (2014) 3617–3633.
- [119] B.E. Marciano, S.D. Rosenzweig, D.E. Kleiner, et al., Gastrointestinal involvement in chronic granulomatous disease, *Pediatrics* 114 (2004) 462–468.
- [120] M. Alimchandani, J.P. Lai, P.P. Aung, et al., Gastrointestinal histopathology in chronic granulomatous disease: a study of 87 patients, *Am. J. Surg. Pathol.* 37 (2013) 1365–1372.
- [121] M. Barbato, G. Ragusa, F. Gvitelli, et al., Chronic granulomatous disease mimicking early-onset Crohn's disease with cutaneous manifestations, *BMC Pediatr.* 14 (2014) 156.
- [122] A.M. Muise, T. Walters, W. Xu, et al., Single nucleotide polymorphisms that increase expression of the guanosine triphosphatase RAC1 are associated with ulcerative colitis, *Gastroenterology* 141 (2011) 633–641.
- [123] A.M. Muise, S.B. Snapper, S. Kugathasan, The age of gene discovery in very early onset inflammatory bowel disease, *Gastroenterology* 143 (2012) 285–288.
- [124] S.S. Dhillon, R. Fattouh, A. Elkadri, et al., Variants in nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase complex components determine susceptibility to very early onset inflammatory bowel disease, *Gastroenterology* 147 (680–689) (2014) e2.
- [125] H. Sumimoto, Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species, *FEBS J.* 275 (2008) 3249–3277.
- [126] R.L. Roberts, J.E. Hollis-Moffatt, R.B. Geary, et al., Confirmation of association of IRGM and NCF4 with ileal Crohn's disease in a population-based cohort, *Genes Immun.* 9 (2008) 561–565.
- [127] J.D. Boux, R.J. Xavier, K.D. Taylor, et al., Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis, *Nat. Genet.* 39 (2007) 596–604.
- [128] R. Somasundaram, J.J. Deuring, C.J. van der Woude, et al., Linking risk conferring mutations in NCF4 to functional consequences in Crohn's disease, *Gut* 61 (2012) 1097, author reply 1097–1098.
- [129] P.M. Dang, C. Elhim, J.C. Marie, et al., Anti-inflammatory effect of interleukin-10 on human neutrophil respiratory burst involves inhibition of GM-CSF-

- induced p47PHOX phosphorylation through a decrease in ERK1/2 activity, *FASEB J.* 20 (2006) 1504–1506.
- [130] J. Glas, J. Seiderer, G. Pasciuto, et al., rs224136 on chromosome 10q21.1 and variants in PHOX2B, NCF4, and FAM92B are not major genetic risk factors for susceptibility to Crohn's disease in the German population, *Am. J. Gastroenterol.* 104 (2009) 665–672.
- [131] D.K. Amre, D.R. Mack, D. Israel, et al., NELL1, NCF4, and FAM92B genes are not major susceptibility genes for Crohn's disease in Canadian children and young adults, *Inflamm. Bowel Dis.* 18 (2012) 529–535.
- [132] S.S. Dhillon, L.A. Mastropaulo, R. Murchie, et al., Higher activity of the inducible nitric oxide synthase contributes to very early onset inflammatory bowel disease, *Clin. Transl. Gastroenterol.* 5 (2014) e46.
- [133] S. Selemidis, G.J. Dusting, H. Peshavariya, et al., Nitric oxide suppresses NADPH oxidase-dependent superoxide production by S-nitrosylation in human endothelial cells, *Cardiovasc. Res.* 75 (2007) 349–358.
- [134] M.J. Hornsby, J.L. Huff, R.J. Kays, et al., *Helicobacter pylori* induces an antimicrobial response in rhesus macaques in a cag pathogenicity island-dependent manner, *Gastroenterology* 134 (2008) 1049–1057.
- [135] J. Aerssens, M. Camilleri, W. Talloen, et al., Alterations in mucosal immunity identified in the colon of patients with irritable bowel syndrome, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 6 (2008) 194–205.
- [136] M. Strengert, R. Jennings, S. Dawanture, et al., Mucosal reactive oxygen species are required for antiviral response: role of Duox in influenza A virus infection, *Antioxid. Redox Signal.* 20 (2014) 2695–2709.
- [137] H. Grasberger, M. El-Zaatari, D.T. Dang, et al., Dual oxidases control release of hydrogen peroxide by the gastric epithelium to prevent *Helicobacter felis* infection and inflammation in mice, *Gastroenterology* 145 (2013) 1045–1054.
- [138] P. Hayes, S. Dhillon, K. O'Neill, et al., Defects in NADPH oxidase genes *NOX1* and *DUOX2* in very early onset inflammatory bowel disease, *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* (2015), in press.
- [139] N. Corcionivoschi, L.A. Alvarez, T.H. Sharp, et al., Mucosal reactive oxygen species decrease virulence by disrupting campylobacter jejuni phosphotyrosine signaling, *Cell Host Microbe* 12 (2012) 47–59.
- [140] S. Bao, E.D. Carr, Y.H. Xu, et al., Gp91(phox) contributes to the development of experimental inflammatory bowel disease, *Immunol. Cell. Biol.* 89 (2011) 853–860.
- [141] C.F. Kriegstein, W.H. Cerwinka, E.S. Laroux, et al., Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: divergent roles of superoxide and nitric oxide, *J. Exp. Med.* 194 (2001) 1207–1218.
- [142] T. Rodrigues-Sousa, A.F. Ladeirainha, A.R. Santiago, et al., Deficient production of reactive oxygen species leads to severe chronic DSS-induced colitis in *Ncf1*^{p47phox}-mutant mice, *PLoS ONE* 9 (2014) e97532.
- [143] E.L. Campbell, W.J. Bruyninckx, C.J. Kelly, et al., Transmigrating neutrophils shape the mucosal microenvironment through localized oxygen depletion to influence resolution of inflammation, *Immunity* 40 (2014) 66–77.
- [144] K.L. Gornow, G. Goel, H. Sokol, et al., p40phox expression regulates neutrophil recruitment and function during the resolution phase of intestinal inflammation, *J. Immunol.* 189 (2012) 3631–3640.
- [145] G. Leoni, A. Alam, P.A. Neumann, et al., Annexin A1, formyl peptide receptor, and NOX1 orchestrate epithelial repair, *J. Clin. Investig.* 123 (2013) 443–454.
- [146] X. Treton, E. Pedruzzi, C. Guichard, et al., Combined NADPH oxidase 1 and interleukin 10 deficiency induces chronic endoplasmic reticulum stress and causes ulcerative colitis-like disease in mice, *PLoS ONE* 9 (2014) e101669.
- [147] S. Lipinski, A. Tili, C. Sina, et al., DUOX2-derived reactive oxygen species are effectors of NOD2-mediated antibacterial responses, *J. Cell Sci.* 122 (2009) 3522–3530.
- [148] T.S. MacFie, R. Poulos, A. Parker, et al., DUOX2 and DUOX2 form the predominant enzyme system capable of producing the reactive oxygen species H₂O₂ in active ulcerative colitis and are modulated by 5-aminosalicylic acid, *Inflamm. Bowel Dis.* 20 (2014) 514–524.
- [149] P.P. Lee, K.W. Chan, L. Jiang, et al., Susceptibility to mycobacterial infections in children with X-linked chronic granulomatous disease: a review of 17 patients living in a region endemic for tuberculosis, *Pediatr. Infect. Dis. J.* 27 (2008) 224–230.
- [150] C. Barese, S. Copelli, R. Zandomeni, et al., X-linked chronic granulomatous disease: first report of mutations in patients of Argentina, *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 26 (2004) 656–660.
- [151] R. Naidoo, N. Jordaan, K.W. Chan, et al., A novel CYBB mutation with the first genetically confirmed case of chronic granulomatous disease in South Africa, *S. Afr. Med. J.* 101 (2011) 768–769.
- [152] J. Bustamante, A.A. Arias, G. Vogt, et al., Germline CYBB mutations that selectively affect macrophages in kindreds with X-linked predisposition to tuberculous mycobacterial disease, *Nat. Immunol.* 12 (2011) 213–221.
- [153] G. Zalba, G. San Jose, E.J. Beaumont, et al., Polymorphisms and promoter overactivity of the p22(phox) gene in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats, *Genes* 88 (2001) 217–222.
- [154] P. Olofsson, J. Holmberg, J. Tordsson, et al., Positional identification of *Ncf1* as a gene that regulates arthritis severity in rats, *Nat. Genet.* 33 (2003) 25–32.
- [155] M. Hultqvist, P. Olofsson, J. Holmberg, et al., Enhanced autoimmunity, arthritis, and encephalomyelitis in mice with a reduced oxidative burst due to a mutation in the *Ncf1* gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 12646–12651.
- [156] K. Hagenow, K.A. Gelderman, M. Hultqvist, et al., *Ncf1*-associated reduced oxidative burst promotes IL-33R + T cell-mediated adjuvant-free arthritis in mice, *J. Immunol.* 183 (2009) 874–881.
- [157] M. Hultqvist, P. Olofsson, K.A. Gelderman, et al., A new arthritis therapy with oxidative burst inducers, *PLoS Med.* 3 (2006) e348.
- [158] C.O. Jacob, M. Eisenstein, M.C. Dinauer, et al., Lupus-associated causal mutation in neutrophil cytosolic factor 2 (NCF2) brings unique insights to the structure and function of NADPH oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109 (2012) E59–E67.
- [159] X. Kim-Howard, C. Sun, J.E. Molinero, et al., Allelic heterogeneity in NCF2 associated with systemic lupus erythematosus (SLE) susceptibility across four ethnic populations, *Hum. Mol. Genet.* 23 (2014) 1656–1668.
- [160] D.S. Cunnigham, G. Graham, D.L. Morris, T.R. Bhargava, et al., Association of NCF2, IKZF1, IRF8, IFIH1, and TYK2 with systemic lupus erythematosus, *PLoS Genet.* 7 (2011) e1002341.
- [161] A.M. Campbell, M. Kashgarian, M.J. Shlomchik, NADPH oxidase inhibits the pathogenesis of systemic lupus erythematosus, *Sci. Transl. Med.* 4 (2012) 157ra141.
- [162] J.E. Toublanc, Comparison of epidemiological data on congenital hypothyroidism in Europe with those of other parts in the world, *Horm. Res.* 38 (1992) 230–235.
- [163] M. De Felice, R. Di Lauro, Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms, *Endocr. Rev.* 25 (2004) 722–746.
- [164] X. De Deken, D. Wang, M.C. Many, et al., Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 23227–23233.
- [165] J.E. Royaux, K. Suzuki, A. Mori, et al., Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells, *Endocrinology* 141 (2000) 839–845.
- [166] A. Yoshida, S. Taniguchi, I. Hisatome, et al., Pendrin is an iodide-specific apical porter responsible for iodide efflux from thyroid cells, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (2002) 3356–3361.
- [167] L. Twyffels, A. Strickaert, M. Virreira, et al., Anoctamin-1/TMEM16A is the major apical iodide channel of the thyrocyte, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 307 (2014) C1102–C1112.
- [168] T. Ieiri, P. Cochaux, H.M. Targovnik, et al., A 3' splice site mutation in the thyroglobulin gene responsible for congenital goiter with hypothyroidism, *J. Clin. Investig.* 88 (1991) 1901–1905.
- [169] H. Cangul, K. Boelaert, M. Dogan, et al., Novel truncating thyroglobulin gene mutations associated with congenital hypothyroidism, *Endocrine* 45 (2014) 206–212.
- [170] H. Cangul, F. Darendeliler, Y. Saglam, et al., A truncating TPO mutation (Y55X) in patients with hypothyroidism and total iodide organification defect, *Endocr. Res.* 40 (2015) 146–150.
- [171] H. Bikker, M.T. den Hartog, F. Baas, et al., A 20-basepair duplication in the human thyroid peroxidase gene results in a total iodide organification defect and congenital hypothyroidism, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79 (1994) 248–252.
- [172] M.J. Abramowicz, H.M. Targovnik, V. Varela, et al., Identification of a mutation in the coding sequence of the human thyroid peroxidase gene causing congenital goiter, *J. Clin. Investig.* 90 (1992) 1200–1204.
- [173] H. Fujiwara, K. Tatsumi, K. Miki, et al., Congenital hypothyroidism caused by a mutation in the Na⁺/I⁻ symporter, *Nat. Genet.* 16 (1997) 124–125.
- [174] J. Pohlenz, G. Medeiros-Neto, J.L. Gross, et al., Hypothyroidism in a Brazilian kindred due to iodide trapping defect caused by a homozygous mutation in the sodium/iodide symporter gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240 (1997) 488–491.
- [175] J. Pohlenz, L.M. Rosenthal, R.E. Weiss, et al., Congenital hypothyroidism due to mutations in the sodium/iodide symporter. Identification of a nonsense mutation producing a downstream cryptic 3' splice site, *J. Clin. Investig.* 101 (1998) 1028–1035.
- [176] L.A. Everett, B. Glaser, J.C. Beck, et al., Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS), *Nat. Genet.* 17 (1997) 411–422.
- [177] F. Bogazzi, F. Raggi, E. Ultimieri, et al., A novel mutation in the pendrin gene associated with Pendred's syndrome, *Clin. Endocrinol.* 52 (2000) 279–285.
- [178] J.C. Moreno, W. Klootwijk, H. van Toor, et al., Mutations in the iodotyrosine deiodinase gene and hypothyroidism, *N. Engl. J. Med.* 358 (2008) 1811–1818.
- [179] G. Afink, W. Kulik, H. Overmars, et al., Molecular characterization of iodotyrosine dehalogenase deficiency in patients with hypothyroidism, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93 (2008) 4894–4901.
- [180] J.C. Moreno, H. Bikker, M.J. Kempers, et al., Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism, *N. Engl. J. Med.* 347 (2002) 95–102.
- [181] M.C. Vigone, L. Fugazzola, I. Zamproni, et al., Persistent mild hypothyroidism associated with novel sequence variants of the DUOX2 gene in two siblings, *Hum. Mutat.* 26 (2005) 395.
- [182] V. Varela, C.M. Rivolta, S.A. Esperante, et al., Three mutations (p.Q36H, p.G486X482, and g.N519-2A > C) in the dual oxidase 2 gene responsible for congenital goiter and iodide organification defect, *Clin. Chem.* 52 (2006) 182–191.
- [183] N. Pfarr, T.J. Musholt, P.B. Musholt, et al., Congenital primary hypothyroidism with subsequent adenomatous goiter in a Turkish patient caused by a homozygous 10-bp deletion in the thyroid peroxidase (TPO) gene, *Clin. Endocrinol.* 64 (2006) 514–518.
- [184] H. Ohye, S. Fukata, A. Hishinuma, et al., A novel homozygous missense mutation of the dual oxidase 2 (DUOX2) gene in an adult patient with large goiter, *Thyroid* 18 (2008) 561–566.

- [185] Y. Maruo, H. Takahashi, I. Soeda, et al., Transient congenital hypothyroidism caused by biallelic mutations of the dual oxidase 2 gene in Japanese patients detected by a neonatal screening program, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93 (2008) 4261–4267.
- [186] M. Tonacchera, G. De Marco, P. Agretti, et al., Identification and functional studies of two new dual-oxidase 2 (DUOX2) mutations in a child with congenital hypothyroidism and a eutopic normal-size thyroid gland, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94 (2009) 4309–4314.
- [187] C. Hoste, S. Rigutto, G. Van Vliet, et al., Compound heterozygosity for a novel hemizygous missense mutation and a partial deletion affecting the catalytic core of the H₂O₂-generating enzyme DUOX2 associated with transient congenital hypothyroidism, *Hum. Mutat.* 31 (2010) E1304–E1319.
- [188] G. De Marco, P. Agretti, L. Montanelli, et al., Identification and functional analysis of novel dual oxidase 2 (DUOX2) mutations in children with congenital or subclinical hypothyroidism, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96 (2011) E1335–E1339.
- [189] S. Narumi, K. Muroya, Y. Asakura, et al., Molecular basis of thyroid dysmorphogenesis: genetic screening in population-based Japanese patients, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96 (2011) E1838–E1842.
- [190] T. Kasahara, S. Narumi, K. Okasora, et al., Delayed onset congenital hypothyroidism in a patient with DUOX2 mutations and maternal iodine excess, *Am. J. Med. Genet. A* 161A (2013) 214–217.
- [191] A. Yoshizawa-Ogasawara, S. Ogikubo, M. Satoh, et al., Congenital hypothyroidism caused by a novel mutation of the dual oxidase 2 (DUOX2) gene, *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 26 (2013) 45–52.
- [192] H. Gangul, Z. Aycan, M. Kendall, et al., A truncating DUOX2 mutation (R434X) causes severe congenital hypothyroidism, *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 27 (2014) 323–327.
- [193] F. Wang, K. Lu, Z. Yang, et al., Genotypes and phenotypes of congenital goitre and hypothyroidism caused by mutations in dual oxidase 2 genes, *Clin. Endocrinol.* 81 (2014) 452–457.
- [194] H.Y. Jin, S.H. Heo, Y.M. Kim, et al., High frequency of DUOX2 mutations in transient or permanent congenital hypothyroidism with eutopic thyroid glands, *Horm. Res. Paediatr.* 82 (2014) 252–260.
- [195] K. Abe, S. Narumi, A.S. Suwandi, et al., Pseudodominant inheritance in a family with nonautoimmune hypothyroidism due to biallelic DUOX2 mutations, *Clin. Endocrinol.* (2014).
- [196] M. Satoh, K. Aso, S. Ogikubo, et al., Hypothyroidism caused by the combination of two heterozygous mutations: one in the TSH receptor gene the other in the DUOX2 gene, *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 28 (2015) 657–661.
- [197] R.H. Vi, W.B. Zhu, L.Y. Yang, et al., A novel dual oxidase maturation factor 2 gene mutation for congenital hypothyroidism, *Int. J. Mol. Med.* 31 (2013) 467–470.
- [198] S. Liu, L. Liu, X. Niu, et al., A novel missense mutation (I26M) in DUOX2A2 causing congenital goiter hypothyroidism impairs NADPH oxidase activity but not protein expression, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100 (2015) 1225–1229, [j.20143964](https://doi.org/10.1210.20143964).
- [199] I. Hular, P. Hermanns, C. Nestoris, et al., A single copy of the recently identified dual oxidase maturation factor (DUOX1) 1 gene produces only mild transient hypothyroidism in a patient with a novel biallelic DUOX2A2 mutation and monoallelic DUOX1A1 deletion, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96 (2011) E841–E845.
- [200] I. Zamproni, H. Grasberger, E. Cortinovis, et al., Biallelic inactivation of the dual oxidase maturation factor 2 (DUOX2) gene as a novel cause of congenital hypothyroidism, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93 (2008) 605–610.
- [201] S.M. Park, V.K. Chatterjee, Genetics of congenital hypothyroidism, *J. Med. Genet.* 42 (2005) 379–389.
- [202] C. Dupuy, R. Ohayon, A. Valent, et al., Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cDNAs, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 37265–37269.
- [203] M. Geiszt, J. Witt, J. Baffi, et al., Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense, *FASEB J.* 17 (2003) 1502–1504.
- [204] R. Forteza, M. Salathe, F. Miot, et al., Regulated hydrogen peroxide production by Duox in human airway epithelial cells, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 32 (2005) 462–469.
- [205] R.W. Harper, C. Xu, J.P. Eiserich, et al., Differential regulation of dual NADPH oxidases/peroxidases, Duox1 and Duox2, by Th1 and Th2 cytokines in respiratory tract epithelium, *FEBS Lett.* 579 (2005) 4911–4917.
- [206] R.A. El Hassani, N. Benfarez, B. Caillou, et al., Dual oxidase 2 is expressed all along the digestive tract, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288 (2005) G933–G942.
- [207] N.M. Fletcher, M.G. Saed, S. Abuanezh, et al., Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase is differentially regulated in normal myocardium versus leiomyoma, *Reprod. Sci.* 21 (2014) 1145–1152.
- [208] H. Choi, J.Y. Park, H.J. Kim, et al., Hydrogen peroxide generated by DUOX1 regulates the expression levels of specific differentiation markers in normal human keratinocytes, *J. Dermatol. Sci.* 74 (2014) 56–63.
- [209] Y. Song, J. Ruf, P. Lohaire, et al., Association of duoxes with thyroid peroxidase and its regulation in thyrocytes, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95 (2010) 375–382.
- [210] B. Corvillain, I. Collyn, J. van Sande, et al., Stimulation by iodide of H₂O₂ (2) generation in thyroid slices from several species, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 278 (2000) E692–E699.
- [211] L.C. Cardoso, D.C. Martins, M.D. Figueiredo, et al., Ca²⁺/nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent H₂O₂ (2) generation is inhibited by iodide in human thyroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (2001) 4339–4343.
- [212] Y. Song, N. Driessens, M. Costa, et al., Roles of hydrogen peroxide in thyroid physiology and disease, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92 (2007) 3764–3773.
- [213] W.A. Edens, L. Sharling, G. Cheng, et al., Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/peroxidase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91phox, *J. Cell Biol.* 154 (2001) 879–891.
- [214] H. Daiyasu, H. Toh, Molecular evolution of the myeloperoxidase family, *J. Mol. Evol.* 51 (2000) 433–445.
- [215] A. Donko, Z. Peterfi, A. Sum, et al., Dual oxidases, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 360 (2005) 2301–2308.
- [216] J.L. Meitzler, P.R. Ortiz de Montellano, Caenorhabditis elegans and human dual oxidase 1 (DUOX1) “peroxidase” domains: insights into heme binding and catalytic activity, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 18634–18643.
- [217] F. Pociot, T. Lorenzen, J. Nerup, A manganese superoxide dismutase (SOD2) gene polymorphism in insulin-dependent diabetes mellitus, *Dis. Markers* 11 (1993) 267–274.
- [218] I.N. Zelko, T.J. Mariani, R.J. Folz, Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression, *Free Radic. Biol. Med.* 33 (2002) 337–349.
- [219] R.W. Harper, C. Xu, M. McManus, et al., Duox2 exhibits potent heme peroxidase activity in human respiratory tract epithelium, *FEBS Lett.* 580 (2006) 5150–5154.
- [220] S. Rigutto, C. Hoste, H. Grasberger, et al., Activation of dual oxidases Duox1 and Duox2: differential regulation mediated by camp-dependent protein kinase and protein kinase C-dependent phosphorylation, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 6725–6734.
- [221] T. Hill 3rd, C. Xu, R.W. Harper, IFN γ mediates DUOX2 expression via a STAT-independent signaling pathway, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 395 (2010) 270–274.
- [222] N. Grandvaux, M. Mariani, K. Frnk, Lung epithelial NOX/DUOX and respiratory virus infections, *Clin. Sci.* 128 (2015) 337–347.
- [223] J.L. Meitzler, P.R. Ortiz de Montellano, Structural stability and heme binding potential of the truncated human dual oxidase 2 (DUOX2) peroxidase domain, *Arch. Biochem. Biophys.* 512 (2011) 197–203.
- [224] X. De Deken, D. Wang, J.E. Dumont, et al., Characterization of ThOX proteins as components of the thyroid H₂O₂-generating system, *Exp. Cell Res.* 273 (2002) 187–196.
- [225] H. Grasberger, S. Refetoff, Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 18269–18272.
- [226] S. Luxen, S.A. Belinsky, U.G. Kraus, Silencing of DUOX NADPH oxidases by promoter hypermethylation in lung cancer, *Cancer Res.* 68 (2008) 1037–1045.
- [227] S. Luxen, D. Noack, M. Frausto, et al., Heterodimerization controls localization of Duox-DuoxA NADPH oxidases in airway cells, *J. Cell Sci.* 122 (2009) 1238–1247.
- [228] R. Ameziane-El-Hassani, M. Talbot, M.C. de Souza Dos Santos, et al., NADPH oxidase DUOX1 promotes long-term persistence of oxidative stress after an exposure to irradiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112 (2015) 5051–5056.
- [229] S. Morand, T. Ueyama, S. Tsujibe, et al., Duox maturation factors form cell surface complexes with Duox affecting the specificity of reactive oxygen species generation, *FASEB J.* 23 (2009) 1205–1218.
- [230] C. Hoste, J.E. Dumont, F. Miot, et al., The type of DUOX-dependent ROS production is dictated by defined sequences in DUOX, *Exp. Cell Res.* 318 (2012) 2353–2364.
- [231] T. Ueyama, M. Sakuma, Y. Ninoyu, et al., The extracellular A-loop of dual oxidases affects the specificity of reactive oxygen species release, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 6495–6506.
- [232] S. Morand, D. Agrandji, M.S. Noel-Hudson, et al., Targeting of the dual oxidase 2N-terminal region to the plasma membrane, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 30244–30251.
- [233] R. Ameziane-El-Hassani, S. Morand, J.L. Boucher, et al., Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca²⁺-dependent H₂O₂-generating activity, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 30046–30054.
- [234] J.L. Meitzler, S. Hinde, B. Banfi, et al., Conserved cysteine residues provide a protein-protein interaction surface in dual oxidase (DUOX) proteins, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 7147–7157.
- [235] A. Carre, R.A. Louzada, R.S. Fortunato, et al., When an intramolecular disulfide bridge governs the interaction of DUOX2 with its partner DUOX2A, *Antioxid. Redox Signal.* (2015).
- [236] A. Donko, S. Morand, A. Korzeniowska, et al., Hypothyroidism-associated missense mutation impairs NADPH oxidase activity and intracellular trafficking of Duox2, *Free Radic. Biol. Med.* 73 (2014) 190–200.
- [237] H. Grasberger, X. De Deken, O.B. Mayo, et al., Mice deficient in dual oxidase maturation factors are severely hypothyroid, *Mol. Endocrinol.* 26 (2012) 481–492.
- [238] K.R. Johnson, C.C. Marden, P. Ward-Bailey, et al., Congenital hypothyroidism, dwarfism, and hearing impairment caused by a missense mutation in the mouse dual oxidase 2 gene, *Duox2*, *Mol. Endocrinol.* 21 (2007) 1593–1602.
- [239] A. Donko, E. Ruisanchez, A. Orient, et al., Urothelial cells produce hydrogen peroxide through the activation of Duox1, *Free Radic. Biol. Med.* 49 (2010) 2040–2048.
- [240] K. Ishikawa, K. Takenaga, M. Akimoto, et al., ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis, *Science* 320 (2008)

- 661–664.
- [241] L. Iommarini, I. Kurelac, M. Capristo, et al., Different mtDNA mutations modify tumor progression in dependence of the degree of respiratory complex I impairment, *Hum. Mol. Genet.* 23 (2014) 1453–1466.
- [242] A. El-Sohemy, M.C. Cornelis, Y.W. Park, et al., Catalase and PPARgamma2 genotype and risk of rheumatoid arthritis in Koreans, *Rheumatol. Int.* 26 (2006) 388–392.
- [243] P. Bohanec Grabar, D. Logar, M. Tomšič, et al., Genetic polymorphisms modifying oxidative stress are associated with disease activity in rheumatoid arthritis patients, *Dis. Markers* 26 (2009) 41–48.
- [244] S. Khodayari, Z. Salehi, S. Fakhrieh Asl, et al., Catalase gene C-262T polymorphism: importance in ulcerative colitis, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 28 (2013) 819–822.
- [245] S. Matus, V. Valenzuela, D.B. Medinas, et al., ER dysfunction and protein folding stress in ALS, *Int. J. Cell Biol.* 2013 (2013) 674751.
- [246] M. Prudencio, D.R. Borchelt, Superoxide dismutase 1 encoding mutations linked to ALS adopts a spectrum of misfolded states, *Mol. Neurodegener.* 6 (2011) 77.
- [247] M.J. Stasia, P. Bordignon, C. Martel, et al., A novel and unusual case of chronic granulomatous disease in a child with a homozygous 36-bp deletion in the CYBA gene (A22(0)) leading to the activation of a cryptic splice site in intron 4, *Hum. Genet.* 110 (2002) 444–450.

TRAVAUX DE RECHERCHE



Présentation de l'article 1

Optimized Generation of Functional Neutrophils and Macrophages from Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells: *Ex Vivo* Models of X⁰-Linked, AR22⁰- and AR47⁰- Chronic Granulomatous Diseases.

Brault J, Goutagny E, Telugu N, Shao K, Baquié M, Satre V, Coutton C, Grunwald D, Brion JP, Barlogis V, Stephan JL, Plantaz D, Hescheler J, Krause KH, Šarić T, Stasia MJ. (2014). *BioResearch Open Access*.3(6):311-326.

La Granulomatose Septique Chronique est une maladie génétique de l'immunodéficience innée rare et sévère dans laquelle la répétition des épisodes infectieux peut entraîner l'apparition de comorbidités très invalidantes chez les patients si la prophylaxie antibactérienne et antifongique est inefficace. De plus, même si la transplantation de moelle osseuse a pu guérir définitivement certains patients, la difficulté d'avoir un donneur compatible et le terrain souvent infectieux et inflammatoire des patients sont des freins à cette thérapie. La thérapie génique est un traitement actuellement en cours d'évaluation et, pour l'instant, la sécurité, l'efficacité et le prix de ce traitement en empêchent son utilisation en clinique chez l'Homme (cf Chapitre I).

Pour développer de nouvelles approches thérapeutiques ou améliorer les techniques de thérapie génique, il faut disposer de modèles cellulaires pertinents. Les modèles cellulaires disponibles jusqu'à présent comme les cellules PLB-985, les lymphocytes B ou les cellules progénitrices CD34⁺ issues de patients, se sont révélés utiles pour les premiers essais de thérapie génique mais ils restent imparfaits et/ou ne permettent pas de modéliser toutes les formes génétiques de la CGD. En 2011, avec l'émergence de la technologie des cellules iPS et leur potentiel pour le développement de modèles physiopathologiques, cette technologie nous a semblé très pertinente pour développer de nouveaux modèles cellulaires de la CGD (cf Chapitre II). Son intérêt dans le cadre de la CGD pour la modélisation et/ou le développement de nouvelles thérapeutiques avait été démontré par deux équipes qui ont produits des neutrophiles CGDX à partir de cellules iPS issues de patients CGDX et de souris *KO* CGDX (Mukherjee et al., 2011; Zou et al., 2011b). **Notre objectif était donc de créer des modèles cellulaires de neutrophiles et de macrophages humains modélisant la forme génétique CGDX, la forme la plus fréquente, mais également les formes autosomiques récessives CGDAR22 et CGDAR47.** Cet article décrit ainsi notre protocole optimisé pour la production de cellules phagocytaires matures modélisant trois formes génétiques de la CGD.

La première étape du projet a consisté à mettre en place la technique de culture des cellules souches iPS dans le laboratoire et à réaliser leur caractérisation morphologique, phénotypique et génétique. Deux clones pour chacune des 4 lignées de cellules iPS (WT, CGDX, CGDAR22 et CGDAR47)

ont été analysés. L'analyse de la pluripotence par cytométrie en flux et microscopie confocale a montré que ces différents clones expriment les marqueurs de pluripotence membranaires SSEA-3, SSEA-4 et Tra-1-81 ainsi que les facteurs de transcription nucléaires Oct4, Sox2 et Nanog (Figure 1A). De plus, ils sont capables de former *in vitro* des corps embryoïdes constitués de types cellulaires dérivés des 3 lignées embryonnaires et mis en évidence en immunofluorescence par l'expression de marqueurs spécifiques de l'ectoderme (nestine et MAP-2), du mésoderme (α SMA et troponine I) et de l'endoderme (α FP et CD31) (Figure 1B). La mutation responsable de la pathologie chez chaque patient a bien été retrouvée dans leurs clones iPS respectifs après séquençage (Figure 2A). Pour finir, l'analyse du caryotype a montré qu'aucun des clones ne présentait d'anomalie génétique (Figure 2B). Pourtant, en CGH array, une technique plus résolutive que le caryotype, deux larges délétions télomériques dans le chromosome 18 de l'un des clones de la lignée CGDX ont été mises en évidence et nous ont conduit à l'éliminer du reste des expériences (Figure 2C).

Dans un second temps, nous avons optimisé le protocole de différenciation hématopoïétique pour produire des progéniteurs hématopoïétiques puis des cellules phagocytaires matures. La comparaison des différents protocoles issus de la littérature (Choi et al., 2009a; Mukherjee et al., 2011; Niwa et al., 2009; Yokoyama et al., 2009; Zou et al., 2011b) nous a conduit à privilégier l'approche publiée par Choi *et al.* qui induit la différenciation hématopoïétique grâce au système de coculture iPS/OP9. L'avantage majeur de ce protocole est, qu'en plus d'être efficace et peu coûteux, il permet ensuite d'obtenir des cellules matures neutrophiles et macrophages mais également éosinophiles et cellules dendritiques (Choi et al., 2009a, 2011). Nous avons optimisé ce protocole et montré que de grandes quantités de progéniteurs CD34⁺ (en moyenne $1,5 \times 10^5$ cellules CD34⁺ à partir de 1×10^6 cellules iPS) peuvent être obtenues après 10 jours de coculture iPS/OP9 (Figure 3D). Ces progéniteurs sont capables de donner naissance à des colonies hématopoïétiques après culture en méthylcellulose en présence de cytokines (test des CFC), et peuvent également être congelés sans perdre leur potentiel hématopoïétique (Figure 3B et C). Ils permettent alors la production de neutrophiles ou macrophages à la demande.

La différenciation terminale en neutrophiles à partir des cellules CD34⁺ isolées ou en macrophages matures à partir des cellules issues de la coculture iPS/OP9 J10 a été adaptée d'après celle décrite par Choi *et al.* (Choi et al., 2009a). Le rendement et la durée de différenciation ont été déterminés précisément : en moyenne $0,3 \times 10^5$ neutrophiles sont produits en 25 jours et 3×10^6 macrophages en 28 jours à partir de 1×10^6 cellules iPS. Nous avons ensuite caractérisé morphologiquement, phénotypiquement et fonctionnellement les neutrophiles et macrophages différenciés à partir des différentes lignées de cellules iPS.

Concernant la caractérisation des neutrophiles, nous avons pour la première fois mis en évidence la présence des 3 types de granules azurophiles, spécifiques et tertiaires par la détection directe de myéloperoxydase, lactoferrine et MMP9 respectivement (Figure 5). Pour les macrophages, l'analyse de l'expression de marqueurs de surface spécifiques par cytométrie en flux a montré que la population produite est pure et mature (CD14⁺, CD11b⁺ et CD45⁺), appartient en majorité au sous-type de macrophages M2c (HLA-DR⁻, CCR7⁻, MR⁺) et exprime les molécules de co-stimulation CD40, CD80 et CD86 impliquées dans la présentation de l'antigène (Figure 6B). De plus, plus de 80 % des macrophages sont capables de phagocyter des particules de *S. aureus* ou de zymosan opsonisé (ZOPS) fluorescents (Figure 6D). Pour finir, l'analyse des cytokines produites après stimulation par du LPS a montré leur capacité à produire des cytokines pro-inflammatoires (IL6 et IL8) et anti-inflammatoires (IL10) (Figure 6C).

Pour finir, nous avons confirmé le phénotype CGD dans ces cellules phagocytaires produites *in vitro* en montrant d'une part l'absence d'expression en cytométrie en flux des sous-unités NOX2 et p22^{phox} dans les formes CGDX et CGDAR22 alors qu'elles sont présentes dans la forme CGDAR47 (Figure 7A), et d'autre part l'absence de production de FRO après stimulation des cellules phagocytaires neutrophiles et macrophages issus de chacune des lignées CGD. L'analyse de l'activité NADPH oxydase a été réalisée par 3 techniques : le test NBT sur lame (Figure 7B), le test DHR par cytométrie en flux (Figure 7C) et la chimiluminescence (Figure 7D). Les techniques du test NBT et du test DHR, couramment utilisés pour le diagnostic biologique de la CGD, ont déjà été décrits en introduction. Quant à la technique de chimiluminescence, elle est particulièrement sensible et permet la détection des H₂O₂ intra- et extracellulaires. Le principe de ce test repose sur l'utilisation de luminol qui est oxydé par les H₂O₂ en présence de peroxydase (HRPO) puis retourne à son état fondamental en émettant des photons. Cette émission de lumière, quantifiée par un luminomètre, est proportionnelle à l'activité NADPH oxydase (Stasia et al., 2009). Cette technique apporte plus d'informations sur l'intensité et la cinétique de production des FRO dans les neutrophiles et les macrophages issus d'iPS WT. Elle montre notamment une production intense de FRO dans les neutrophiles avec les deux stimulateurs (PMA et ZOPS) mais également dans les macrophages stimulés avec du ZOPS. A l'inverse, les macrophages stimulés avec du PMA ont une production de FRO plus lente mais prolongée et moins intense que la stimulation avec le ZOPS (Figure 7D).

En conclusion, nous avons mis en place au laboratoire un protocole efficace et reproductible permettant l'obtention de neutrophiles et macrophages matures récapitulant parfaitement le phénotype des 3 formes génétiques CGDX, CGDAR22 et CGDAR47. Ces modèles pourront être utilisés pour des études physiopathologiques ainsi que pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques.

Optimized Generation of Functional Neutrophils and Macrophages from Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells: *Ex Vivo* Models of X⁰-Linked, AR22⁰- and AR47⁰- Chronic Granulomatous Diseases

Julie Brault,^{1,2} Erwan Goutagny,^{1,2} Narasimha Telugu,³ Kaifeng Shao,³ Mathurin Baquié,⁴
Véronique Satre,⁵ Charles Coutton,⁵ Didier Grunwald,⁶ Jean-Paul Brion,⁷
Vincent Barlogis,⁸ Jean-Louis Stephan,⁹ Dominique Plantaz,¹⁰ Jürgen Hescheler,³
Karl-Heinz Krause,⁴ Tomo Šarić,³ and Marie José Stasia^{1,2}

Abstract

Chronic granulomatous disease (CGD) is an inherited orphan disorder caused by mutations in one of the five genes encoding reduced nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate oxidase subunits, which subsequently lead to impairment in the production of microbicidal reactive oxygen species (ROS). In order to offer several cell line models of CGD and therefore support research on pathophysiology and new therapeutic approaches, we optimized protocols to differentiate induced pluripotent stem cells (iPSCs) from wild-type, X⁰-, AR22⁰- and AR47⁰-CGD patient's fibroblasts into neutrophils and into macrophages. Aberrant genetic clones were discarded after chromosome karyotyping and array-comparative genomic hybridization analysis. All remaining iPSC lines showed human embryonic stem cell-like morphology, expressed all tested pluripotency markers and formed embryoid bodies that contained cells originating from all three primary germ layers. Furthermore, each CGD patient-specific iPSC line retained the gp91^{phox}, p47^{phox}, and p22^{phox} mutations found in the corresponding patient's neutrophils. The average production of CD34⁺ progenitors was of 1.5 × 10⁶ cells after 10 days of differentiation of 10 × 10⁶ iPSCs. They were terminally differentiated into about 3 × 10⁵ neutrophils or into 3 × 10⁷ macrophages. Based on morphological, phenotypical, and functional criteria both phagocyte types were mature and indistinguishable from the native human neutrophils and macrophages. However, neutrophils and macrophages derived from X⁰-, AR22⁰-, and AR47⁰-CGD patient-specific iPSC lines lacked ROS production and the corresponding mutated proteins. To simplify the phagocytes' production upon request, progenitors can be cryopreserved. In conclusion, we describe a reproducible, simple, and efficient way to generate neutrophils and macrophages from iPSCs and provide a new cellular model for the AR22⁰-CGD genetic form that has not been described before.

Key words: induced pluripotent stem cells; chronic granulomatous disease; NADPH oxidase; reactive oxygen species; neutrophils; macrophages; disease model; NOX2; p47^{phox}; p22^{phox}

¹Techniques de l'Ingénierie Médicale et de la Complexité-Informatique, Mathématiques et Applications, Grenoble (TIMC-IMAG), Université Grenoble Alpes, Grenoble, France.

²Centre Diagnostique et Recherche sur la CGD (CDiReC), Pôle Biologie, ⁵Laboratoire de Génétique Chromosomique, Pôle Couple/Enfant, ⁷Service d'Infectiologie, Pôle Médecine Aigue et Communautaire, ¹⁰Département de Pédiatrie, Pôle Couple/Enfants; Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, Grenoble, France.

³Center for Physiology and Pathology, Institute for Neurophysiology, Medical Faculty, University of Köln, Köln, Germany.

⁴Department of Genetic and Laboratory Medicine, Department of Pathology and Immunology, Geneva University Hospital and Medical School, Geneva, Switzerland.

⁶Institut de Recherches en Sciences et Technologies pour le Vivant/Commissariat à l'Énergie Atomique, Grenoble, France.

⁸Service de Pédiatrie et Hématologie Pédiatrique, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille (AP-HM) – Hôpital de La Timone, Marseille, France.

⁹Service de Pédiatrie, Centre Hospitalier Universitaire de Saint-Etienne, Hôpital Nord, Saint-Etienne, France.

Introduction

IN 2006 THE YAMANAKA'S RESEARCH GROUP made a breakthrough discovery that added another dimension to the stem cell field.¹ They found that the introduction of four transcription factors (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, and *cMyc*) into murine fibroblasts using retrovirus forces them to acquire embryonic stem cell (ESC)-like properties, such as self-renewal and pluripotency. These cells, named induced pluripotent stem cells (iPSCs), were shown to be morphologically, molecularly, and functionally similar to ESCs. The next year, two groups generated the first iPSCs from human fibroblasts.^{2,3} Since then many types of somatic cells have been reprogrammed, including those from patients with different inherited disease types.⁴ In addition, reprogramming methods became more efficient, reproducible and enable generation of transgene-free iPSCs under xeno-free conditions, which is an important prerequisite for their potential clinical application.⁵ iPSCs can be differentiated into cells derived from the three embryonic germ layers (i.e., ectoderm, endoderm, and mesoderm) allowing the possibility to model diseases. iPSC-based disease models that closely recapitulate disease-specific phenotypes *in vitro* at the molecular and functional level were described for diverse inherited cardiovascular,⁶ hematopoietic,⁷ neurological,⁸ and metabolic diseases,⁹ most of which were monogenic. These patient-specific iPSC-based disease models have a great potential for investigation of disease pathophysiology *in vitro*, screening of new therapies or cell therapy applications with gene corrected cells.¹⁰

Chronic granulomatous disease (CGD) is a rare inherited immunodeficiency syndrome with an estimated prevalence of 1:250,000 in Europe.¹¹ CGD is characterized by recurrent and life-threatening infections in early childhood and is caused by mutations in one of the five genes encoding the proteins of the reduced nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate (NADPH) oxidase complex expressed in phagocytic cells (neutrophils, monocytes/macrophages) and responsible for the production of antimicrobial and antifungal reactive oxygen species (ROS). The two transmembrane subunits, gp91^{phox} (NOX2) and p22^{phox}, and the cytosolic components p40^{phox}, p47^{phox}, and p67^{phox} are encoded by the *CYBB*, *CYBA*, *NCF4*, *NCF2*, and *NCF1* genes, respectively. The X-linked gp91^{phox} and the autosomal recessive p47^{phox} deficiencies represent the most common genetic forms of CGD (70% and 25%, respectively).¹²⁻¹⁴ The main treatment is based on antibiotic and antifungal prophylaxis. At present, bone marrow transplantation is the only curative treatment proposed to the patients in case of a human leukocyte antigen-matched donor in the relatives. Gene therapy is still in development with variable results.^{15,16} However, reliable cellular models of different genetic forms of CGD that could be used to develop new therapeutic approaches or study the pathophysiology of this disorder are missing. The only cell-based model mimicking the X-CGD are the knockout PLB-985 cells for the *CYBB* gene encoding gp91^{phox}. These cells can be differentiated into phagocytes.¹⁷

The feasibility to generate phagocytic cells from normal human iPSCs was first demonstrated by Slukvin's group in 2009.¹⁸ After description of iPSCs derived from X-CGD mouse fibroblasts¹⁹ Zou et al. reported in 2011 for the first time the generation of human X⁰-CGD neutrophils from iPSCs derived from human mesenchymal stromal cells.²⁰

They succeeded to rescue the oxidase-deficiency phenotype of CGD iPSC-derived neutrophils with a zinc finger nuclease-mediated safe harbor targeting approach. One year later, AR47⁰- and two X-CGD mature monocytes/macrophages were produced from iPSCs and shown to be similar to blood-derived cells from CGD patients.²¹ Both obtained their phagocytic cells by hematopoietic differentiation of embryoid bodies (EBs) generated from iPSCs.^{20,21} Hematopoietic differentiation of iPSCs can be induced directly from EBs or from coculture with stromal cells, such as OP9 cells.¹⁸ Then production of mature macrophages was achieved in a feeder-free system,²¹ while mouse and human neutrophils were generated in coculture with OP9 cells.^{19,20}

The objectives of this study were (1) to elaborate a simple and unique protocol for the induction of hematopoiesis in order to generate unlimited quantities of neutrophils or macrophages from CGD patient-specific iPSCs, with the same genotypic and phenotypic characteristics as the original phagocytic cells of the patient; and (2) to model three genetic forms of CGD including X⁰-linked, AR47⁰-CGD, and for the first time, the p22^{phox}-deficient form of CGD (AR22⁰-CGD). iPSC lines described in this study will allow for pathophysiological studies of these three CGD genetic forms by using mature CGD neutrophils or macrophages *ex vivo*, the screening of candidate drugs, and the development of new therapeutic approaches.

Materials and Methods

Ethics statement

Skin biopsies from X⁰-linked, AR22⁰, and AR47⁰-CGD patients were obtained after informed consent [Ethical permission Ref Comité de Protection des Personnes Sud-Est V (CPP): 09-CHUG-36, Ref Etude: FibroCGD, N° AFSSAPS: 2009-A00944-53].

Generation of human iPSCs and culture

Human dermal fibroblasts (hDFs) were isolated from the skin biopsy of CGD patients and cultured in fibroblast culture medium [Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)-glutamax supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% nonessential amino acids (NEAA), 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 100 µM β-mercaptoethanol (β-ME)]. All cell culture reagents mentioned in this chapter were purchased from Invitrogen, if not stated otherwise. Reprogramming of AR22⁰- and AR47⁰-CGD hDFs was performed using episomal vectors as previously described^{22,23} with minor modifications.

Briefly, 1 × 10⁶ hDFs were transfected with 2.5 µg of each of following episomal vectors: pCXLE-hOct3/4-shp53, pCXLE-hSox2-hKlf4, pCXLE-hLin28-hL-Myc (Addgene plasmid IDs: 27077, 27078, 27080, respectively) using NeonTM Transfection Device and a 100 µL Neon Tip according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). X⁰-CGD and wild-type (WT) iPSC lines were generated from the hDFs infected in a single experiment with equal amount of pMX-based retroviruses (Addgene) encoding the human transcription factors Oct3/4, Sox2, Klf4, and cMyc as described previously.²⁴ The iPSCs were maintained in an undifferentiated state on irradiated mouse embryonic fibroblasts (MEFs) in gelatin-coated wells with 1:1 DMEM: nutrient mixture F-12 (DMEM/F-12,) supplemented with 20% KnockOutTM Serum Replacement (KOSR), 8 ng/mL basic fibroblast growth factor (Miltenyi Biotec), 1%

NEAA, 2 mM L-glutamine and 100 μ M β -ME (Sigma-Aldrich), at 37°C in normoxic conditions and 5% CO₂. The iPSCs were passaged using 1 mg/mL collagenase-IV treatment onto new MEFs. MEFs were cultured in DMEM high glucose with 20% heat-inactivated (FBS), 1% NEAA, and 1% penicillin-streptomycin.

Formation of embryoid bodies

To induce the formation of EBs, undifferentiated iPSC colonies were harvested by treatment with collagenase-IV and dispersed by scraping to maintain the cells in small clumps. Then these clumps were transferred in a 10-cm Petri dish and cultured in static suspension in DMEM/F-12 supplemented with 20% KOSR, 1% NEAA, 2 mM L-glutamine and 100 μ M β -ME. The medium was changed every 3 days. After 21 days, EBs were plated and culture was continued for 14 days.

Induction of hematopoietic differentiation

The mouse bone marrow stromal cell line OP9 (ATCC® CRL-2749™) was maintained on gelatinized flasks in α -minimum essential medium (MEM) medium (Invitrogen) containing 20% non-heat-inactivated defined FBS Hyclone (ThermoFischer) and cells were plated at a density of 8×10^3 cells/cm². Hematopoietic induction was performed as previously described with slight modifications.²⁵ Briefly, 4 days after plating OP9 cells, iPSC colonies were harvested using 1 mg/mL collagenase-IV and small clumps were transferred onto OP9 cells. The differentiation culture medium consisted of α -MEM supplemented with 10% FBS Hyclone (ThermoFischer), 100 μ M monothioglycerol (MTG) (Sigma-Aldrich), and 50 μ g/mL ascorbic acid. The half medium of iPSCs/OP9 cocultures was changed on days 4, 6, 8, and 10. Cocultures were harvested at day 7, 10, or 13, and a single-cell suspension was prepared. Cells were washed with magnetic cell sorting (MACS) buffer (phosphate-buffered saline [PBS] with 5% FBS and 2 mM EDTA), filtered first through a 100- μ m and then a 40- μ m cell strainer (BD Biosciences) and used for flow cytometry, colony-forming cell assay, cell sorting, or further differentiations.

For some experiments, the single-cell suspension obtained from day 10 iPSCs/OP9 coculture was sorted after labelling with CD34 magnetic beads (Miltenyi Biotec) according to manufacturer's instructions. Viability and purity of the sorted CD34⁺ cells was determined by flow cytometry. They were used for further analysis, hematopoietic differentiation or were frozen in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) supplemented with 20% FBS and 10% dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich) and preserved in liquid nitrogen. Cryopreserved CD34⁺ cells were thawed at 37°C and transferred in 1 mL of prewarmed IMDM, 20% FBS during 10 min and then 9 mL of medium were added to dilute the DMSO further. Cells were centrifuged and maintained in 10 mL of the same medium during 1 h at 37°C before further experiments.

Terminal differentiation into mature neutrophils

According to our protocol CD34⁺ cells sorted from day 10 cocultures were maintained in suspension culture at a density of $3\text{--}5 \times 10^5$ cells/mL on poly-hydroxy-ethyl-methacrylate-coated (pHEMA, Sigma-Aldrich) 6-well plate for 4 days in IMDM supplemented with 20% FBS, 100 ng/mL stem cell fac-

tor, 100 ng/mL Flt3 ligand, 100 ng/mL interleukin (IL)-6, and 10 ng/mL thrombopoietin and 10 ng/mL IL-3. Then these cells were transferred onto fresh OP9 cells in six-well plates and the cytokines were replaced with 100 ng/mL granulocyte colony-stimulating factor alone for 11 days.^{20,25} All the cytokines were provided from Miltenyi Biotec. Following differentiation, floating cells were collected for further analysis.

Terminal differentiation into mature macrophages

This protocol was adapted from published protocols.^{21,25} Day 10 coculture-derived cells were cultured in suspension on pHEMA-coated T75 flasks in α -MEM containing 10% FBS Hyclone, 100 μ M MTG, and 200 ng/mL granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) for 8 days, with half medium changed every 3 days. Then the medium was changed for IMDM with 10% FBS and 20 ng/mL macrophage colony-stimulating factor (M-CSF). All the cytokines were provided from Miltenyi Biotec. After 3 days, cells were filtered through a 40- μ m cell strainer to eliminate aggregates and allowed to adhere onto 6- or 12-well plates in the same medium for 1 week, with half the medium changed after 3–4 days.

Colony forming unit assay

To determine the myeloid potential, CD34⁺ sorted cells were plated in methylcellulose medium containing cytokines for myeloid differentiation (StemMACS HSC-CFU media 130-091-277, Miltenyi Biotec). Colony forming units (CFUs) were scored based on their morphology after 7–14 days of incubation.

May-Grunwald-Giemsa staining

Cells were washed in PBS, cytospun (Cytospin 4, Thermo-Scientific), and stained with May-Grunwald-Giemsa (MGG). Slides were examined using a microscope (Nikon Eclipse TS1000), and images were acquired with a Nikon DS camera.

Alkaline phosphatase staining

Alkaline phosphatase activity was detected as previously described.²⁴ Colonies were photographed using the phase-contrast microscope Zeiss.

Immunofluorescence staining

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma) for 10 min, blocked with PBS, 5% bovine serum albumin, 5% goat serum for 10 min and permeabilized (if needed) with 0.25% Triton X-100 (Sigma). iPSC colonies were stained with the following conjugated antibodies: anti-Oct3/4 PerCP-cyanine5.5, anti-Sox2 AlexaFluor647 (AF647), and anti-stage-specific embryonic antigen-4 (SSEA-4) fluorescein isothiocyanate (FITC) all purchased from BD Biosciences. EBs were stained with anti-CD31-coupled phycoerythrin (PE) (BD Biosciences) or with the following primary antibodies from the Human Embryonic Germ Layer Characterization Kit (SCR030; Merck Millipore): anti-Nestin, anti- α -smooth muscle actin (α SMA), anti- α -fetoprotein (α FP), anti-microtubule-associated protein 2 (MAP2), and anti-cardiac troponin I. Alexa fluor 488 (AF488)-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) or anti-mouse IgG (Invitrogen) were used as secondary antibodies. Nuclei were stained with Hoechst 33258 1 μ g/mL (Sigma). Images were acquired using either

a confocal laser-scanning microscope (TCS-SP2; Leica) or a fluorescence microscope (Olympus) and analyzed with ImageJ software.

Flow cytometry analysis

Cells were suspended in fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer (PBS, 2% FBS, 2nM EDTA, 0.05% NaN₃) and stained with following conjugated antibodies all purchased from BD Biosciences excepted when stated otherwise: Vioblue[®]-conjugated anti-CD34 (Miltenyi Biotec); human leukocyte antigen-DR (HLA-DR) (Beckman Coulter), PE-conjugated anti-SSEA-3, Nanog, CD14, CD80 (Beckman Coulter), FITC-conjugated SSEA-4, CD11b, CD43, CD86 (Beckman Coulter), C-C chemokine receptor 7 (CCR7) (Beckman Coulter), allophycocyanin-conjugated anti-CD45, mannose receptor (MR) (Beckman Coulter), CD40 (Beckman Coulter), PerCP-cyanine5.5-conjugated Oct3/4, AF488-conjugated Tra-1-85 (Millipore), AF647-conjugated anti-Sox2, and Tra-1-81. Unconjugated antibody 7D5 directed against an external epitope of flavocytochrome *b₅₅₈* (D162-3; Clinisciences) and anti-p22^{phox} (clone 44.1; Tebu Bio) with secondary antibody conjugated with AF633 (Invitrogen) and PE (Beckman Coulter), respectively, were used for analysis of NADPH oxidase subunit expression.^{26,27} Control staining with appropriate isotype-matched control was included to establish thresholds for positive staining. Cell viability was determined by staining with 7-amino-actinomycin D (BD Biosciences). Cell fluorescence was quantified using a FACS Canto II (BD Biosciences). Data were collected and analyzed with the FACS DIVA software (BD Biosciences) and FlowJo software (Tree Star).

Myeloperoxidase activity in neutrophils

Myeloperoxidase staining was performed based on a previously published protocol.²⁸ Briefly, neutrophils were cyto-spun onto glass slides and were overlaid with a solution of benzidine (4,4'-diaminobiphenyl; Sigma-Aldrich) and sodium nitroprusside (Prolabo) for 3 min and then in the presence of H₂O₂ (Sigma-Aldrich) for 15 min. Slides were washed, dried, and stained with 20% Giemsa for 20 min. Images were acquired using a microscope Nikon Eclipse TS1000 equipped with a camera Nikon DS.

Transmission electron microscopy

Fixation of the membranes was performed by incubation in 2% glutaraldehyde in phosphate buffer for 1 h. The fixed tissue was washed three times with PBS, dehydrated in ethanol, embedded in epoxy resin, and processed for electron microscopy as described previously.²⁹ Sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and observed with a Technai 20 electron microscope (FEI, www.fei.com).

Exocytosis experiment

iPSC-derived neutrophils were pretreated with 0.25 mg/mL cytochalasin B (CB) for 7 min at 37°C prior to stimulation with 5 μM f-Met-Leu-Phe (fMLF) (Sigma-Aldrich) for 15 min at 37°C to induce degranulation. Supernatants (S) and pellets (P) of resting and CB/fMLF-stimulated cells were assayed for lactoferrin and gelatinase (MMP9). The release of lactoferrin was measured by enzyme-linked immu-

nosorbent assay (ELISA) kit using an anti-human lactoferrin antibody (Calbiochem No. 427275) according to the manufacturer's instruction. MMP9 release was determined by gelatin zymography, an electrophoretic method for measuring proteolytic activity as described previously.³⁰

Cytokine profile assay

Macrophages were stimulated for 24 h with 1 ng/mL lipopolysaccharides (LPS) from *Pseudomonas aeruginosa* (Sigma-Aldrich). The detection of 12 inflammatory cytokines was performed on cell media using a Multi-Analyte Profiler ELISArray[™] kit (MEM-004A, Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions.

Phagocytosis assay by flow cytometry

Macrophages were incubated with AF488 fluorescent head-killed particles of *Staphylococcus aureus* (Invitrogen) or with Zymosan particles isolated from *Saccharomyces cerevisiae* labeled with AF488 (Invitrogen) at a multiplicity of infection of 5:1. After 30 min at 37°C, the reaction was stopped by placing cells on ice.³¹ Cells were then analyzed by flow cytometry with a FACS Canto II (BD Biosciences), before and after adding 1 mg/mL trypan blue (Sigma Aldrich). Data were treated with FlowJo software (Tree Star).

Detection of reactive oxygen species produced by neutrophils or macrophages

Reactive oxygen species (ROS) production in phagocytic cells was measured by flow cytometry in presence of 0.5 μM dihydrorhodamine-1,2,3 (DHR) (Tebu Bio), by chemiluminescence in presence of luminol and horseradish peroxidase (HRPO) or by the nitro blue tetrazolium (NBT)-reduction test after opsonized latex beads phagocytosis as previously described.^{32,33}

Karyotyping

Chromosome karyotyping (R-banding) was performed for each iPSC line using a protocol kindly provided by Dr. Pellestor (Laboratoire de Génétique Chromosomique, CHU de Montpellier, France). iPSCs were incubated with KaryoMAX[®] Colcemid[™] (Invitrogen) at 0.1 μg/mL during 90 min at 37°C. Cells were harvested using TrypLE (Invitrogen) and washed with PBS-2% FBS. Hypotonic choc was obtained after 20 min incubation at 37°C with prewarmed 0.75M KCl and then stopped by adding cold fixation solution (methanol/ acetic acid 3:1 v/v) and placing the cells on ice for 4 min. Then, cells were fixed by repeating three cycles of mixing with the cold fixation solution followed by centrifugation. Cells were finally incubated for 1 h at -20°C, centrifuged, suspended in fixation solution, and stored at -20°C before analysis. A total of 20 metaphases were examined, five of them karyotyped using a microscope Zeiss and a MetaSystems Ikaros[®] karyotyping system.

Genomic DNA amplification and sequencing from iPSCs

To verify the genetic defects, exon sequences of the genes involved (*CYBA*, *CYBB*, and *NCF1*) were amplified by polymerase chain reaction using appropriate forward and backward primers³⁴ from genomic DNA purified from the iPSCs using a purification kit (FlexiGene DNA kit, Qiagen). They were then sequenced by Eurofins MWG Operon (Germany).

Array-comparative genomic hybridization

Array-comparative genomic hybridization (array-CGH) was performed using a 60,000-oligonucleotide microarray (Human Genome CGH Microarray Kit 60K, Agilent Technologies), following the manufacturer's instructions. The average spacing of the probes was 54 kb. DNA from the patient (or patient-derived iPSCs) was compared with a homemade reference DNA. Genomic Workbench software, standard edition 6.5 (Agilent) was used to interpret the results with the following parameters: aberration algorithm ADM-2, threshold 6.0, fuzzy zero, centralization, and moving average window 0.5–1 Mb. A copy number variation (CNV) was noted if at least three contiguous oligonucleotides showed an abnormal log₂ ratio (>+0.58 or <-1 according to the cyanin 5 deviation). Coordinates of all variations or probes are based on the University of California Santa Cruz (UCSC) GRCh37/hg19 assembly.^{35,36}

Statistical analysis

The nonparametric Wilcoxon signed rank test for paired samples was used to compare means for WT iPSC clones 3 and 4 and X⁰-CGD iPSC clones 1 and 6 across the time of hematopoietic differentiation. A two-way mixed model repeated measures analysis of variance followed by Tukey's post-hoc test was used for each marker separately to determine differences between days 7, 10, and 13. The normality was tested by Shapiro-Wilk test and normal quantile plots, and the equality of variance was tested by the use of Levene test. Results are therefore expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Statistical differences were considered to be significant after Tukey adjustment if $p \leq 0.05$. Statistical analysis were performed using SAS 9.3 (SAS Institute Inc.). Graphical representations were done with GraphPad Prism 5 software with data presented as the mean ± SEM. The statistical significances of the differences were evaluated by Student's *t*-test.

Results

Production and characterization of WT, X⁰-linked, AR22⁰-, and AR47⁰-CGD patient-specific iPSC lines

Two to three clones of each iPSC line were established from fibroblasts isolated from a healthy donor or three CGD patients suffering from different genetic types according to the procedures mentioned in "Material and Methods." All the AR22⁰-CGD iPSC colonies cultured in an undifferentiated state showed a specific hESC-like morphology, a high alkaline phosphatase activity, and the expression of pluripotency markers Oct4, Sox2, Nanog, SSEA-3, SSEA-4, and Tra-1-81 as determined by immunocytochemistry and/or flow cytometry (Fig. 1A). Furthermore, they formed EBs *in vitro* containing cells originating from the three germ layers (ectoderm, mesoderm, and endoderm) as shown by expression of lineage-specific markers (Fig. 1B). The same results were obtained from all the iPSC cell lines (WT, X⁰-CGD, and AR47⁰-CGD) (data not shown). They also retained the *CYBB*, *CYBA*, and *NCF1* mutations found in the patient fibroblasts (Fig. 2A) and exhibited normal karyotype (Fig. 2B).

Further analysis by array-CGH was performed on every clone to detect whether major chromosomal abnormalities or CNV were induced following iPSC reprogramming. Two

large telomeric deletions were found in the X⁰-CGD iPSC clone 7 that was excluded from further experiments (Fig. 2C). The first deletion is a 6.43-Mb loss extending from base pair 14,316 (first deleted oligonucleotide) to base pair 6,357,632 (last deleted oligonucleotide) (NCBI, hg 19) from the 18p telomere. The second is an 18.5-Mb deletion from base pair 59,481,918 (first deleted oligonucleotide) to 77,982,126 (last deleted oligonucleotide) from the 18p telomere. No other abnormalities were found in the other iPSC clones.

Induction of hematopoietic differentiation to generate CD34⁺ progenitors

An efficient hematopoietic differentiation of iPSCs can be induced by coculture with OP9 bone marrow mouse stromal cells.^{37,38} In order to optimize the timing for generation of CD34⁺ progenitor cells from iPSCs, kinetics of differentiation of X⁰-linked CGD and WT iPSC lines were analyzed by the disappearance of pluripotency markers and appearance of the hematopoietic marker CD34 using flow cytometry at day 7, 10, or 13 of coculture with OP9 cells (Fig. 3A). Expression of Tra-1-81 and SSEA-4 markers was markedly decreased at day 7, confirming the differentiated state of iPSCs at that time.

Undifferentiated iPSCs (day 0) did not express the hematopoietic markers CD34 (data not shown), but during the time course of OP9 coculture, the proportion of CD34⁺ cells significantly peaked at day 10 of differentiation for both the WT and X⁰-CGD iPSCs (Fig. 3A). Two different clones of the X⁰-CGD and WT-iPSCs were used and no significant difference in the timing of differentiation was observed. These preliminary results showed that the optimal production of CD34⁺ cells occurred at day 10 of coculture. Therefore, in all subsequent experiments, hematopoietic differentiation was terminated at that time. In order to ascertain their hematopoietic potential, CD34⁺ progenitors obtained at day 10 were subjected to the colony-forming cells (CFC) assay. CD34⁺ were sorted cells after labelling with CD34 magnetic beads and cultured in methylcellulose with hematopoietic cytokines. Under these conditions these cells gave rise to myeloid colonies with typical morphologies (CFU-granulocyte [CFU-G], CFU-macrophage [CFU-M], and CFU-GM), and MGG staining confirmed the identity of these colonies by the presence of mature neutrophils, macrophages or both cell types (Fig. 3B).

In order to save time for a rapid production of mature phagocytic cells upon request, we next tested the impact of freezing/thawing on CD34⁺ progenitors' ability. CFC assay was performed after freezing and subsequently thawing of the CD34⁺ progenitors and we demonstrated identical progenitor ability of the CD34⁺ cells before and after thawing (Fig. 3C). Moreover, the majority (85%–90%) of these CD34⁺ progenitors were CD43⁻ CD45⁻ (data not shown). Finally, the number of CD34⁺ cells obtained using this protocol was analyzed for the WT and the three CGD iPSC lines (X⁰-linked, AR22⁰-CGD, and AR47⁰-CGD). The average production of CD34⁺ cells was of 3.3×10^5 cells from 2×10^6 iPSCs per 75 cm² flask ($s^2 = 1.1 \times 10^5$, range of 1.8 – 5.4×10^5 cells in 32 independent cultures) (Fig. 3D) with a purity of sorting cells about 87.4% ($s^2 = 7.2\%$, range of 62.6%–96.7% in 32 independent cultures) and a cell viability of $79.3\% \pm 5.0\%$ as determined by trypan blue exclusion assay. These data confirmed that our selected protocol was able to generate

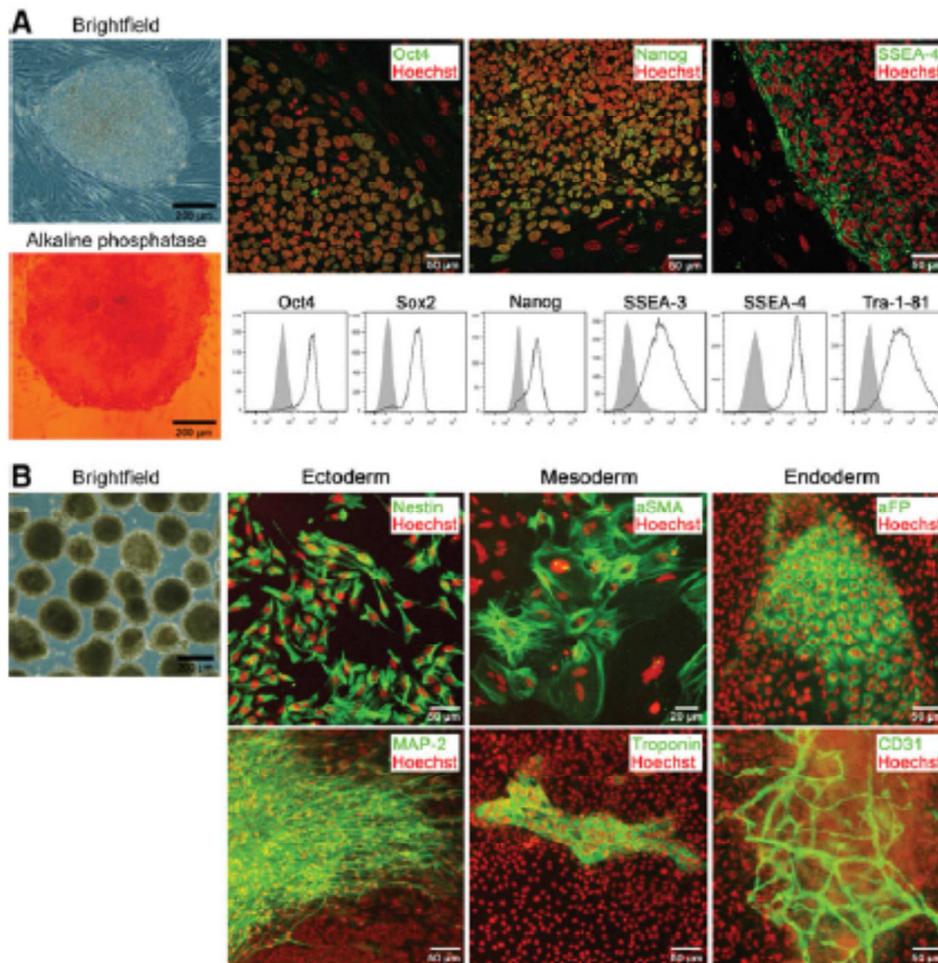


FIG. 1. *In vitro* characterization of induced pluripotent stem cells (iPSC) lines from AR22⁰-CGD (chronic granulomatous disease) patients. **(A)** Representative image of human embryonic stem cell (ESC)-like morphology of iPSC line. A high alkaline phosphatase activity in iPSCs is shown by phase-contrast microscopy (scale bars: 200 μ m). Immunofluorescence confocal images (*upper panel*) show the expression of pluripotency-associated transcription factors Oct4 and Nanog and the surface marker stage-specific embryonic antigen-4 (SSEA-4; in green) with nuclei counterstained with Hoechst in red (scale bars: 50 μ m). Fluorescence-activated cell sorting analysis reveals the expression of the transcription factors Oct4, Sox2, and Nanog, and the surface markers SSEA-3, SSEA-4, and Tra-1-81. Isotype controls are represented by gray-filled curves. These results are representative of 3 independent experiments. **(B)** Characteristic morphology of embryoid bodies (EBs) was assessed by phase-contrast microscopy (scale bar: 200 μ m). Immunofluorescence analysis of *in vitro* differentiated EBs demonstrates the expression of specific markers of the three embryonic germ layers: ectoderm (nestin and MAP2; green), mesoderm (α SMA and troponin; green) and endoderm (α -AFP; green; CD31; red). Nuclei were counterstained with Hoechst in red. Scale bars (20 μ m or 50 μ m) are shown on each panel.

a large number of CD34⁺ cells with myeloid differentiation potential, which is conserved even after sorting and thawing.

Successful differentiation of CGD iPSCs into mature neutrophils

Fifteen days after initiating the differentiation of sorted CD34⁺ cells into neutrophils using the protocol described in Fig. 4, floating cells were harvested and analyzed. Morphological analysis of AR22⁰-CGD iPSC-derived neutrophils by MGG staining and electron microscopy revealed that they looked similar to blood-derived neutrophils: they were characterized by a poly-segmented nucleus and the presence of different types of more or less dense granules that suggests the development of diverse populations of granules during matu-

ration (Fig. 5A). The average number of floating cells obtained from 1×10^6 CD34⁺ cells was 1.68×10^5 cells (range: 0.55 – 2.7×10^5 cells in 16 independent cultures). We chose to show the AR22⁰-CGD iPSC-derived neutrophils because this disease model has never been reported before. Similar data for maturation of neutrophils were also obtained from WT and other CGD-derived iPSC lines (data not shown). Based on their morphology after MGG staining, the purity of neutrophils was estimated to be around 50%–70% in neutrophil populations derived from all iPSC lines. Approximately 10% were monocytes/macrophages and 20%–40% were myeloid progenitor cells. The average yield of neutrophils was around 3×10^5 mature cells from 1.5×10^6 CD34⁺ cells (range: 6.0×10^4 to 0.72×10^5 cells in 16 independent cultures). The proportion of myeloperoxidase (MPO)-positive

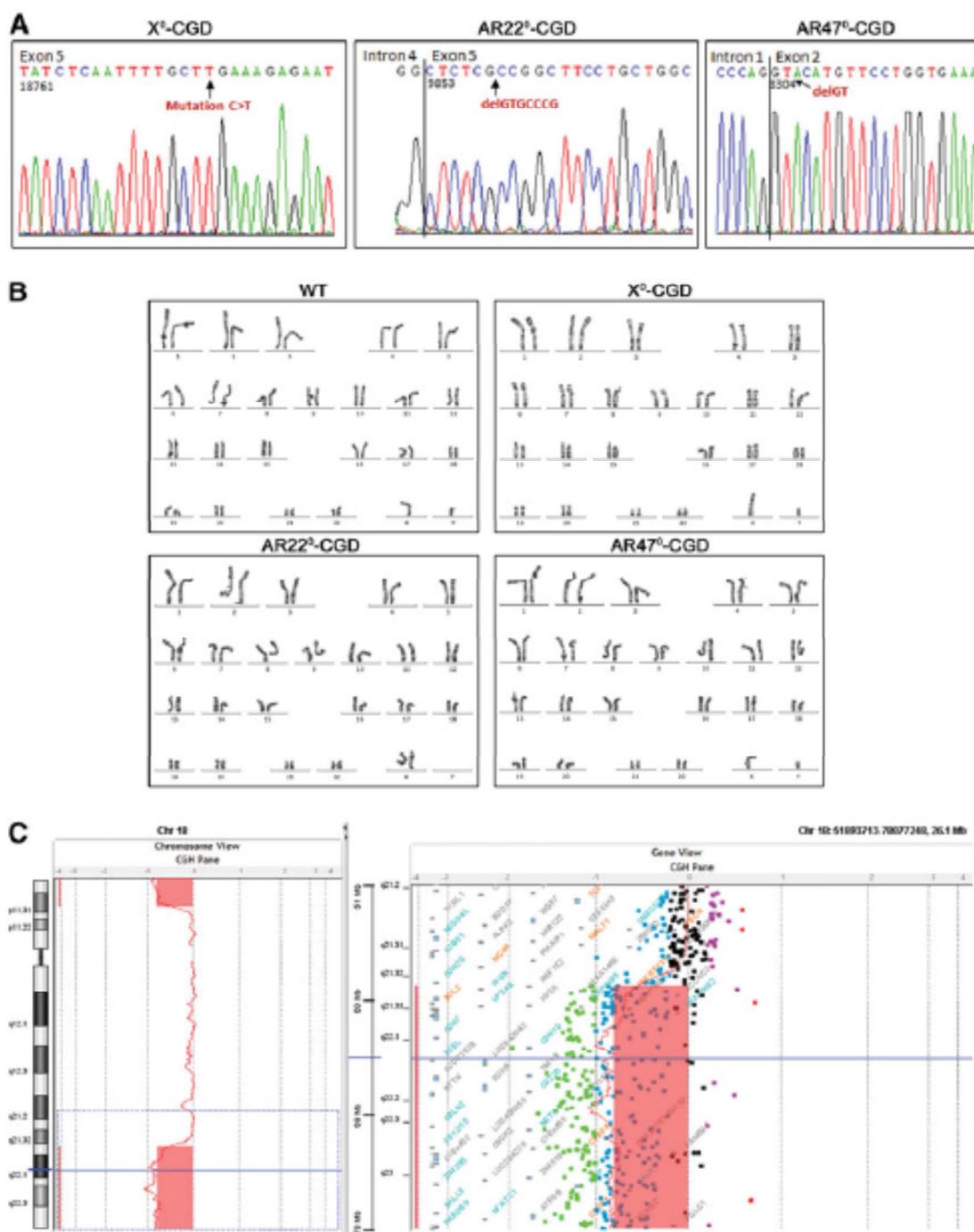


FIG. 2. Genetic characterization of iPSC lines from healthy and X⁰-linked AR22⁰- and AR47⁰-CGD patients. **(A)** Sequencing analysis confirms that CGD-iPSC lines retain the mutations of CGD patients. X⁰-linked CGD: c.469C>T nonsense mutation in exon 5 of *CYBB* gene leading to a stop codon TGA in the gp91^{phox} protein (p.Arg157X); AR22⁰-CGD: deletion of 7pb in exon 5 of *CYBA* gene (c.295_301delGTGCCCCG) leading to a premature stop codon in the p22^{phox} protein (p.Val99-ProfX90); AR47⁰-CGD: GT dinucleotide deletion at the beginning of the exon 2 of the *NCF1* gene (c.75_76delGT) leading to a premature stop codon in the p47^{phox} protein (p.Tyr26HisfsX26). **(B)** Karyotype analysis for wild-type (WT) and the three CGD-iPSC lines shows normal human karyotype (46XX or 46XY). **(C)** Array-comparative genomic hybridization (array-CGH) profile of chromosome 18 from X⁰-CGD iPSC clone 7 shows two large telomeric deletions (6.43 Mb and 18.5 Mb).

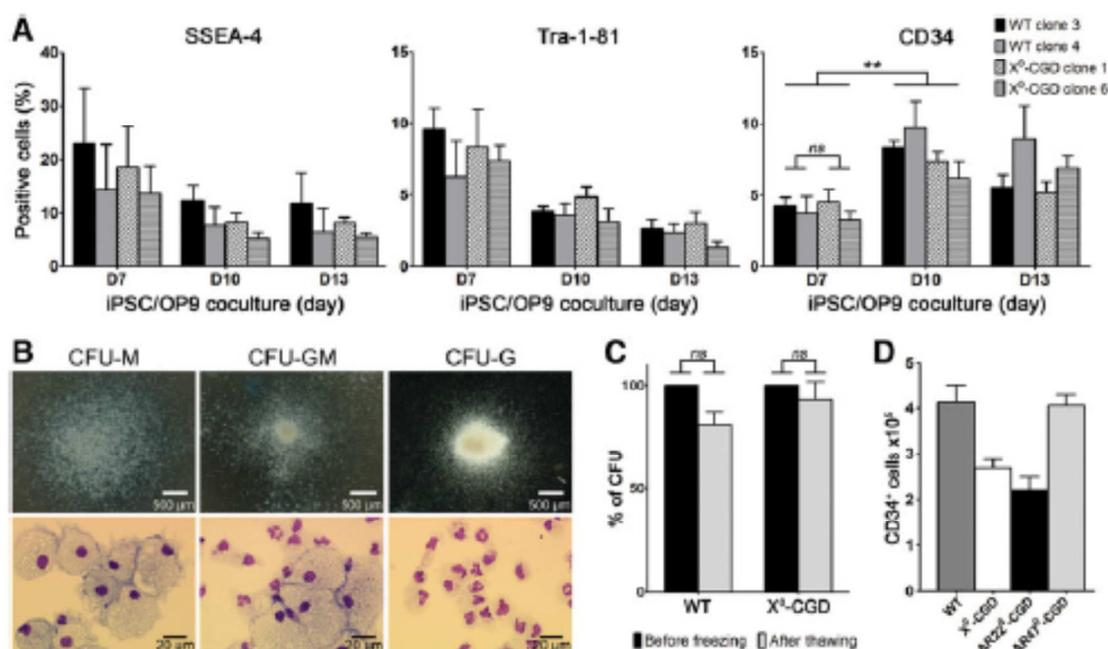


FIG. 3. Hematopoietic differentiation during WT and X⁰-CGD iPSC/OP9 coculture and generation of iPSC-derived CD34⁺ hematopoietic progenitors. **(A)** Kinetic analysis of the expression of pluripotency (SSEA-4 and Tra-1-81) and hematopoietic (CD34) markers during *in vitro* hematopoietic differentiation of iPSC/OP9 coculture (days 7, 10, and 13). Two clones for each iPSC cell line were used. Data represent means ± SEMs of $n=3$ for SSEA-4 and Tra-1-81 and $n=4$ for CD34; $**p < 0.01$. **(B)** Hematopoietic potential of CD34⁺ progenitors. Colony forming unit (CFU) assay performed on iPSC-derived CD34⁺ cells isolated from iPSC/OP9 coculture at day 10 shows representative myeloid colonies (CFU-M, -GM, and -G) generated after 14 days of incubation (scale bars: 500 μm) and May-Grunwald-Giemsa (MGG) staining of isolated cells from these colonies (scale bars: 20 μm). **(C)** Effect of freezing/thawing of CD34⁺ progenitors at day 10 on their hematopoietic differentiation potential. Results are expressed as percentage of CFU before freezing and after thawing of day 10 CD34⁺ cells. $n=4$; *ns*, nonsignificant. **(D)** Average yield of CD34⁺ cells sorted after 10 days of coculture of WT, X⁰-linked, AR22⁰-, and AR47⁰-CGD iPSCs with OP9 cells ($n=8$). Data represent means ± SEMs.

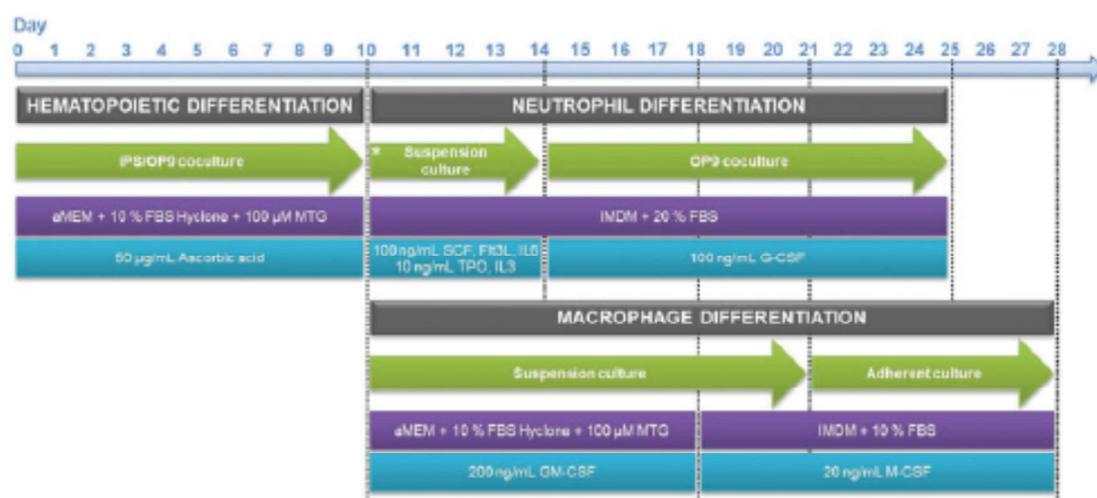


FIG. 4. Experimental design for the generation of mature neutrophils and macrophages from iPSCs. Schematic representation of the two-step protocol used to obtain CD34⁺ hematopoietic progenitors (D10) and further differentiation into mature neutrophils (D25) and macrophages (D28). White star (*) indicates that CD34⁺ progenitors were isolated from day-10 coculture by magnetic cell sorting. FBS, fetal bovine serum; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IL, interleukin; IMDM, Iscove's modified Dulbecco's medium; M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; MEM, minimal essential medium; MTG, monothioglycerol; SCF, stem cell factor; TPO, thrombopoietin.

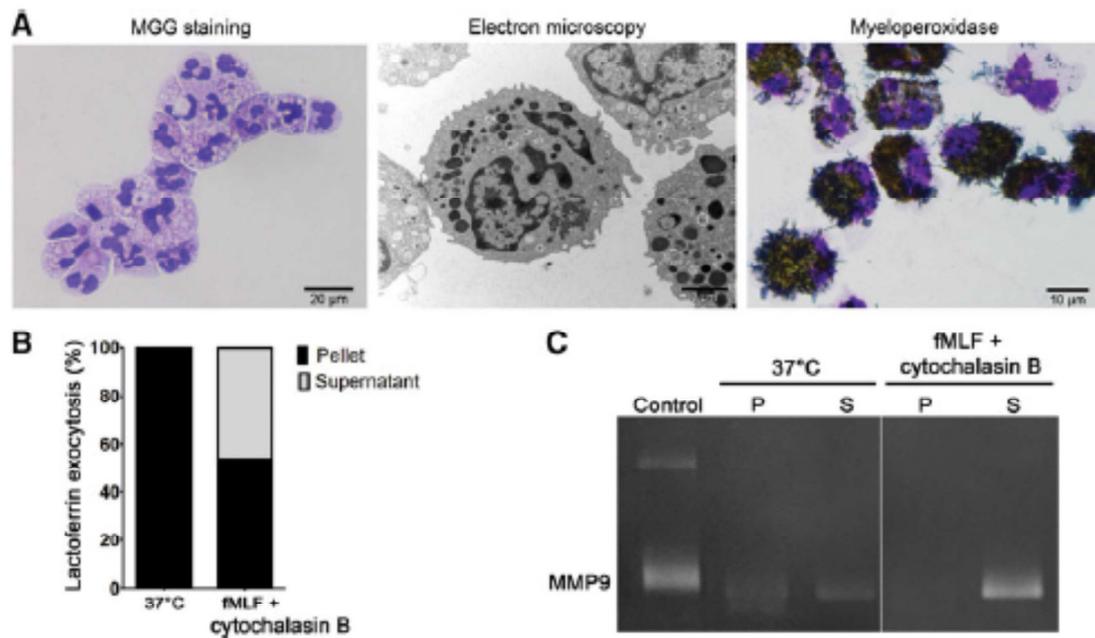


FIG. 5. Phenotypic characterization of AR22⁰-CGD iPSC-derived neutrophils. (A) Characteristic mature neutrophil morphology shown by MGG staining and electron transmission microscopy. Neutrophils have poly-segmented nuclei and different cytoplasmic granules (left and middle panels) and high myeloperoxidase activity revealed by enzymatic assay confirming the presence of primary granules (right panel). Scale bars (20 μm, 2 μm, and 10 μm) as shown on each panel. (B) Lactoferrin release from AR22⁰-CGD iPSC-derived neutrophils treated with cytochalasin B and activated with f-Met-Leu-Phe (fMLF) as described in "Material and Methods." Results are expressed as the percentage of lactoferrin present in the supernatant or in the pellet of unstimulated and fMLF-stimulated neutrophils and are representative of two independent experiments. (C) Gelatin zymography performed with the pellet (P) and the supernatant (S) of unstimulated and stimulated neutrophils. Areas of proteolytic activity appear as clear bands against a dark blue background where the gelatinase (MMP9) has digested the substrate. The gelatinolytic activity of purified MMP-9 as a control is shown on the first column. This result is representative of two independent experiments.

cells was scored and revealed that the AR22⁰-CGD iPSC-derived neutrophils contained MPO, confirming the presence of azurophilic granules in these cells (Fig. 5A).

To further characterize the functional phenotype of iPSC-derived neutrophils, we determined the nature of different subtypes of granules by measuring lactoferrin exocytosis and matrix-metalloprotease 9 (MMP9) activity after inducing the degranulation of neutrophils by fMLF stimulation in the presence of cytochalasin B. Lactoferrin and matrix-metalloprotease 9 (MMP9), markers of specific and tertiary granules, respectively, were readily detected in iPSC-derived neutrophils (Fig. 5B, C). Similar results were obtained with the WT and the two other CGD iPSC-derived neutrophils confirming normal degranulation activity and enzymatic content in all these cell populations (data not shown).

Successful differentiation of CGD iPSCs into mature macrophages

After macrophage differentiation as described above (Fig. 4), adherent cells showed a fibroblastoid appearance and process extension, which are morphological characteristics of mature macrophages. Moreover, MGG staining and electron microscopy showed that these adherent cells obtained after 28 days of differentiation were morphologically mature macrophages with a round nucleus and large vacuoles in the cytoplasm (Fig. 6A). The average production of macrophages was

around 3×10^7 mature cells from 10×10^6 iPSC cells (range: $1.2\text{--}12.3 \times 10^7$ cells in 12 independent cultures). Phenotypic analysis by flow cytometry confirmed that more than 90% of the adherent cells were CD11b⁺ CD14⁺ CD45⁺ cells (Fig. 6B). To further analyze the subtype of AR22⁰-CGD iPSC-derived macrophages, we measured by flow cytometry the expression of the human leucocyte antigen D-related (HLA-DR), the mannose receptor (MR, CD206), and the CC-chemokine receptor 7 (CCR7). This adherent population was predominantly positive for MR (80%–92%) and negative for both HLA-DR and CCR7 expression suggesting a M2c phenotype. Finally, we demonstrated that the AR22⁰-CGD macrophages expressed the antigen presentation co-stimulatory molecules CD40, CD80, and CD86 (Fig. 6B). Similar expression levels of these molecules were detected in the WT and the other CGD iPSC lines (data not shown).

Analysis of the inflammatory response of macrophages derived from WT iPSCs and X⁰-, AR47⁰-, and AR22⁰-CGD iPSC lines after LPS stimulation revealed that all these cells secrete IL-6, IL-8, and IL-10 into the medium supernatant while the rate of production of TNF α and GM-CSF was low and more dependent on the cell line (Fig. 6C). IL-8 was produced even in the unstimulated WT and CGD macrophages. After stimulation with either fluorescent bacteria (*S. aureus*) or yeast particles (opsonized zymosan from *Saccharomyces cerevisiae* [ZOPS]) all of the iPSC-derived macrophages demonstrated phagocytosis ability (Fig. 6D).

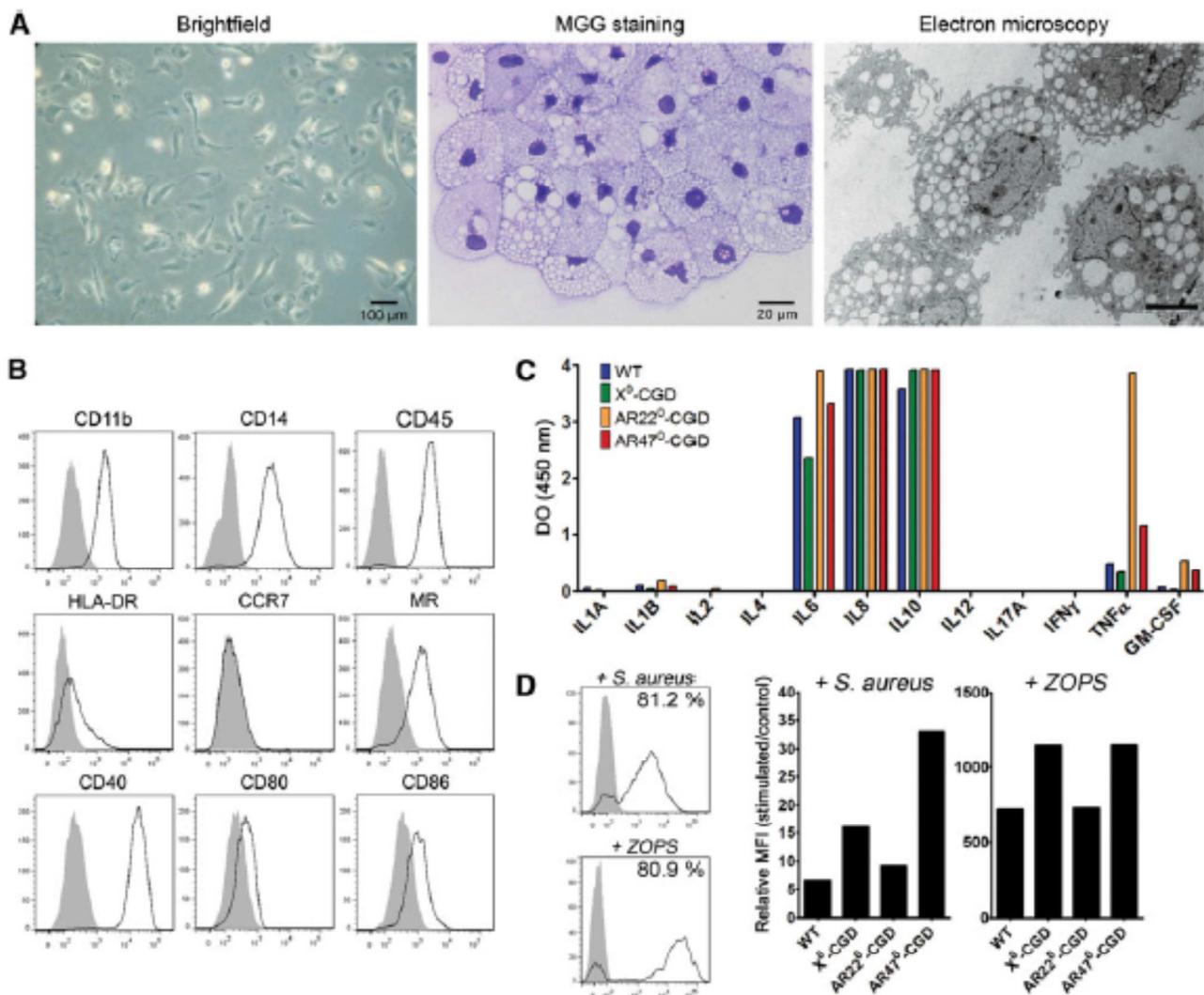
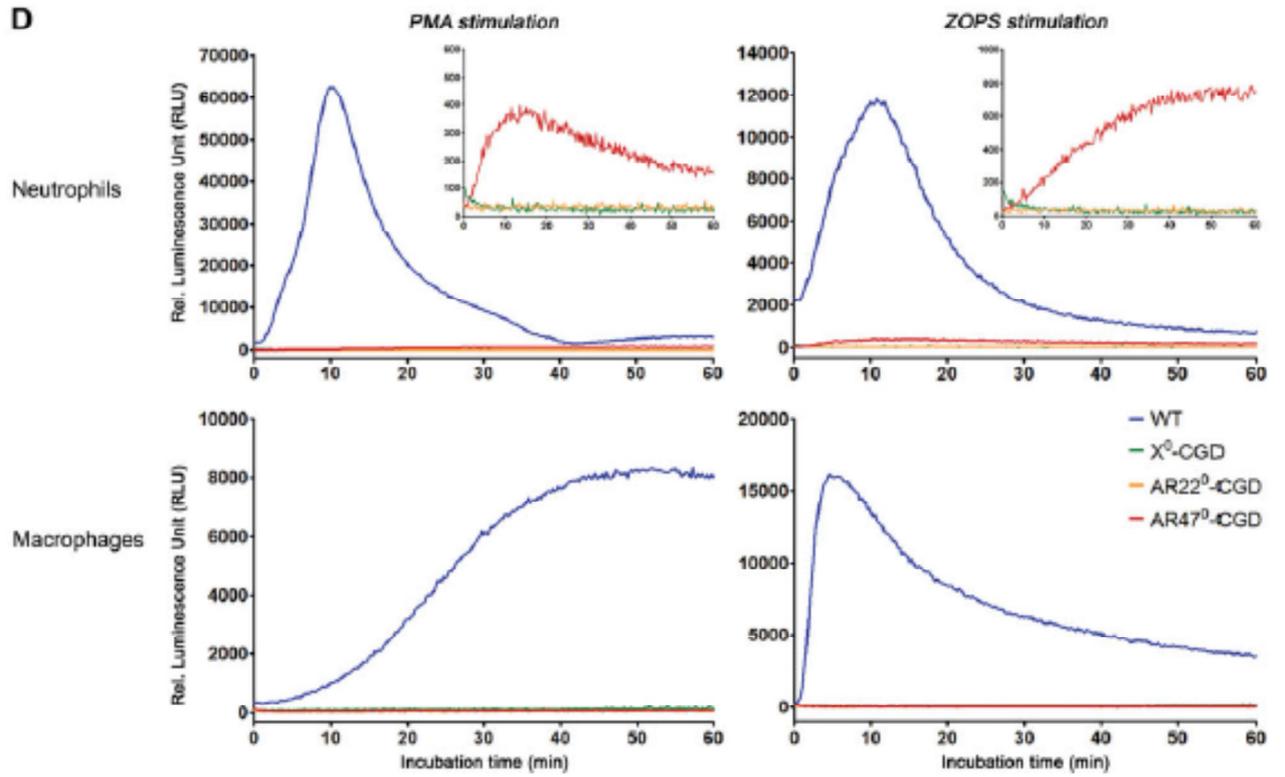
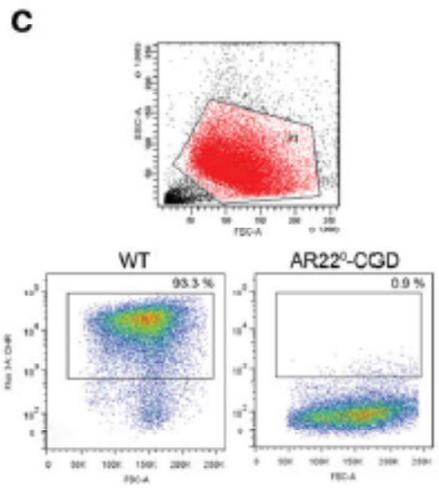
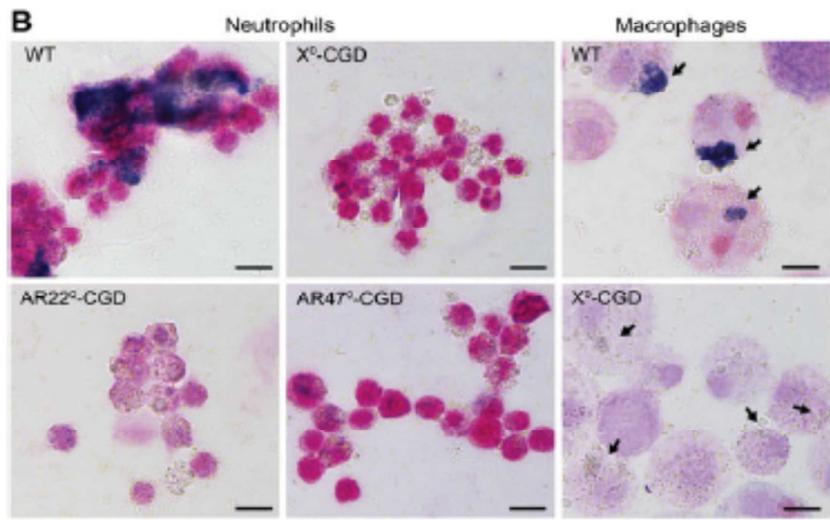
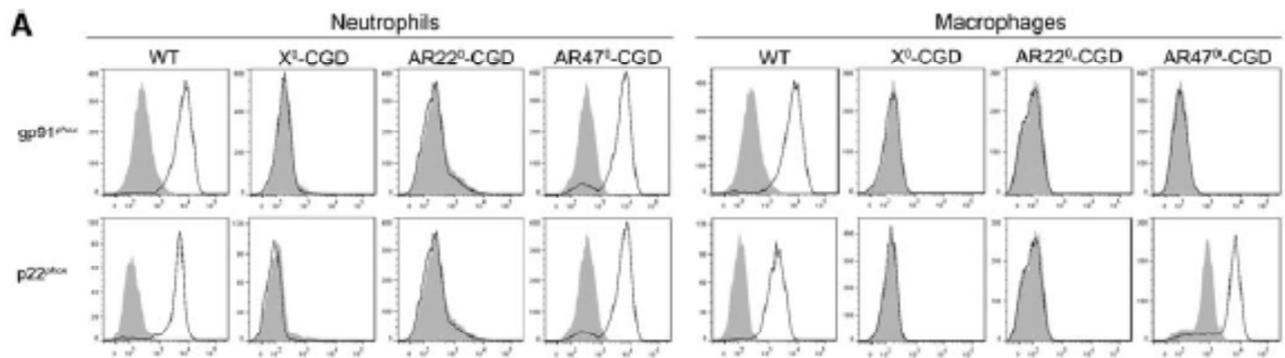


FIG. 6. Phenotypic characterization of iPSC-derived macrophages. **(A)** Morphology of adherent cells obtained after 28 days of differentiation, MGG staining, and electron transmission microscopy showing the characteristic morphology of AR22⁰-CGD iPSC-derived macrophages with round nucleus and cytoplasmic vesicles. Scale bars (100 μ m, 20 μ m, and 5 μ m) are shown in each panel. **(B)** Phenotypic analysis by flow cytometry of adherent AR22⁰-CGD iPSC-derived macrophages stained with antibodies specific for CD11b, CD14, CD45, HLA-DR, CCR7, MR, CD40, CD80, and CD86 or isotype-matched controls (gray fill); these results are representative of two experiments. **(C)** Cytokine profiles of WT and CGD iPSC-derived macrophages activated for 24 hours with 1 ng/mL lipopolysaccharides (LPS). Measurement of cytokine production is performed in supernatant using a Multi-Analyte Profiler ELISArray™ kit. **(D)** Phagocytosis experiments of fluorescent *Staphylococcus aureus* or zymosan particles by WT and CGD iPSC-derived macrophages. Results are expressed as the mean fluorescence intensity ratio of stimulated and unstimulated macrophages (right panels) as determined after flow cytometry (left panels) and are representative of two experiments.

FIG. 7. Functional characterization of neutrophils and macrophages derived from WT and CGD-iPSCs. **(A)** Expression of the NADPH oxidase subunits gp91^{phox} and p22^{phox} in neutrophils and macrophages derived from WT and CGD-iPSC lines. Cells were incubated with the NOX2 monoclonal antibody 7D5 or the monoclonal antibody against p22^{phox} (clone 44.1) respectively, and then with a phycoerythrin-conjugated anti-mouse immunoglobulin G (IgG) (H+L). Mouse IgG1 isotype was used as an irrelevant monoclonal antibody. Results are representative of three independent experiments. **(B)** Nitro blue tetrazolium (NBT) reduction assay on opsonized latex beads-activated WT or CGD iPSC-derived neutrophils and macrophages ($n=2$). Reactive oxygen species (ROS)-mediated NBT reduction is shown as blue formazan precipitates in WT neutrophils and macrophages only (scale bars: 20 μ m). **(C)** Images of dihydrorhodamine-1,2,3 (DHR) dot plot showing ROS production by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-stimulated neutrophils derived from WT and AR22⁰-CGD-iPSCs. **(D)** Kinetics of H₂O₂ production measured by luminol-enhanced chemiluminescence assay during 60 min after stimulation of WT and CGD neutrophils (upper panels) or macrophages (lower panels) with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) or opsonized zymosan (ZOPS) particles. Inserts represent enlargement of the Relative Luminescence Unit Scale for neutrophils. Results are representative of three independent experiments.



iPSC-derived neutrophils and macrophages as in vitro models of three CGD forms

Expression analysis of gp91^{phox} and p22^{phox}, the two transmembrane subunits of the NADPH oxidase complex, was performed by flow cytometry in WT and all the CGD phagocytes. Both subunits were absent in AR22⁰-CGD and X⁰-linked CGD neutrophils and macrophages but present in AR47⁰-CGD neutrophils and macrophages (Fig. 7A). Then, the capacity of phagocytic cells to produce ROS after soluble or particulate stimuli activation of the NADPH oxidase was evaluated by different methods. The WT and CGD neutrophils and macrophages were able to phagocyte opsonized latex beads but the purple formazan from the NBT reduction was only visible in the WT iPSC-derived phagocytes (Fig. 7B). These results were confirmed in the DHR assay by the absence of ROS production in the phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-stimulated CGD neutrophils (Fig. 7C) and by chemiluminescence in both neutrophils and macrophages upon PMA or ZOPS stimulation (Fig. 7D). WT phagocytic cells showed a high ROS production, but with distinct kinetics depending on the cell and the stimuli types.

First ROS production was rather similar in the WT neutrophils and macrophages for ZOPS stimulation. PMA induced a higher stimulation than ZOPS in the neutrophils whereas it was the contrary in the macrophages. In addition, there was a striking difference in the kinetics of ROS production after ZOPS stimulation between neutrophils and macrophages, with macrophages exhibiting more prolonged ROS production after yeast phagocytosis than neutrophils. Finally, a weak ROS production was detected in AR47⁰-CGD neutrophils compared with the other types of CGD neutrophils after PMA and ZOPS stimulation (Fig. 7D). These results demonstrate that mature neutrophils and macrophages differentiated from all the CGD iPSCs reproduce the expected pathognomonic CGD cellular phenotype.

Discussion

In this study we describe for the first time the establishment of *in vitro* models of three genetic forms of CGD (i.e., X⁰-linked, AR47⁰, and AR22⁰) using patient-specific iPSCs obtained from human dermal fibroblasts. First, we performed both karyotyping and array-CGH assay to detect genomic aberrations in iPSC lines in order to discard aberrant clones. No abnormalities were found by karyotyping. However, two large telomeric duplications in an X⁰-CGD clone were detected by array-CGH, which has a higher resolution than karyotype. In previous studies reporting the modeling of CGD from iPSCs, only karyotype was performed.^{19–21} Then we checked that the mutations detected in the CGD patients were also found in iPSCs. The non-sense mutation 469C>T in exon 5 of *CYBB* leading to p.Arg157X in gp91^{phox}, which is a relatively common mutation as seen in Roos et al.¹² was successfully modelled. In addition, the *CYBA* mutation, a rare deletion c.295_301 delGTGCCCG found in exon 5, was reproduced in iPSCs and derived phagocytes.

We have to underline that the AR22⁰-CGD form has not been modelled until now. The first human X-CGD form was modeled in 2011 by Zou et al. They produced neutrophils carrying a non-sense 458T>G mutation that is very close to our mutation.²⁰ One year later, two other X-linked mutations were modelled in macrophages using patient-specific iPSC cells.²¹

Our third iPSC cell line is derived from a patient carrying the most frequent mutation (of more than 300 mutations listed¹³), c75_76delGT in *NCF1* leading to the p.Tyr26HisfsX26 defect in p47^{phox} and representing 95% of the AR47-CGD. The novelty is not only that we succeeded to model the AR22⁰-CGD genetic form for the first time but also we managed to produce neutrophils and macrophages in parallel from the same pool of CD34⁺ precursors using a simple, reproducible, and cheap protocol based on previous published work.^{20,21,38}

Our choice of an efficient protocol for the production of both neutrophils and macrophages was guided by constraints of time, ease, differentiation, efficiency, and financial considerations. Hematopoietic differentiation was first described on mouse and human ESCs for the production of mature neutrophils and macrophages and then applied on iPSCs.^{39–43} It was generally induced either through a first step of EB formation^{20,21,39,41–45} or by a coculture of iPSCs with murine stromal OP9 cell lines.^{18,19,25,46} The first step of our protocol was performed by inducing hematopoietic differentiation using iPSC/OP9 coculture system as previously described.²⁵ What is new is that we specified the production yield at each step of differentiation. Indeed, we succeeded in producing a high amount of CD34⁺ progenitors (about 1–2.5 × 10⁶ cells from 10 × 10⁶ iPSCs, so several millions can be easily obtained by upscaling the culture conditions).

We have no comparison to data published by others, because quantitative data for the amount of precursors generated are rarely reported in the literature, especially from iPSC differentiation to obtain phagocytes. In addition, we characterized these CD34⁺ precursors and found that they were mainly CD45⁺ and CD43⁺ (data not shown). We suppose that they are earlier hematopoietic progenitors than those produced by Choi et al.¹⁸ Then we demonstrated for the first time that they conserved their hematopoietic potential toward myeloid lineage during freezing and thawing. This is an important point that simplifies the production of phagocytes. This first step was common for neutrophil and macrophage production and based on the simplification of Choi et al. differentiation protocol.¹⁸ Contrary to Choi and collaborators, we did not isolate our cells by Percoll gradient, and we performed a CD34⁺ cell sorting for neutrophil generation only.

We employed two different protocols to generate neutrophils and macrophages in parallel from the same pool of CD34⁺ hematopoietic precursors. In comparison with other differentiation protocols that produced iPSC-derived neutrophils with only 30%–40% purity,^{20,44} we improved the neutrophil purity to 50%–70%. We also quantified precisely the differentiation efficiency, a parameter not described before. Routinely from 5 million CD34⁺ progenitors, about one million neutrophils could be easily generated. However, it seems to be easier to generate a large amount of neutrophils from ESCs compared with iPSCs.^{39,40} A second point to underline is that our culture duration for mature neutrophil generation was 2–5 days shorter (25 days) than other protocols.^{20,44} However, quantitative analysis of neutrophils produced showed that the yield of neutrophil differentiation compared to the input number of CD34⁺ cells remains low. Attempt to expand the CD34⁺ population was without success.

Macrophage generation from human iPSCs was easier than differentiation of neutrophils. In our protocol, cells were not CD34⁺ sorted after the 10 days of hematopoietic differentiation. Short-term differentiation of coculture-derived cells into

multipotent myeloid progenitors as proposed by Choi et al. were sufficient to generate monocytes.²⁵ In our hands, a last step of adherence was necessary for terminal maturation and to improve the production yield and the purity.^{21,45,47,48} Indeed, we succeeded to produce three billion pure (>90%) macrophages from ten million of iPSCs. The only article describing monocytes/macrophages' generation from CGD patient-specific iPSCs was published by Jiang et al.²¹ and was based on EB differentiation as initially described by Karlsson et al. for ESCs.⁴² Although they seemed to generate several million monocytes reproducibly, the purity and number of macrophages obtained were not clearly reported.²¹ Two recent articles described an efficient but more expensive protocol for serum-free, feeder-free generation of monocytes/macrophages from iPSCs.^{45,48}

Neutrophils and macrophages produced from control and the three CGD iPSC lines by our protocols were fully phenotypically and functionally characterized. CGD iPSC-derived phagocytic cells were analyzed by electron microscopy and appeared morphologically similar to human blood-derived neutrophils and macrophages. The presence of three populations of granules in control and CGD neutrophils was confirmed by cytochemical characterization (MPO-primary granules) and, for the first time, by demonstration of normal degranulation after fMLF stimulation (lactoferrin-secondary granules and MMP9-tertiary granules). Thus, these control and CGD iPSC-derived neutrophils are closer to blood-derived neutrophils than the HL60 or the PLB-985 cell lines, which do not possess secondary and tertiary granules.^{49,50}

Concerning characterization of macrophages, we have not only analyzed the expression of the classical CD14, CD45, and CD11b antigen surface markers and costimulatory molecules CD40, CD80, and CD86, but we also determined the subtype of macrophages produced using a set of three cell markers: the mannose receptor (MR, CD206) expressed on professional phagocytic cells, major histocompatibility complex (MHC) class II cell surface receptor HLA-DR expressed on antigen presenting cells, and C-C chemokine receptor type 7 (CCR7, CD197) that was recently shown to be expressed on monocytes but only in the presence of the pro-inflammatory molecule PGE2.⁵¹ The majority of macrophages produced were HLA-DR⁻ CCR7⁻, and MR⁺, specific to the M2c subtype of macrophages, which are regulatory macrophages involved in immunosuppression and wound healing/tissue repair.⁵² Human GM-CSF/interferon γ polarizes monocytes toward the M1 macrophage subtype, whereas treatment with M-CSF/IL-4 polarizes them to M2 macrophages. Therefore, it is not surprising to obtain M2 macrophages in our study after a step of terminal maturation performed in presence of M-CSF. Furthermore, we analyzed the cytokine release and confirmed previous results showing the production of IL-8 in resting macrophages.²¹ In addition the production of IL-6, IL-8, IL-10, and TNF α were found in control and CGD iPSC-derived macrophages stimulated by LPS.^{21,42} Finally, phagocytosis experiments using particulate stimuli such as opsonized latex beads, *S. aureus* and zymosan showed that CGD iPSC-derived neutrophils and macrophages possessed a phagocytic potential comparable to those derived from WT iPSCs.

AR22⁰-CGD iPSC-derived neutrophils and macrophages were generated for the first time in this study. We demonstrated that both subunits gp91^{phox} and p22^{phox} were absent

in this cell line as well as in the X⁰-CGD, while they were present in the WT and the AR47⁰-CGD iPSCs. NBT test, fluorescent DHR, and the luminol-enhanced chemiluminescence assays showed that the phagocytic cells derived from the three CGD iPSC lines perfectly mimicked the oxidase-deficient phenotype as found in the original phagocytes from the CGD patients (data not shown). However, a residual activity was measured in the AR47⁰-CGD iPSC-derived neutrophils when assessed by chemiluminescence, which is a very sensitive assay. Indeed, residual NADPH oxidase activity in the AR47⁰-CGD patients' neutrophils are often described.⁵³ This proves that the AR47⁰-CGD iPSC-derived neutrophils we generated are close to the original blood-derived AR47⁰-CGD neutrophils.

Finally, we demonstrated that ROS deficiency does not have an effect on the kinetics and efficiency of hematopoietic differentiation by comparing the X⁰-CGD and the WT iPSC lines in our conditions. Moreover, the genetic defect does not interfere with the potential of CGD iPSCs to generate mature neutrophils or macrophages, as previously shown by others.¹⁹ Many studies are currently investigating the role of ROS during hematopoietic differentiation. Intracellular levels of ROS are strictly regulated in the bone marrow niche because thin balance is essential for maintenance of quiescence and self-renewal potential of hematopoietic stem cells as well as other functions such as survival/apoptosis, differentiation, and mobilization.^{54,55} Further analysis of the specific role of ROS deficiency on the hematopoietic differentiation should be conducted by characterizing more precisely the different maturation steps of the X⁰-CGD progenitors compared with the control cells and this, in both normoxia and hypoxia culture conditions.

In conclusion, the presented study aimed to establish an efficient, easy and reproducible protocol for generation of neutrophils and macrophages from iPSCs reprogrammed from patients carrying three genetic forms of CGD: X⁰-linked, AR47⁰-CGD, and for the first time, AR22⁰-CGD. These *in vitro* cellular disease models represent promising tools that can be used for elucidating the pathophysiology of CGD and development of new therapeutic approaches for this disease. Furthermore, p22^{phox}, p47^{phox}, and gp91^{phox} expressed in several tissues and organs such as the brain, the kidney, and the cardiovascular tissue render these CGD cellular models relevant for the study of several pathologies connected with the absence of these subunits in these tissues.⁵⁶

Acknowledgments

The work was supported by grants from Neurinox, European project, FP7—Theme 1 Health (2012–2015), Interreg France-Suisse (Programme de Coopération Territoriale Européenne, Fond Européen de Développement Régional (FEDER), 2013–2015). It was also supported by grants from Université Joseph Fourier Grenoble Alpes (AGIR program), the Medical School, and the Delegation for Clinical Research and Innovations (DRCI, Rementips project), Pôle Recherche, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Grenoble, Grenoble, France to J.B. and M.J.S; and the Köln Fortune Program (Medical Faculty, University of Köln, Germany) to T.S. We thank Charlotte Genestet, Sylvain Beaumel, Cécile Martel, and Michèle Molin for their enthusiasm at work at the Centre Diagnostic et Recherche Sur la CGD (CDiReC), Rebecca Dieterich (Institute for Neurophysiology, Cologne, Germany) for technical

assistance, Dr Franck Pellestor (CHU Montpellier, Laboratoire de Génétique Chromosomique) for the gift of the karyotyping protocol (personal communication), and Sébastien Bailly for the statistical analysis. Special thanks are extended to David Laurin for the irradiation of MEFs.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126:663–676.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131:861–872.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318:1917–1920.
- Park I-H, Arora N, Huo H, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*. 2008;134:877–886.
- González F, Boué S, Izpisua Belmonte JC. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming à la carte. *Nat Rev Genet*. 2011;12:231–242.
- Fatima A, Kaifeng S, Dittmann S, et al. The disease-specific phenotype in cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells of two long QT syndrome type 3 patients. *PLoS One*. 2013;8:e83005.
- Raya A, Rodríguez-Pizà I, Guenechea G, et al. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2009;460:53–59.
- Ross CA, Akimov SS. Human-induced pluripotent stem cells: potential for neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet*. 2014;23:R17–R26.
- Ordóñez MP, Goldstein LSB. Using human-induced pluripotent stem cells to model monogenic metabolic disorders of the liver. *Semin Liver Dis*. 2012;32:298–306.
- Robinton DA, Daley GQ. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*. 2012;481:295–305.
- Van den Berg JM, van Koppen E, Ahlin A, et al. Chronic granulomatous disease: the European experience. *PLoS One*. 2009;4:e5234.
- Roos D, Kuhns DB, Maddalena A, et al. Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (third update). *Blood Cells Mol Dis*. 2010;45:246–265.
- Roos D, Kuhns DB, Maddalena A, et al. Hematologically important mutations: the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease (second update). *Blood Cells Mol Dis*. 2010;44:291–299.
- Matute JD, Arias AA, Wright NAM, et al. A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40 phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity. *Blood*. 2009;114:3309–3315.
- Seeger RA, Gungor T, Belohradsky BH, et al. Treatment of chronic granulomatous disease with myeloablative conditioning and an unmodified hemopoietic allograft: a survey of the European experience, 1985–2000. *Blood*. 2002;100:4344–4350.
- Kang EM, Malech HL. Gene therapy for chronic granulomatous disease. *Methods Enzymol*. 2012;507:125–154.
- Zhen L, King AA, Xiao Y, et al. Gene targeting of X chromosome-linked chronic granulomatous disease locus in a human myeloid leukemia cell line and rescue by expression of recombinant gp91phox. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:9832–9836.
- Choi K-D, Vodyanik MA, Slukvin II. Generation of mature human myelomonocytic cells through expansion and differentiation of pluripotent stem cell-derived lin-CD34+CD43+CD45+ progenitors. *J Clin Invest*. 2009;119:2818–2829.
- Mukherjee S, Santilli G, Blundell MP, et al. Generation of functional neutrophils from a mouse model of X-linked chronic granulomatous disorder using induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE*. 2011;6:e17565.
- Zou J, Sweeney CL, Chou B-K, et al. Oxidase-deficient neutrophils from X-linked chronic granulomatous disease iPS cells: functional correction by zinc finger nuclease-mediated safe harbor targeting. *Blood*. 2011;117:5561–5572.
- Jiang Y, Cowley SA, Siler U, et al. Derivation and functional analysis of patient-specific induced pluripotent stem cells as an in vitro model of chronic granulomatous disease. *Stem Cells*. 2012;30:599–611.
- Okita K, Matsumura Y, Sato Y, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods*. 2011;8:409–412.
- Yu J, Chau KF, Vodyanik MA, Jiang J, Jiang Y. Efficient feeder-free episomal reprogramming with small molecules. *PLoS One*. 2011;6:e17557.
- Shao K, Koch C, Gupta MK, et al. Induced pluripotent mesenchymal stromal cell clones retain donor-derived differences in DNA methylation profiles. *Mol Ther*. 2013;21:240–250.
- Choi K-D, Vodyanik M, Slukvin II. Hematopoietic differentiation and production of mature myeloid cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*. 2011;6:296–313.
- Carrichon L, Piccicocchi A, Debeurme F, et al. Characterization of superoxide overproduction by the D-Loop(Nox4)-Nox2 cytochrome b(558) in phagocytes-Differential sensitivity to calcium and phosphorylation events. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1808:78–90.
- Burritt JB, Busse SC, Gizachew D, et al. Antibody imprint of a membrane protein surface. Phagocyte flavocytochrome b. *J Biol Chem*. 1998;273:24847–24852.
- Hattori K. An improved method of peroxidase reaction combined with Giemsa's stain for blood cells. *J Lab Clin Med*. 1958;51:829–834.
- Preynat-Seauve O, Suter DM, Tirefort D, et al. Development of human nervous tissue upon differentiation of embryonic stem cells in three-dimensional culture. *Stem Cells*. 2009;27:509–520.
- Trocme C, Gaudin P, Berthier S, et al. Human B lymphocytes synthesize the 92-kDa gelatinase, matrix metalloproteinase-9. *J Biol Chem*. 1998;273:20677–20684.
- Nuutila J, Lilius E-M. Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells. *Cytometry*. 2005;65:93–102.
- Defendi F, Decleva E, Martel C, Dri P, Stasia MJ. A novel point mutation in the CYBB gene promoter leading to a rare X minus chronic granulomatous disease variant - impact on the microbicidal activity of neutrophils. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1792:201–210.
- Piccicocchi A, Debeurme F, Beaumel S, et al. Role of putative second transmembrane region of Nox2 protein in the structural stability and electron transfer of the phagocytic NADPH oxidase. *J Biol Chem*. 2011;286:28357–28369.

34. Bakri FG, Martel C, Khuri-Bulos N, et al. First report of clinical, functional, and molecular investigation of chronic granulomatous disease in nine Jordanian families. *J Clin Immunol.* 2009;29:215–230.
35. Stasia MJ, Mollin M, Martel C, et al. Functional and genetic characterization of two extremely rare cases of Williams-Beuren syndrome associated with chronic granulomatous disease. *Eur J Hum Genet.* 2013;21:1079–1084.
36. Coutton C, Dieterich K, Satre V, et al. Array-CGH in children with mild intellectual disability: a population-based study. *Eur J Pediatr.* 2014. [Epub ahead of print]; DOI: 10.1007/s00431-014-2367-6.
37. Vodyanik MA, Bork JA, Thomson JA, Slukvin II. Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood.* 2005;105:617–626.
38. Choi K-D, Yu J, Smuga-Otto K, et al. Hematopoietic and endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells.* 2009;27:559–567.
39. Lieber JG, Webb S, Suratt BT, et al. The in vitro production and characterization of neutrophils from embryonic stem cells. *Blood.* 2004;103:852–859.
40. Saeiki K, Saeiki K, Nakahara M, et al. A feeder-free and efficient production of functional neutrophils from human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2009;27:59–67.
41. Yokoyama Y, Suzuki T, Sakata-Yanagimoto M, et al. Derivation of functional mature neutrophils from human embryonic stem cells. *Blood.* 2009;113:6584–6592.
42. Karlsson KR, Cowley S, Martinez FO, et al. Homogeneous monocytes and macrophages from human embryonic stem cells following coculture-free differentiation in M-CSF and IL-3. *Exp Hematol.* 2008;36:1167–1175.
43. Subramanian A, Guo B, Marsden MD, et al. Macrophage differentiation from embryoid bodies derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2009;4:29–45.
44. Morishima T, Watanabe K, Niwa A, et al. Neutrophil differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *J Cell Physiol.* 2011;226:1283–1291.
45. Wilgenburg B van, Brown C, Vowles J, Cowley SA. Efficient, long term production of monocyte-derived macrophages from human pluripotent stem cells under partly-defined and fully-defined conditions. *PLoS ONE.* 2013;8:e71098.
46. Anderson JS, Bandi S, Kaufman DS, Akkina R. Derivation of normal macrophages from human embryonic stem (hES) cells for applications in HIV gene therapy. *Retrovirology.* 2006;3:24.
47. Senju S, Haruta M, Matsumura K, et al. Generation of dendritic cells and macrophages from human induced pluripotent stem cells aiming at cell therapy. *Gene Ther.* 2011;18:874–883.
48. Yanagimachi MD, Niwa A, Tanaka T, et al. Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell-free conditions. *PloS One.* 2013;8:e59243.
49. Collins SJ, Gallo RC, Gallagher RE. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature.* 1977;270:347–349.
50. Tucker KA, Lilly MB, Heck L Jr, Rado TA. Characterization of a new human diploid myeloid leukemia cell line (PLB-985) with granulocytic and monocytic differentiating capacity. *Blood.* 1987;70:372–378.
51. Côté SC, Pasvanis S, Bounou S, Dumais N. CCR7-specific migration to CCL19 and CCL21 is induced by PGE2 stimulation in human monocytes: Involvement of EP2/EP4 receptors activation. *Mol Immunol.* 2009;46:2682–2693.
52. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004;25:677–686.
53. Köker MY, Camcıoğlu Y, van Leeuwen K, et al. Clinical, functional, and genetic characterization of chronic granulomatous disease in 89 Turkish patients. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132:1156–1163.
54. Sardina JL, López-Ruano G, Sánchez-Sánchez B, Llanillo M, Hernández-Hernández A. Reactive oxygen species: are they important for haematopoiesis? *Crit Rev Oncol Hematol.* 2012;81:257–274.
55. Urao N, Ushio-Fukai M. Redox regulation of stem/progenitor cells and bone marrow niche. *Free Radic Biol Med.* 2013;54:26–39.
56. Bedard K, Krause K-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007;87:245–313.

Address correspondence to:

Julie Brault, PharmD

Techniques de l'Ingénierie Médicale

et de la Complexité-Informatique

Mathématiques et Applications

Grenoble (TIMC-IMAG)

Université Grenoble Alpes

UMR CNRS 5525

Grenoble F-38000

France

E-mail: jbrault@chu-grenoble.fr

Marie José Stasia, PharmD, PhD

Techniques de l'Ingénierie Médicale

et de la Complexité-Informatique

Mathématiques et Applications

Grenoble (TIMC-IMAG)

Université Grenoble Alpes

UMR CNRS 5525

Grenoble F-38000

France

E-mail: mjstasia@chu-grenoble.fr

Abbreviations Used

α FP = anti- α -fetoprotein

α SMA = anti- α -smooth muscle actin

AF647 = AlexaFluor647

array-CGH = array-comparative genomic hybridization

CFU = colony forming units

CGD = chronic granulomatous disease

CNV = copy number variation

DHR = dihydrorhodamine-1,2,3

DMEM = Dulbecco's modified Eagle medium

DMSO = dimethylsulfoxide

EBs = embryoid bodies

ESC = embryonic stem cell

FACS = fluorescence-activated cell sorting buffer

FBS = fetal bovine serum

Abbreviations Used (Cont.)

FITC = fluorescein isothiocyanate fluorescein
fMLF = f-Met-Leu-Phe
GM-CSF = granulocytemacrophage colony-stimulating factor
hDFs = human dermal fibroblasts
HLA-DR = human leukocyte antigen-DR
HRPO = horseradish peroxidase
IgG = immunoglobulin G
IMDM = Iscove's modified Dulbecco's medium
iPSCs = induced pluripotent stem cells
KOSR = KnockOut™ Serum Replacement
LPS = lipopolysaccharides
MACS = magnetic cell sorting
M-CSF = macrophage colony-stimulating factor
MEF = mouse embryonic fibroblast

MEM = α -minimum essential medium
MGG = May-Grunwald-Giemsa
MMP9 = matrix-metalloprotease 9
MPO = myeloperoxidase
MR = mannose receptor
MTG = monothioglycerol
NADPH = nicotinamide-adenine-dinucleotidephosphate
NBT = nitro blue tetrazolium
NEAA = nonessential amino acids
PBS = phosphate-buffered saline
PE = anti-CD31-coupled phycoerythrin
pHEMA = poly-hydroxy-ethyl-methacrylatecoated
ROS = reactive oxygen species
S = Supernatants
SSEA-4 = anti-stage-specific embryonic antigen-4

Présentation de l'article 2

Successful proteoliposome-based therapy for X-linked Chronic Granulomatous Disease – Proof-of-concept using human macrophages differentiated from XCGD patient-specific induced pluripotent stem cells.

Brault J, Vaganay G, Cortes S, Stasia MJ. *Journal of Controlled Release*. (Article en rédaction)

La Granulomatose Septique Chronique est une enzymopathie génétique rare appartenant aux syndromes d'immunodéficiences innées qui affectent les enfants dès leur plus jeune âge. La forme de transmission principale est liée à l'X (70 % des cas) et est due à l'absence ou au dysfonctionnement de l'élément redox NOX2/p22^{phox} (cytochrome *b*₅₅₈ ou *cytb*₅₅₈) du complexe NADPH oxydase (cf Chapitre I). S'il existe des traitements alternatifs coûteux en développement, mais non sans risques, tels que la greffe de moelle allogénique ou la thérapie génique, le principal traitement actuel est la prophylaxie antibiotique et antifongique à vie. Cependant, ce traitement qui entraîne notamment des résistances à long terme s'est avéré inefficace (même en intraveineuse) devant des infections pulmonaires foudroyantes, première cause de décès de ces patients.

Nous nous proposons donc de développer un traitement par thérapie protéique, sous forme de liposomes NOX2/p22^{phox} recombinants pour restaurer la fonction de la NADPH oxydase des phagocytes des patients atteints de CGDX afin de lutter contre les agents pathogènes lors d'infections. Nous désirons apporter la preuve de concept de ce nouveau traitement qui pourrait, à terme, lutter rapidement et localement contre les infections pulmonaires par apport de proteoliposomes thérapeutiques sous forme de nébulisat par exemple.

La production de protéoliposomes ayant incorporé une forme tronquée de NOX2 et sa délivrance à des cellules de carcinome et HeLa a été faite en 2007 par notre équipe (Marques et al., 2007). Pour la première fois, des protéoliposomes ont été produits en une seule étape dans un système d'expression acellulaire basé sur le lysat bactérien d'*E. coli*. Cette technologie a fait l'objet d'un brevet international (WO 2008152262 A2) licencié à la start-up grenobloise Synthelis SAS. Le rationnel de la thérapie protéique par les protéoliposomes contenant NOX2 et p22^{phox} dans les formes CGDX (et aussi CGDAR22, non montré dans l'article) est donc évident : apporter ces sous-unités formant le *cytb*₅₅₈ au niveau de la membrane plasmique des phagocytes CGDX déficients afin d'induire la formation d'un complexe NADPH oxydase actif. Grâce au travail publié récemment (cf Article 1), nous sommes en possession des modèles cellulaires mimant les phagocytes des patients atteints de CGD, permettant de tester cette nouvelle forme de thérapie pour apporter la preuve de concept. Ainsi nous utiliserons les macrophages CGDX issus de la différenciation d'iPSCs de patients que nous pouvons produire à volonté.

Dans le cadre de ce projet, nous collaborons avec la start-up Synthelis SAS qui nous fournit des liposomes ayant intégré les deux sous-unités NOX2 et p22^{phox} capables de les « vectoriser » et de les incorporer dans des membranes plasmiques de cellules eucaryotes.

Cet article présente tout d'abord la technique de production des protéoliposomes mise en œuvre par la start-up Synthelis SAS (Figure 1). La composition du milieu réactionnel a été ajustée pour permettre la co-expression optimale de la forme entière de NOX2 avec son partenaire p22^{phox} (Figure 2). La présence de ces deux sous-unités a été démontrée par migration électrophorétique SDS-PAGE puis coloration au bleu de Coomassie et Western blot (Figure 3A). La taille apparente de NOX2 est de 55 kDa et celle de p22^{phox} est de 20-25 kDa, ce qui est conforme à la littérature (Parkos et al., 1987). Il est à noter que la préparation des protéoliposomes n'est pas pure et contient des contaminants bactériens. Les conditions du milieu réactionnel ont été optimisées pour induire l'incorporation des deux hèmes dans NOX2, essentiels à l'activité de l'enzyme (Biberstine-Kinkade et al., 2001; DeLeo et al., 2000). Le spectre différentiel du cytb₅₅₈ a confirmé l'intégration des hèmes grâce à la mise en évidence des deux principaux pics d'absorption aux longueurs d'onde 426 nm et 558 nm (Batot et al., 1998; Stasia et al., 2003) (Figure 3B). Les liposomes contenant le cytb₅₅₈ (0,14 μM à 426 nm) sont capables de reconstituer *in vitro* un complexe NADPH oxydase fonctionnel produisant des anions superoxydes lorsqu'ils sont incubés avec les facteurs cytosoliques de la NADPH oxydase en présence d'un agent activateur comme l'acide arachidonique après stimulation par du NADPH. La production de FRO a été mise en évidence par le suivi de la réduction du cytochrome c par détection spectrophotométrique et montre une activité oxydase des liposomes NOX2/p22^{phox} (4,42 nmoles de superoxydes/min/mg d'hèmes) supérieure à celles des liposomes négatifs (Figure 3C).

L'interaction des liposomes NOX2/p22^{phox} avec les macrophages CGDX⁰ issus des cellules iPS a montré que ceux-ci n'induisent aucune toxicité cellulaire (test de viabilité MTT) (Figure 4A). De plus, leur capacité à délivrer le cytb₅₅₈ a été mise en évidence par cytométrie en flux et microscopie confocale par la présence des sous-unités NOX2 et p22^{phox} au niveau de la membrane plasmique des macrophages après 24h d'incubation (Figure 4B et C). Cette restauration phénotypique s'accompagne d'une restauration de l'activité NADPH oxydase *in vivo*. En effet, le test NBT a montré que les macrophages CGDX⁰ incubés 24h avec les liposomes NOX2/p22^{phox} puis stimulés par un agent soluble, le PMA, étaient capables de produire des FRO alors que seule une activité oxydase résiduelle était visible dans les macrophages traités avec des liposomes négatifs (Figure 5).

En conclusion, nous faisons ici la preuve du concept de l'utilisation d'un système d'expression acellulaire pour la production rapide et peu coûteuse de protéoliposomes thérapeutiques. Ces protéoliposomes sont capables de délivrer un cytb₅₅₈ fonctionnel à la membrane de macrophages CGDX⁰ afin de restaurer une enzyme NADPH oxydase active et représentent donc une option thérapeutique innovante pour les patients atteints de CGDX.

**Successful proteoliposome-based therapy for X-linked Chronic Granulomatous Disease -
Proof of concept using macrophages differentiated from XCGD patient-induced pluripotent
stem cells**

J. Brault^{1,2}, G. Vaganay³, S. Cortes³, MJ. Stasia¹

¹Université Grenoble Alpes, TIMC-IMAG, F-38000 Grenoble, France,

²CDiReC, Pôle Biologie, CHU de Grenoble, Grenoble, F-38043, France

Tel: 33-476765483

Fax: 33-476765608

E-mail : jbrault@chu-grenoble.fr; mjstasia@chu-grenoble.fr

³Synthelis SAS, 5 Avenue du Grand Sablon, La Tronche, France

Tel: 33-476549535

Fax: 33-476549536

E-mail: sandra.cortes@synthelis.fr; guillaume.vaganay@synthelis.fr

Corresponding author: mjstasia@chu-grenoble.fr

Keywords: proteoliposomes – iPSCs – cellular modelisation – protein therapy – macrophages

Abstract

CGD is a rare inherited immunodeficiency due to the dysfunction of the phagocytic NADPH oxidase complex leading to severe and recurrent infections in small children. The main genetic form is the X-linked CGD (XCGD) affecting NOX2 and p22^{phox} secondarily, its membrane partner in the oxidase complex. The first cause of death of the patients is pulmonary infections refractory to conventional antibiotics treatments. Proteoliposomes-based therapy is an emerging approach for protein membrane delivery. Thus it could represent an alternative therapeutic for severe pulmonary infections of CGD patients as a local and targeted treatment. We developed an enzymatic replacement therapy as recombinant NOX2/p22^{phox} (cytb₅₅₈) liposomes to restore bactericidal power of XCGD phagocytes. Using an optimized prokaryotic cell-free protein synthesis system, a recombinant cytb₅₅₈ with heme integration was produced and incorporated into liposomes. These proteoliposomes were able to generate ROS in a cell-free-system assay in presence of recombinant p47^{phox}, p67^{phox} and Rac, the cytosolic components of the NADPH oxidase complex, after activation by arachidonic acid and NADPH. Furthermore, cytb₅₅₈ was successfully delivered at the plasma membrane of X⁰-CGD induced pluripotent stem cells-derived macrophages. In addition the NADPH oxidase activity of X⁰-CGD macrophages treated with proteoliposomes was restored. In conclusion, we confirm that proteoliposomes represent a new promising technology for the delivery of functional proteins to the membrane of targeted cells. In the future, this safe and efficient liposomal enzymatic replacement therapy could have a place in the therapeutic arsenal of CGD patients for the treatment of infections refractory to conventional medications.

1. Introduction

Protein-based therapies represent a promising and safe alternative in medicine with more than 164 proteins approved in Europe for clinical use. Actually, almost 70% of the pharmaceutical targets are membrane proteins [1]. However, the production of functional membrane proteins in sufficient amount for therapeutic use is limited because of their biophysical characteristics. The recent development of cell-free protein synthesis (CFPS) techniques for the production of recombinant membrane proteins and their integration into liposomes to form proteoliposomes holds a great promise to vectorize therapeutic proteins to targeted cells [2]. Indeed, in the past 20 years, liposomes have been widely used as pharmaceutical carriers for drug delivery [3–5]. Moreover, they provide a specific environment required for the insertion and function of membrane proteins. Successful results were recently obtained with proteoliposomes able to deliver anti-tumoral apoptotic protein [6, 7] or anti-tumoral [8, 9], anti-bacterial [10] or anti-parasite [11] vaccines. Therefore, proteoliposomes could be used for treatment of monogenetic disorders as enzyme replacement therapy.

Indeed chronic granulomatous disease (CGD) is a suitable candidate to demonstrate the feasibility of this new protein therapy. This rare inherited disorder of the innate immune system (1/200,000 births) is caused by mutations in one of the five genes encoding the subunits of the NADPH oxidase complex expressed in phagocytic cells (neutrophils, monocytes/macrophages, eosinophils) [12]. This enzymatic complex is composed of two membrane subunits (the redox subunit gp91phox, also called NOX2, and p22^{phox}, both forming the flavocytochrome *b*₅₅₈ or *cytb*₅₅₈), cytosolic components (p47^{phox}, p67^{phox} and p40^{phox}) and the small G protein Rac1/2. When stimulated, the cytosolic subunits translocate to the plasma membrane and associate with *cytb*₅₅₈ to form the active NADPH oxidase complex [13]. Activated NADPH oxidase is responsible for the production of antimicrobial reactive oxygen species (ROS) and therefore its deficiency leads to recurrent and life-threatening infections in early childhood of CGD patients [14]. The main genetic form of CGD is the X-linked CGD (70% of cases) caused by mutations in the *CYBB* gene resulting in the absence (or dysfunction) of NOX2 and p22^{phox} secondarily, and therefore of the *cytb*₅₅₈ [15]. Up to now bone marrow transplantation (BMT) is the only curative treatment but this therapeutic approach is not devoid of risks in a context of infections and immunodeficiency although recent progresses in patient conditioning have improved the safety and efficacy of this treatment in high-risk CGD patients [16]. Encouraging results were also obtained by the gene therapy approach but the type and the design of viral vector constructs used for, is currently under investigation in order to control random genome insertion and stabilization of the promoter [17, 18]. In addition, this therapy is highly expensive and difficult to apply to a large number of patients. However the major treatment for CGD patients is antibiotic and antifungal prophylaxis all their life. But the first cause of death of CGD patients is pulmonary infections that are mainly refractory to antibiotic treatment even intravenously [19]. Thus alternative treatments to target pulmonary sites are desperately needed to rapidly fight life-threatening infections in CGD patients.

Recently, efficacy of nanotechnology approaches as liposomes for inhalation treatment of lung diseases has been reviewed [20]. Liposomes are safe nanocarriers ideal for the vectorization of functional membrane proteins. Furthermore, they could be functionalized with antibodies in order to improve the targeting to interest cells like phagocytes in the lung. In a previous work, using an optimized *E. coli*-based CFPS system, our team showed for the first time the production of a

recombinant and active truncated form of NOX2 in liposomes and demonstrated its efficient delivery to the membrane of human carcinoma cell lines [21]. Thus, NOX2/p22^{phox} liposomes could represent an attractive delivery system for complementing NADPH oxidase activity in the phagocytic cells of ROS-deficient CGD patients. However, *in cellulo* restoration of ROS-deficient phagocytic cells have never been reported yet using a functional recombinant membrane cytb₅₅₈. Thus, the first step toward the development of this new therapy, i.e. production of active recombinant cytb₅₅₈ in proteoliposomes, is challenging: both subunits have to be co-expressed and two heme molecules have to be incorporated into NOX2 [22]. Cellular models are also important to consider for evaluating new therapeutic approach in pre-clinical studies. Recently, the technology of the induced pluripotent stem cells (iPSCs) has been shown to be very useful for the physiopathologic modelisation of diseases [23]. Thus, CGD patient-specific iPSCs were successfully differentiated into neutrophils and/or macrophages recapitulating the ROS-deficient phenotype by few teams including us [24–30]. Some of them have demonstrated that genome editing approaches using ZFN [24, 27], TALEN [29], CRISPR-Cas9 [28], and BAC transgenesis or gene targeting [30] can correct efficiently CGD-iPSCs to restore the NADPH oxidase activity in the CGD-iPSCs-derived phagocytes.

In this work, our objective was to demonstrate the proof-of-concept of a new therapy for CGD patients: the protein-based therapy. The production of proteoliposomes containing an active recombinant cytb₅₅₈ was optimized. In addition we studied their ability to vectorize and deliver the cytb₅₅₈ at the membrane of X⁰-CGD iPSCs-derived macrophages in order to restore the NADPH oxidase activity of these ROS-deficient cells.

We report here the development of a promising new liposomal enzyme replacement therapy that could represent a curative alternative against life-threatening lung infections refractory to conventional antibiotic and antifungal therapy.

2. Material & methods

2.1 Liposome preparation

All lipids were purchased from Avanti Polar lipids. Liposomes were prepared using a 10 mg/ml lipid mixture of (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC): 1,2-dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE): 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphate (DMPA):cholesterol; 40:20:20:20 volume ratio) in chloroform. Chloroform was evaporated using a Univapo 150H. The thin lipid film was rehydrated with diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water to obtain 30 mg/mL lipid slurry. This solution was sonicated using a tip sonicator (Branson Digital Sonifier 250) at 20% for 5 times 30 seconds before being filtered with a 0.22 μm PES filter.

2.2 Cell-free synthesis of NOX2-p22^{phox} protein and proteoliposome purification

The R199Q mutation was introduced into the wildtype (WT) NOX2 cDNA in pBluescript II KS (+) vector using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) and subcloned into the mammalian expression vector pEF-PGKneo as previously described [31]. Then, R199Q mutant NOX2 cDNA and p22^{phox} cDNA sequence were subcloned by Proteogenix into a specific plasmid optimized by Syntheliss SAS. The two plasmids and the preformed liposome solution were added to 1 mL of the batch reaction mixture. Energy mix was developed by Syntheliss SAS. Cell-free reaction was carried out at 30°C for 16h with gentle agitation at 400 rpm by using an E. coli extract [21]. Liposomes prepared with identical lipid composition, in the absence of cDNA encoding the NOX2 and p22^{phox} proteins, were used as negative controls. To purify proteoliposomes, cell-free reactions were loaded on top of 3-step discontinuous sucrose gradient (60%, 30% and 5%) prepared in 50 mM Hepes pH 7.5 buffer. After centrifugation at 280,000g for 1h at 4°C, fractions were collected at each interface and analyzed by Western blotting and Coomassie blue.

2.3 Biochemical characterization of proteoliposomes

The samples were diluted with 50 mM Hepes pH 7.5 buffer and separated by SDS-PAGE. For western blotting analysis, the gel-bound protein bands were electrotransferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was blocked by incubation for 1h at room temperature in 5% nonfat milk in Tris-Buffered Saline and Tween 20 (TBST). For p22^{phox} detection, the blocked membrane was then incubated in a poly histidine antibody conjugated with a horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich) diluted at 1:10 000 in TBST buffer, 5% nonfat milk. For NOX2 detection, the blocked membrane was incubated in an anti-NOX2 antibody (clone 54.1; Abcam) diluted at 1:1 000 in TBST buffer, 5% nonfat milk then after washing in an anti-mouse IgG-Peroxidase antibody (Sigma-Aldrich) diluted at 1:10 000 in TBST buffer, 5% nonfat milk. After washing with TBST three times, the blots were developed using a chemiluminescence method (ECL; GE Healthcare).

Differential spectrum of purified cytochrome *b*₅₅₈ was performed as already published [32]. Reduction was achieved by adding a few grains of sodium dithionite to the proteoliposome sample, and the reduced-minus-oxidized difference spectra were recorded at room temperature with a spectrophotometer (Biotek Synergy HT). Cyt_b₅₅₈ integrity was validated by reduced-minus-oxidized difference spectroscopy using band absorption at 426 nm and the valley at ~410–411 nm. Cyt_b₅₅₈ was quantified using Soret band absorption with the relation $\Delta\text{DO} = \epsilon \cdot l \cdot c$. A molecular absorption coefficient of $\epsilon_{426\text{nm}} = 0.106 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ for the Soret band was used for calculations [33].

2.4 iPS cell culture and hematopoietic differentiation into mature macrophages

iPSCs were reprogrammed by a retroviral method from human dermal fibroblasts (hDFs) isolated from the skin biopsy of a healthy control (WT) and a X^0 -CGD patient and are maintained in an undifferentiated state on irradiated mouse embryonic fibroblasts as previously described [26, 34]. Then, hematopoietic differentiation of iPSCs into mature macrophages was performed using our recently published protocol [26]. Macrophages were adhered on 96-well plate for viability assay, 24-well plate for flow cytometry and in vivo activity test and 4-well Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ (ThermoFischer) for confocal microscopy.

2.5 Recombinant cell-free system (CFS)

NOX2/p22^{phox} (3 pmol equivalent NOX2) or negative liposomes were incubated with purified recombinant cytosolic subunits p67^{phox}, p47^{phox} and Rac1Q61L (1 μ M), and flavin adenine dinucleotide FAD (10 μ M) as previously described [32, 35], and in presence of 400 μ M arachidonic acid (Sigma-Aldrich) in a total volume of 200 μ L to induce NADPH oxidase assembly. After incubation for 10 min at room temperature, oxidase activity was measured in the presence of 100 μ M final cytochrome *c* and with 200 μ M final NADPH tetrasodium salt (Sigma-Aldrich) to initiate the superoxide production. The $O_2^{\bullet-}$ production was determined by measuring the absorbance of cytochrome *c* at 550 nm using a spectrophotometer (Mithras, Berthold). Activity was expressed as nmol of superoxide produced/min/mg of hemes using a molar extinction coefficient of 21 $nM^{-1}.cm^{-1}$ for cytc [36].

2.6 Evaluation of cell viability: MTT assay

Cell viability was determined by a MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma-Aldrich) assay based on the activity of a mitochondrial dehydrogenase enzyme from viable cells which are able to cleave the tetrazolium rings of the yellow MTT and form dark blue formazan crystals. 15,000 X^0 -CGD iPSCs-derived macrophages were seeded in a 96-well plate and treated with NOX2/p22^{phox} (2 pmol equivalent NOX2) and negative liposomes for 8, 12 and 24h at 37°C. MTT was then added to each well (200 μ L of a 0.5 mg/mL MTT solution) and cells were incubated for a further 3-5h at 37°C. After medium removal and washing with PBS to remove the excess of proteoliposomes, pure DMSO (dimethylsulfoxide; Sigma-Aldrich) was added to each well (200 μ L) to dissolve the formazan crystals. After 30 min of incubation at room temperature on a plate shaker to ensure adequate solubilization, the absorbance readings for each well were performed at 560 nm using a multiwell scanning Varioskan™ Flash spectrophotometer and a SkanIt Software (version 2.4.1) (ThermoFisher). The absorbance is directly proportional to the number of viable cells, and survival was calculated as the percentage of the staining values of untreated cells. All assays were performed in triplicate.

2.7 Flow cytometry

For flow cytometry, 150,000 X^0 -CGD macrophages were treated for 24h at 37°C with NOX2/p22^{phox} (20 pmol equivalent NOX2) and negative liposomes and then stained with anti-NOX2 and anti-p22^{phox} antibodies as previously described [26]. Control staining with appropriate isotype-matched control was included to establish thresholds for positive staining. WT iPSCs-derived macrophages were used as positive control. Cell fluorescence was quantified using a FACS Canto II (BD Biosciences). Data

were collected and analysed with the FACS DIVA software (BD Biosciences) and FlowJo software (Tree Star).

2.8 Confocal microscopy

For confocal microscopy, 150,000 X^0 -CGD macrophages were treated for 24h at 37°C with NOX2/p22^{phox} (20 pmol equivalent NOX2) and negative liposomes. Then, X^0 -CGD and WT macrophages were rinsed with PBS, fixed in 4% PFA for 20 min and then blocked with PBS, 5% BSA, 5% goat serum (Gibco) for 15 min at room temperature. Cells were stained with an unconjugated antibody 7D5 (1:50, D162-3; Clinisciences) for 1h at 4°C followed by incubation with AF488-conjugated anti-mouse IgG1 secondary antibody (1:200; ThermoFischer) for 1h at room temperature. After several washings, nuclei were stained with Hoechst 33258 1 µg/ml (Sigma-Aldrich). Images were acquired using a confocal laser scanning microscope TCS-SP2 (Leica) and analysed with ImageJ software.

2.9 Nitroblue Tetrazolium (NBT) test

150,000 X^0 -CGD iPSCs-derived macrophages were seeded in a 24-well plate and treated for 24h with NOX2/p22^{phox} (20 pmol equivalent NOX2) and negative liposomes. *In cellulo* NADPH oxidase activity was measured by a NBT-reduction test as previously described [37]. Briefly, macrophages were primed with 1 µg/mL LPS (lipopolysaccharide; Sigma-Aldrich) for 3h at 37°C and then stimulated with 200 ng/mL PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate; Sigma-Aldrich) in presence of NBT (Sigma-Aldrich). After 1h of incubation at 37°C with agitation at 250 rpm, cells were washed with PBS and, fixed in 4% PFA and then images were acquired using a microscope Nikon Eclipse TS1000 with a camera Nikon DS.

3. Results

3.1 Production and *in vitro* biochemical characterization of proteoliposomes

The cell-free system used in this work was adapted for membrane protein synthesis by adding synthetic liposomes to the reaction medium (Patent PCT/FR2008/050757 operated by Synthelis). Thus, in a single stage reaction, the products obtained directly from this process are proteoliposomes containing membrane proteins in their native, active form (Fig. 1).

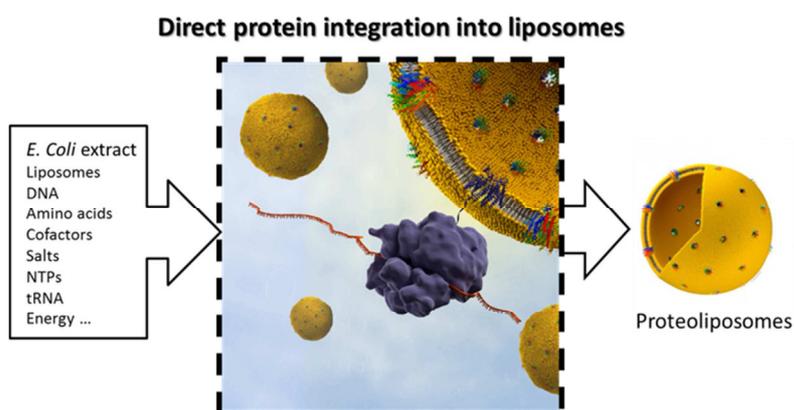


Figure 1. Schematic diagram of cell-free system for membrane protein synthesis. Cell-free system requires *E. coli* extract, energy regeneration system, substrates (e.g., NTPs, salts, amino acids, chaperones, cofactors...). Cell-free transcription and translation is initiated by adding liposomes and DNA (plasmid or PCR-product) into reaction.

The advantage to use cell-free expression system is that it is a completely open system in which each parameter of the reaction can be modified depending on the target protein to be produced, and this format is particularly suited for the co-expression of membrane proteins. Optimizations of the cell-free system is described here in order to achieve, in one step reaction, integration of NOX2 and p22^{phox} subunits into a liposome to produce active proteoliposomes directly. In order to improve the expression, we have mainly optimized Mg²⁺ and K⁺ ion concentrations (Fig. 2A), type and liposome concentrations and time (Fig. 2B). Co-expression of NOX2 and p22^{phox} was achieved with two different plasmids, each carrying the gene of one protein. A mix of NOX2 and p22^{phox} genetic material was prepared and several ratios were tested in order to retain 1:1 DNA ratio (data not shown). In addition we used a R199Q mutated NOX2 cDNA in order to improve the NADPH oxidase activity as previously described [31, 38]. In order to reconstitute the heme groups within the NOX2 subunit, we also performed a correlated screening of hemin and iron concentrations during protein expression (Fig. 2C).

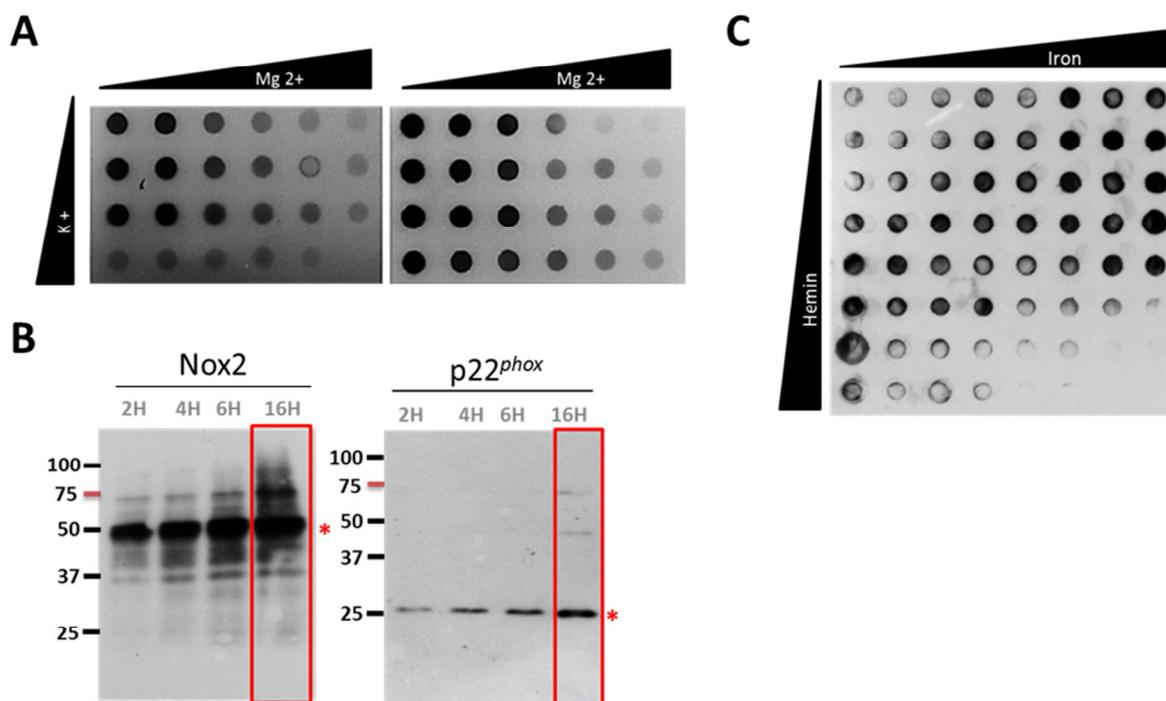


Figure 2. Screening of expression conditions. A) Effect of lysate, potassium and magnesium concentrations on protein expression. *In vitro* expression was performed in 96-well plates with a volume of 50 μ L. The presence of the p22^{phox} protein was detected using a monoclonal anti-His HRP-conjugated antibody. B) Variation of time with liposomes. *In vitro* expressions were performed in batch format (100 μ L) and separated by SDS-PAGE on a 15% gel. Reactions were carried out at 30°C during 2, 4, 6 or 16 hours incubation. The Western Blot was incubated with anti-His antibody for p22^{phox} detection or with 54.1 anti-Nox2 antibody. C) Variation of iron and hemin on protein expression. *In vitro* expression was performed in 96-well plates with a volume of 50 μ L.

In a typical cell-free reaction supplemented with liposomes, the *cytb*₅₅₈ complex was produced and purified on a discontinuous sucrose gradient to separate proteoliposomes from liposomes and aggregated proteins. We first checked the successful synthesis and integration of the two subunits NOX2 and p22^{phox} at the membrane of the proteoliposomes. The expression efficiency was detected by SDS PAGE and Western blotting and quantified by Coomassie brilliant blue staining (Fig. 3A and B). These results confirmed the presence of both subunits inside NOX2/p22^{phox} liposomes only. The batch expression yield of the partially purified proteoliposomes was estimated to 5-10 μ g/mL for NOX2 and 20 μ g/mL for p22^{phox} (Fig. 3A). We detected here the 55kDa unglycosylated form of NOX2 and p22^{phox} at 20-25 kDa (Fig. 3A et B). Furthermore, the reduced-minus-oxidized spectra performed on the NOX2/p22^{phox} liposomes identified the two characteristic peaks at 426 nm (Soret band) and 558 nm (α band), confirming hemes incorporation in the NOX2 subunit while they were absent in negative liposomes (Fig. 3C). The *cytb*₅₅₈ concentration of 0.14 μ M in NOX2/p22^{phox} liposomes was calculated from the absorbance at 426 nm.

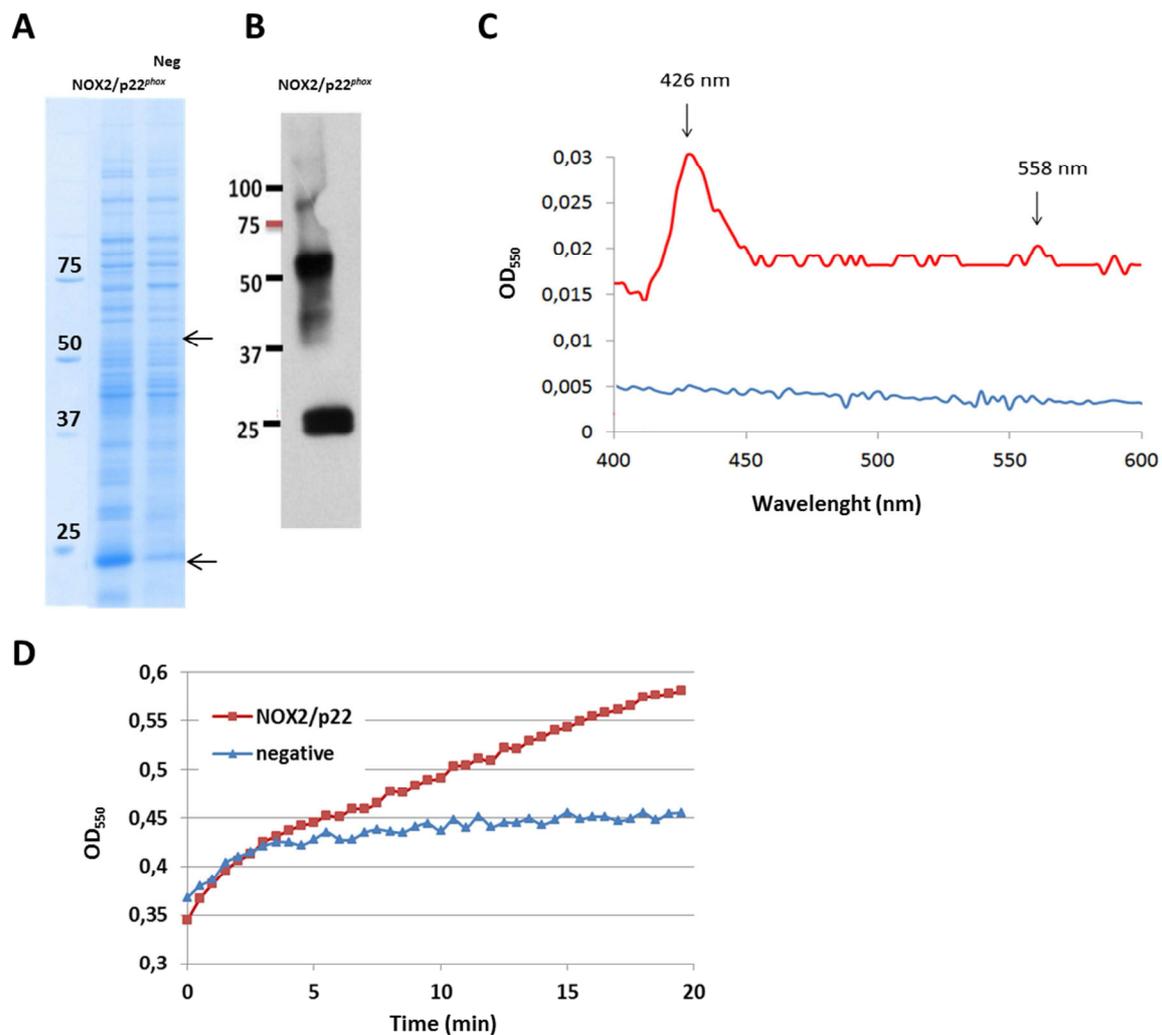


Figure 3. *In vitro* biochemical characterization of NOX2/p22^{phox} liposomes. A) SDS-PAGE analysis and Coomassie blue staining of NOX2/p22^{phox} and negative liposomes. B) Western Blot analysis using monoclonal antibodies against p22^{phox} and NOX2. C) Dithionite-reduced-minus-oxidized spectra of NOX2/p22^{phox} liposomes. D) *In vitro* NADPH oxidase activity of NOX2/p22^{phox} and negative liposomes in a recombinant cell-free system assay. Red curves represent NOX2/p22^{phox} liposomes and blue curves negative liposomes.

Then, we investigated the ability of NOX2/p22^{phox} liposomes to produce superoxide anions in an *in vitro* cell-free system (CFS) assay in the presence of recombinant cytosolic proteins p47^{phox}, p67^{phox} and Rac1Q61L (active form of Rac1), NADPH, cytochrome c and an adequate amount of arachidonic acid determined previously (data not shown). In this reconstituted system, the NADPH oxidase activity of NOX2/p22^{phox} liposomes was of 4.42 nmoles of superoxides/min/mg of hemes whereas in the negative liposomes the activity was only residual (Fig. 3D).

These data demonstrated the efficiency of our optimized *E. coli* based cell-free expression system to co-express both subunits of the cyt_{b558} with heme incorporation and integrate them into the membrane of liposomes. Our results showed that the NOX2/p22^{phox} liposomes produced were able to reconstitute a functional NADPH oxidase complex producing superoxide anions *in vitro*.

3.2 *In cellulo* interaction of liposomes with X⁰CGD iPSCs-derived macrophages

We recently published a method to produce high amount of mature macrophages from iPSCs [26]. Thus X⁰CGD iPSCs-derived macrophages were used as a target cell to analyze the efficiency of the

proteoliposome-based therapy developed in this work. First, we checked the viability of macrophages after exposure to NOX2/p22^{phox} and negative liposomes using the MTT test specific of the mitochondria activity in living cells. No loss of viability was observed after 8, 12 or 24h treatment of X⁰-CGD iPSCs-derived macrophages (Fig. 4A). In order to analyze the ability of proteoliposomes to deliver cytb₅₅₈ to the macrophage membranes, X⁰-CGD iPSC-derived macrophages were treated for 24h with NOX2/p22^{phox} or negative liposomes. The presence of these two components of the NADPH oxidase complex was measured by flow cytometry. X⁰-CGD macrophages treated with NOX2/p22^{phox} liposomes showed the presence of NOX2 and p22^{phox} compared to treatment with negative liposomes, even if the incorporation of both subunits was lower than what is detected in WT macrophages (Fig. 4B).

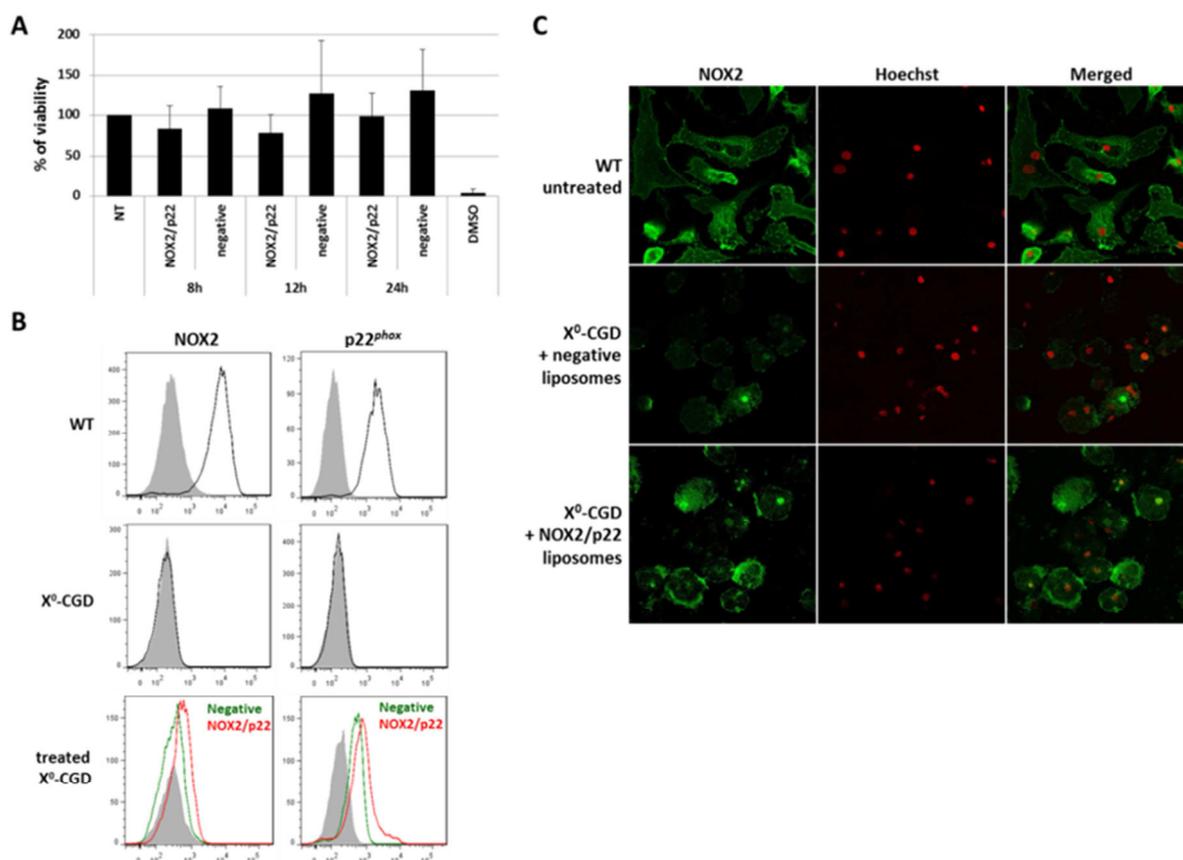


Figure 4. Analysis of *in cellulo* incorporation of NOX2/p22^{phox} liposomes in the membranes of iPSCs-derived macrophages. A) Viability of iPSCs-derived macrophages after 8, 12 and 24h of treatment. Untreated cells (NT) are used as positive control (100 %) and DMSO treated cells as negative control. B) Flow cytometry analysis of NOX2 and p22^{phox} expression using monoclonal antibodies (black curve) in WT and X⁰-CGD macrophages, and X⁰-CGD macrophages treated for 24h with NOX2/p22^{phox} (red curve) or negative (green curve) liposomes. Isotype controls are represented by gray-filled curves. C) Confocal microscopy showing the staining of NOX2 protein with 7D5 antibody and FITC-conjugated secondary antibody (green) in WT and X⁰-CGD macrophages treated for 24h with NOX2/p22^{phox} or negative liposomes. Nuclei were counterstained with Hoechst in red.

To further check the localization of the delivered cytb₅₅₈, immunofluorescence staining using 7D5 antibody targeting an extracellular domain of NOX2 was performed on 24h-treated X⁰-CGD macrophages and untreated WT macrophages. A positive green fluorescence was detected only at the membrane of X⁰-CGD macrophages treated with NOX2/p22^{phox} liposomes (Fig. 4C). These results demonstrated that NOX2/p22^{phox} liposomes can be used to deliver the cytb₅₅₈ at the plasma membrane of iPS-derived X⁰-CGD macrophages without affecting their viability.

3.3 *In cellulo* NADPH oxidase activity of proteoliposomes-treated macrophages

Based on these promising results, we finally analyzed the ability of these proteoliposomes to restore the *in cellulo* NADPH oxidase activity in the ROS-deficient macrophages. NBT test performed on X^0 -CGD macrophages treated with NOX2/p22^{phox} liposomes during 24h showed a blue precipitate of formazan, revealing the production of ROS upon PMA stimulation (Fig. 5).

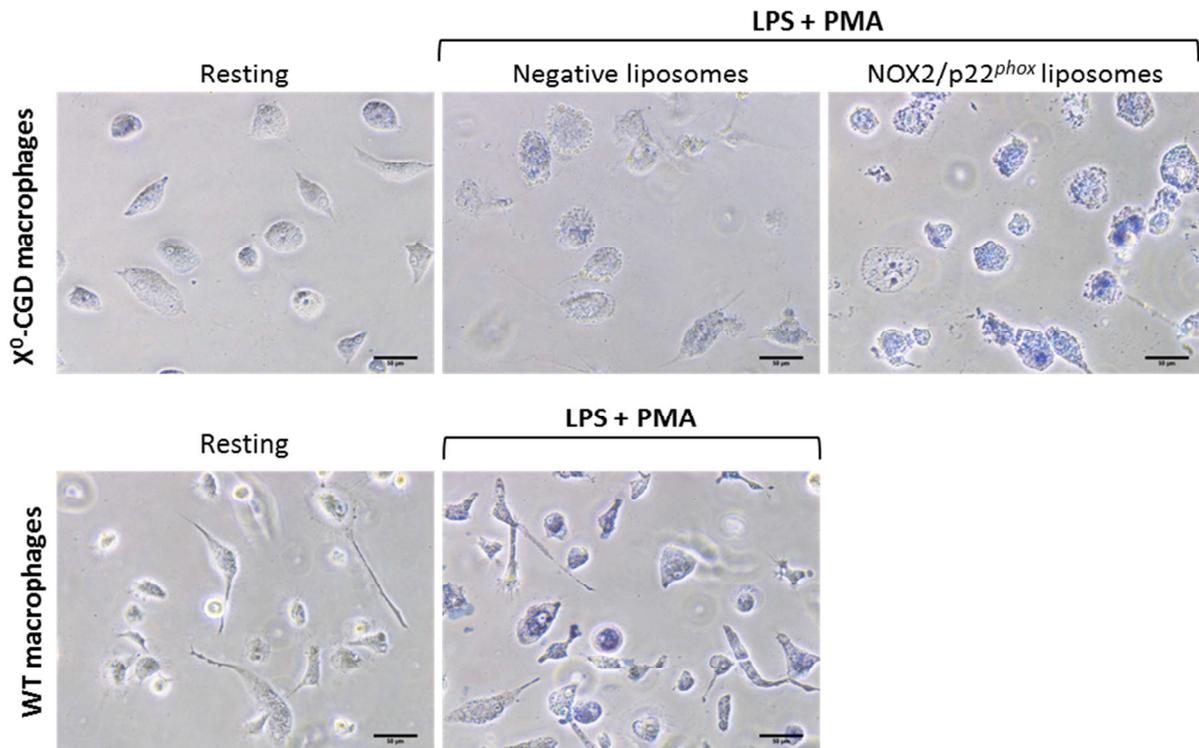


Figure 5. Analysis of *in cellulo* restoration of the ROS production of X^0 -CGD iPSCs-derived macrophages in the NBT test. Only X^0 -CGD macrophages were treated for 24h with NOX2/p22^{phox} or negative liposomes. Then WT and X^0 -CGD macrophages were pre-stimulated with LPS for 3h and stimulated with PMA or not (resting) (Scale bars = 50 μ m).

The level of restoration is quite similar to the one found in WT macrophages while only residual activity was found in macrophages treated with negative liposomes (Fig. 5). In conclusion, 24h-treatment of X^0 -CGD macrophages with proteoliposomes integrating a functional *cytb*₅₅₈ led to a restoration of the NADPH activity and the production of ROS in these cells.

4. Discussion

In this study, we described a successful technology to produce therapeutic proteoliposomes for X-CGD patients. Production of membrane proteins causes significant problems in overexpression studies because of their hydrophobic nature and their negative effects observed on membrane properties. Establishing efficient protocols for the production of functionally folded membrane proteins is therefore a challenging task, and numerous specific characteristics have to be considered. We have overcome this bottleneck by using a cell-free process to obtain proteoliposomes containing membrane proteins. Cell-free expression offers an interesting alternative method to produce membrane proteins in high amounts [39]. Few years ago, our team has previously demonstrated that an efficient and easy production of liposomes containing a truncated form of NOX2 could be obtained in one single step with an optimized *E. coli*-based expression system [21]. However the truncated form of NOX2 produced integrated into liposomes exhibited a diaphorase activity, but no NADPH oxidase activity could be measured because no hemes were incorporated and the essential partner of NOX2, i.e. p22^{phox} was not expressed.

In the present work, we have demonstrated that NOX2/p22^{phox} can be synthesized directly into synthetic liposomes using an optimized *E. coli* cell-free expression system with an adequate cDNA ratio of both proteins. The efficiency of protein synthesis is governed by the availability of the constant supply of energy. Several parameters like the concentrations of critical compounds must be checked for optimal protein expression. For each new protein target these parameters need to be optimized in order to obtain the best conditions for high level expression. For example, ion concentrations have an important impact on protein expression. In this present study, Mg²⁺ concentration was found to be between 15-20 mM, while K⁺ was found to be between 280-320 mM. Lipid composition of lipid bilayer was also optimized using lipids such as DOPE, a helper neutral fusogenic lipid known to favor the fusion with the plasma membrane of targeted cells [40, 41]. We first tried to express NOX2 and p22^{phox} separately but as it is found in phagocytes [42], NOX2 was not expressed in absence of its partner in our cell-free expression system (data not shown). Others have shown the same as the production of active recombinant NOX2 in membranes was possible only in presence of p22^{phox} [43, 44]. Surprisingly, a team recently succeeded to produce NOX2 alone using a CFPS system based on yeast [45]. Indeed, they showed that the absence of p22^{phox} modifies the pattern of glycosylation of NOX2 but does not reduce the expression and incorporation of NOX2 at the membrane even if increasing the protein instability. Moreover, in their system, p22^{phox} was not required for superoxide production. In our system NOX2 was expressed at a lower level compare to p22^{phox} expression (10-fold lower). This was probably due to the complex structure of NOX2 compared to that of p22^{phox}. However the important point is that cytb₅₅₈ was correctly structured and hemes were incorporated in it proving a probably correct heterodimerization of both subunits. We produced the non-glycosylated form of NOX2 migrating as a 55kDa band in SDS-PAGE and western blot. In phagocytes, NOX2 is detected as a highly glycosylated form of 91 kDa [46]. Indeed, *E. coli* based cell-free expression system is not able to perform post-translational modifications including N-glycosylations while other systems (eg. Baculovirus/insect cell system, yeast) can produce eukaryotic proteins with post-translational modifications [47]. Same results were obtained when using cell-free system based on rabbit reticulocytes lysates [42, 48, 49]. On the contrary, glycosylated forms of NOX2 were produced using the cellular expression system *Pichia pastoris* [44, 50]. However, it has been demonstrated that glycosylations are not required for the assembly of the NOX2-p22^{phox} dimer, heme incorporation or superoxide anions generation [51, 52]. This was also confirmed by

Rotrosen *et al.* that produced in a baculovirus/insect cell system, a functional *cytb*₅₅₈ containing a weakly glycosylated NOX2 [43]. In addition the murine NOX2 is not glycosylated and migrates with an apparent molecular mass of 58 kDa instead of 91 kDa but it is active [53]. Recently N-glycosylation of murine NOX1 was shown to not be required for normal enzyme activity, protein stability and membrane trafficking [54]. As is true for NOX2, the contribution of glycosylation in NOX1 to its biological function remains unclear.

In contrast, it is well established that heme incorporation is essential for the NADPH oxidase activity [55, 56]. Our results support this observation because failure in heme incorporation in the *cytb*₅₅₈ led to the absence of cytochrome *c* reduction in our *in vitro* reconstituted cell-free system assay (data not shown) and as it was previously demonstrated in Marques *et al.* [21]. Correct heme synthesis and integration within NOX2 was obtained when hemin or its precursor, δ -aminolevulinic acid, was added in the reaction medium as previously described [43, 44]. With an estimated yield of 5-10 mg/L of NOX2 produced, our cell-free system is more efficient in term of yield but also time of production (6-16h versus 65-72h) than previous reported cell-based systems [44]. Furthermore, this technology is cheap and easy to use.

In order to enhance the NADPH oxidase activity of our therapeutic proteoliposomes, we used a cDNA carrying the R199Q mutation as a template for the NOX2 synthesis because this mutation was described to lead to a 4- to 8-fold increase in ROS production after activation [31]. Further characterization of proteoliposomes showed that they were able to reconstitute an *in vitro* functional NADPH oxidase complex in presence of recombinant cytosolic components and arachidonic acid upon NADPH stimulation. However, residual activity dependent of the presence of NADPH was found during this assay. Similar results were previously obtained for an NADPH reductase (<http://www.synthelis.com>). This residual oxidase activity is probably related to the liposome-containing reaction medium. As shown with Coomassie blue staining performed on liposomes, contaminant proteins are present in the preparation and some of them in the bacterial lysates may have NADPH reduction ability.

To further analyze the *in cellulo* properties of NOX2/p22^{phox} liposomes, we used a cellular model of CGD macrophages to demonstrate the feasibility, the safety and the efficacy of this new proteoliposome-based therapy. Mature macrophages are easier to obtain from iPSCs than neutrophils as we previously shown, and X-linked CGD is the main form of this disease, that's why we focused here on developing a vector able to bring the *cytb*₅₅₈ at the membrane of ROS-deficient X⁰-CGD macrophages [26]. First, the use of proteoliposomes as a new therapy requires ascertaining the safety toward the treated cells and more importantly the delivery of the therapeutic protein at the correct site. In our experiments, no toxicity was shown at any time of incubation and membrane delivery was revealed by the presence of both subunits NOX2 and p22^{phox} after 24h of incubation. Finally, we showed that the delivery of the *cytb*₅₅₈ at the plasma membrane of the ROS-deficient macrophages was associated with the restoration of a functional NADPH oxidase activity in these cells. Other proteoliposomes were proved to be efficient in the literature for other applications. Indeed in the context of antitumoral therapy, liposomes containing the pro-apoptotic Bak protein designed by our team have demonstrated powerful activity to induce apoptosis *in vitro* in human colorectal carcinoma cell lines and *in vivo* in a mouse model of glioblastoma [6, 7]. Human clinical trials using tumor-derived proteoliposomes vaccines showed interesting results against follicular lymphoma [8] or breast metastatic cancer [9]. First results from these studies showed the absence of immunogenicity and confirmed the safety of the proteoliposome-based therapy.

Next step will be to test the bactericidal power of the proteoliposomes treated-XCGD macrophages. In future, after biodisponibility studies and maybe chemical modifications to render the proteoliposomes more stables and less immunogens, they will be tested *in vivo* in the XCGD mice model of pulmonary infections, first by local nebulization. These pre-clinical experiments will be important for a future translation of this therapy to the clinic.

5. Conclusion

In conclusion, we propose a simple and efficient technology to co-express NOX2 with its partner p22^{phox} with hemes incorporation in order to produce a functional cytb₅₅₈ directly into the lipid bilayer of liposomes. We showed that the *E. coli*-based CFPS is a fast and inexpensive technology for the production of recombinant therapeutic proteoliposomes. Furthermore, this is the first time that proteoliposomes are demonstrated to be efficient for a membrane enzyme deficiency. In the future, NOX2/p22^{phox} liposomes could represent an effective and promising therapy for CGD patients.

References

1. Lundstrom K: Structural genomics and drug discovery. *J Cell Mol Med* 2007, 11:224–238.
2. Liguori L, Lenormand JL: Production of recombinant proteoliposomes for therapeutic uses. *Methods Enzymol* 2009, 465:209–223.
3. Torchilin VP: Multifunctional nanocarriers. *Adv Drug Deliv Rev* 2006, 58:1532–1555.
4. Monteiro N, Martins A, Reis RL, Neves NM: Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *J R Soc Interface R Soc* 2014, 11:20140459.
5. Madni A, Sarfraz M, Rehman M, Ahmad M, Akhtar N, Ahmad S, Tahir N, Ijaz S, Al-Kassas R, Löbenberg R: Liposomal drug delivery: a versatile platform for challenging clinical applications. *J Pharm Pharm Sci Publ Can Soc Pharm Sci Société Can Sci Pharm* 2014, 17:401–426.
6. Liguori L, Marques B, Villegas-Mendez A, Rothe R, Lenormand J-L: Liposomes-mediated delivery of pro-apoptotic therapeutic membrane proteins. *J Control Release Off J Control Release Soc* 2008, 126:217–227.
7. Liguori L, Pastorino F, Rousset X, Alfano S, Cortes S, Emionite L, Daga A, Ponzoni M, Lenormand J-L: Anti-Tumor Effects of Bak-Proteoliposomes against Glioblastoma. *Mol Basel Switz* 2015, 20:15893–15909.
8. Neelapu SS, Gause BL, Harvey L, Lee S-T, Frye AR, Horton J, Robb RJ, Popescu MC, Kwak LW: A novel proteoliposomal vaccine induces antitumor immunity against follicular lymphoma. *Blood* 2007, 109:5160–5163.
9. Mulens V, de la Torre A, Marinello P, Rodríguez R, Cardoso J, Díaz R, O’Farrill M, Macias A, Viada C, Saurez G, Carr A, Crombet T, Mazorra Z, Perez R, Fernandez LE: Immunogenicity and safety of a NeuGcGM3 based cancer vaccine: Results from a controlled study in metastatic breast cancer patients. *Hum Vaccin* 2010, 6.
10. Tirado Y, Puig A, Alvarez N, Borrero R, Aguilar A, Camacho F, Reyes F, Fernández S, Pérez JL, Espinoza DM, Payán JAB, Sarmiento ME, Norazmi M-N, Hernández-Pando R, Acosta A: Protective capacity of proteoliposomes from *Mycobacterium bovis* BCG in a mouse model of tuberculosis. *Hum Vaccines Immunother* 2015, 11:657–661.
11. Migliaccio V, Santos FR, Ciancaglini P, Ramalho-Pinto FJ: Use of proteoliposome as a vaccine against *Trypanosoma cruzi* in mice. *Chem Phys Lipids* 2008, 152:86–94.
12. van den Berg JM, van Koppen E, Ahlin A, Belohradsky BH, Bernatowska E, Corbeel L, Español T, Fischer A, Kurenko-Deptuch M, Mouy R, Petropoulou T, Roesler J, Seger R, Stasia M-J, Valerius NH, Weening RS, Wolach B, Roos D, Kuijpers TW: Chronic granulomatous disease: the European experience. *PloS One* 2009, 4:e5234.
13. Segal BH, Leto TL, Gallin JI, Malech HL, Holland SM: Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)* 2000, 79:170–200.
14. Holland SM: Chronic granulomatous disease. *Hematol Oncol Clin North Am* 2013, 27:89–99, viii.

15. Roos D, Kuhns DB, Maddalena A, Roesler J, Lopez JA, Ariga T, Avcin T, de Boer M, Bustamante J, Condino-Neto A, Di Matteo G, He J, Hill HR, Holland SM, Kannengiesser C, Köker MY, Kondratenko I, van Leeuwen K, Malech HL, Marodi L, Nunoi H, Stasia M-J, Ventura AM, Witwer CT, Wolach B, Gallin JI: Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (third update). *Blood Cells Mol Dis* 2010, 45:246–265.
16. Güngör T, Teira P, Slatter M, Stussi G, Stepensky P, Moshous D, Vermont C, Ahmad I, Shaw PJ, Telles da Cunha JM, Schlegel PG, Hough R, Fasth A, Kentouche K, Gruhn B, Fernandes JF, Lachance S, Bredius R, Resnick IB, Belohradsky BH, Gennery A, Fischer A, Gaspar HB, Schanz U, Seger R, Rentsch K, Veys P, Haddad E, Albert MH, Hassan M, et al.: Reduced-intensity conditioning and HLA-matched haemopoietic stem-cell transplantation in patients with chronic granulomatous disease: a prospective multicentre study. *Lancet Lond Engl* 2014, 383:436–448.
17. Kaufmann KB, Chiriaco M, Siler U, Finocchi A, Reichenbach J, Stein S, Grez M: Gene therapy for chronic granulomatous disease: current status and future perspectives. *Curr Gene Ther* 2014, 14:447–460.
18. Touzot F, Hacein-Bey-Abina S, Fischer A, Cavazzana M: Gene therapy for inherited immunodeficiency. *Expert Opin Biol Ther* 2014, 14:789–798.
19. Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB Jr, Boyle J, Curnutte J, Gallin JI, Malech HL, Holland SM, Ochs H, Quie P, Buckley RH, Foster CB, Chanock SJ, Dickler H: Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)* 2000, 79:155–169.
20. Kuzmov A, Minko T: Nanotechnology approaches for inhalation treatment of lung diseases. *J Control Release Off J Control Release Soc* 2015.
21. Marques B, Liguori L, Pacllet M-H, Villegas-Mendéz A, Rothe R, Morel F, Lenormand J-L: Liposome-mediated cellular delivery of active gp91(phox). *PLoS One* 2007, 2:e856.
22. Cross AR, Rae J, Curnutte JT: Cytochrome b-245 of the neutrophil superoxide-generating system contains two nonidentical hemes. Potentiometric studies of a mutant form of gp91phox. *J Biol Chem* 1995, 270:17075–17077.
23. Robinton DA, Daley GQ: The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* 2012, 481:295–305.
24. Zou J, Sweeney CL, Chou B-K, Choi U, Pan J, Wang H, Dowey SN, Cheng L, Malech HL: Oxidase-deficient neutrophils from X-linked chronic granulomatous disease iPS cells: functional correction by zinc finger nuclease-mediated safe harbor targeting. *Blood* 2011, 117:5561–5572.
25. Jiang Y, Cowley SA, Siler U, Melguizo D, Tilgner K, Browne C, Dewilton A, Przyborski S, Saretzki G, James WS, Seger RA, Reichenbach J, Lako M, Armstrong L: Derivation and functional analysis of patient-specific induced pluripotent stem cells as an in vitro model of chronic granulomatous disease. *Stem Cells Dayt Ohio* 2012, 30:599–611.
26. Brault J, Goutagny E, Telugu N, Shao K, Baquié M, Satre V, Coutton C, Grunwald D, Brion J-P, Barlogis V, Stephan J-L, Plantaz D, Hescheler J, Krause K-H, Sarić T, Stasia MJ: Optimized Generation of Functional Neutrophils and Macrophages from Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells: Ex Vivo Models of X(0)-Linked, AR22(0)- and AR47(0)- Chronic Granulomatous Diseases. *BioResearch Open Access* 2014, 3:311–326.
27. Merling RK, Sweeney CL, Chu J, Bodansky A, Choi U, Priel DL, Kuhns DB, Wang H, Vasilevsky S, De Ravin SS, Winkler T, Dunbar CE, Zou J, Zarembek KA, Gallin JI, Holland SM, Malech HL: An AAVS1-targeted minigene platform for correction of iPSCs from all five types of chronic granulomatous disease. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 2015, 23:147–157.
28. Flynn R, Grundmann A, Renz P, Haenseler W, James WS, Cowley SA, Moore MD: CRISPR-mediated genotypic and phenotypic correction of a chronic granulomatous disease mutation in human iPS cells. *Exp Hematol* 2015.
29. Dreyer A-K, Hoffmann D, Lachmann N, Ackermann M, Steinemann D, Timm B, Siler U, Reichenbach J, Grez M, Moritz T, Schambach A, Cathomen T: TALEN-mediated functional correction of X-linked chronic granulomatous disease in patient-derived induced pluripotent stem cells. *Biomaterials* 2015, 69:191–200.

30. Laugsch M, Rostovskaya M, Velychko S, Richter C, Zimmer A, Klink B, Schröck E, Haase M, Neumann K, Thieme S, Roesler J, Brenner S, Anastassiadis K: Functional restoration of gp91phox-oxidase activity by BAC transgenesis and gene targeting in X-linked chronic granulomatous disease iPSCs. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 2015.
31. Li XJ, Grunwald D, Mathieu J, Morel F, Stasia M-J: Crucial role of two potential cytosolic regions of Nox2, 191TSSTKIRRS200 and 484DESQLANHFVHHDEEKD500, on NADPH oxidase activation. *J Biol Chem* 2005, 280:14962–14973.
32. Picciocchi A, Debeurme F, Beaumel S, Dagher M-C, Grunwald D, Jesaitis AJ, Stasia M-J: Role of putative second transmembrane region of Nox2 protein in the structural stability and electron transfer of the phagocytic NADPH oxidase. *J Biol Chem* 2011, 286:28357–28369.
33. Batot G, Paclet MH, Doussière J, Vergnaud S, Martel C, Vignais PV, Morel F: Biochemical and immunochemical properties of B lymphocyte cytochrome b558. *Biochim Biophys Acta* 1998, 1406:188–202.
34. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007, 131:861–872.
35. Debeurme F, Picciocchi A, Dagher M-C, Grunwald D, Beaumel S, Fieschi F, Stasia M-J: Regulation of NADPH oxidase activity in phagocytes: relationship between FAD/NADPH binding and oxidase complex assembly. *J Biol Chem* 2010, 285:33197–33208.
36. Cross AR, Jones OT, Harper AM, Segal AW: Oxidation-reduction properties of the cytochrome b found in the plasma-membrane fraction of human neutrophils. A possible oxidase in the respiratory burst. *Biochem J* 1981, 194:599–606.
37. Segal AW, Levi AJ: The mechanism of the NBT (nitroblue tetrazolium) test. *Clin Sci* 1973, 44:26P.
38. Carrichon L, Picciocchi A, Debeurme F, Defendi F, Beaumel S, Jesaitis AJ, Dagher M-C, Stasia M-J: Characterization of superoxide overproduction by the D-Loop(Nox4)-Nox2 cytochrome b(558) in phagocytes-Differential sensitivity to calcium and phosphorylation events. *Biochim Biophys Acta* 2011, 1808:78–90.
39. Sachse R, Dondapati SK, Fenz SF, Schmidt T, Kubick S: Membrane protein synthesis in cell-free systems: from bio-mimetic systems to bio-membranes. *FEBS Lett* 2014, 588:2774–2781.
40. Kleusch C, Hersch N, Hoffmann B, Merkel R, Csiszár A: Fluorescent lipids: functional parts of fusogenic liposomes and tools for cell membrane labeling and visualization. *Mol Basel Switz* 2012, 17:1055–1073.
41. Lonez C, Lensink MF, Kleiren E, Vanderwinden J-M, Ruyschaert J-M, Vandenbranden M: Fusogenic activity of cationic lipids and lipid shape distribution. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2010, 67:483–494.
42. Parkos CA, Allen RA, Cochrane CG, Jesaitis AJ: Purified cytochrome b from human granulocyte plasma membrane is comprised of two polypeptides with relative molecular weights of 91,000 and 22,000. *J Clin Invest* 1987, 80:732–742.
43. Rotrosen D, Yeung CL, Katkin JP: Production of recombinant cytochrome b558 allows reconstitution of the phagocyte NADPH oxidase solely from recombinant proteins. *J Biol Chem* 1993, 268:14256–14260.
44. Ostuni MA, Lamanuzzi LB, Bizouarn T, Dagher M-C, Baciou L: Expression of functional mammal flavocytochrome b(558) in yeast: comparison with improved insect cell system. *Biochim Biophys Acta* 2010, 1798:1179–1188.
45. Ezzine A, Souabni H, Bizouarn T, Baciou L: Recombinant form of mammalian gp91(phox) is active in the absence of p22(phox). *Biochem J* 2014, 462:337–345.
46. Harper AM, Chaplin MF, Segal AW: Cytochrome b-245 from human neutrophils is a glycoprotein. *Biochem J* 1985, 227:783–788.
47. Carlson ED, Gan R, Hodgman CE, Jewett MC: Cell-free protein synthesis: applications come of age. *Biotechnol Adv* 2012, 30:1185–1194.
48. Wallach TM, Segal AW: Analysis of glycosylation sites on gp91phox, the flavocytochrome of the NADPH oxidase, by site-directed mutagenesis and translation in vitro. *Biochem J* 1997, 321 (3):583–585.

49. Yu L, DeLeo FR, Biberstine-Kinkade KJ, Renee J, Nauseef WM, Dinauer MC: Biosynthesis of flavocytochrome b558 . gp91(phox) is synthesized as a 65-kDa precursor (p65) in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1999, 274:4364–4369.
50. Ezzine A, Souabni H, Bizouarn T, Baciou L: Recombinant form of mammalian gp91(phox) is active in the absence of p22(phox). *Biochem J* 2014, 462:337–345.
51. Kleinberg ME, Rotrosen D, Malech HL: Asparagine-linked glycosylation of cytochrome b558 large subunit varies in different human phagocytic cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 1989, 143:4152–4157.
52. Paclét MH, Coleman AW, Burritt J, Morel F: NADPH oxidase of Epstein-Barr-virus immortalized B lymphocytes. Effect of cytochrome b(558) glycosylation. *Eur J Biochem FEBS* 2001, 268:5197–5208.
53. Björgvinsdóttir H, Zhen L, Dinauer MC: Cloning of murine gp91phox cDNA and functional expression in a human X-linked chronic granulomatous disease cell line. *Blood* 1996, 87:2005–2010.
54. Matsumoto M, Katsuyama M, Iwata K, Ibi M, Zhang J, Zhu K, Nauseef WM, Yabe-Nishimura C: Characterization of N-glycosylation sites on the extracellular domain of NOX1/NADPH oxidase. *Free Radic Biol Med* 2014, 68:196–204.
55. DeLeo FR, Burritt JB, Yu L, Jesaitis AJ, Dinauer MC, Nauseef WM: Processing and maturation of flavocytochrome b558 include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly. *J Biol Chem* 2000, 275:13986–13993.
56. Biberstine-Kinkade KJ, DeLeo FR, Epstein RI, LeRoy BA, Nauseef WM, Dinauer MC: Heme-ligating histidines in flavocytochrome b(558): identification of specific histidines in gp91(phox). *J Biol Chem* 2001, 276:31105–31112.

Discussion/perspectives

Développer une nouvelle approche thérapeutique pour soigner les patients atteints de CGD est actuellement un enjeu majeur, et cela, afin de remplacer la prophylaxie antibiotique et antifongique journalière et ainsi diminuer les effets secondaires tels que l'apparition de résistances ou d'atteintes rénales. De plus, la cause majeure de décès des patients CGD est l'infection pulmonaire qui est très souvent réfractaire au traitement antibiotique même par voie intraveineuse. La thérapie protéique par les protéoliposomes se présente donc comme une solution alternative de choix du fait de la sécurité et l'efficacité des liposomes qui ont déjà fait leurs preuves pour la vectorisation de molécules de chimiothérapie notamment (Tila et al., 2015). De même, d'autres applications des protéoliposomes présentées dans la partie Introduction (cf Chapitre III.4.4) montrent que leur utilisation en clinique chez l'Homme est envisageable dans un futur proche.

Les protéoliposomes que nous développons sont destinés aux patients atteints des formes génétiques CGDX et CGDAR22 (plus de 70 % des cas de CGD) pour lesquels le cytochrome b_{558} membranaire est déficient. Pour la forme autosomique CGDAR47 touchant la sous-unité cytosolique $p47^{phox}$ et représentant 25 % des cas de CGD, une autre technique de vectorisation de protéines utilisant les propriétés physicochimiques des CPP (*cell-penetrating peptides*) est actuellement en cours de développement au laboratoire. Cette dernière pourra être étendue à l'autre forme génétique de la CGD de transmission autosomique récessive, la CGDAR67.

Les résultats présentés dans ce mémoire démontrent la faisabilité de cette nouvelle approche et l'efficacité des liposomes NOX2/ $p22^{phox}$ pour restaurer l'activité NADPH oxydase des macrophages CGDX⁰ *in cellulo*. En partant de la technologie développée en 2007 utilisant un CFPS basé sur des extraits d'*E. coli* et l'ajout de liposomes dans le milieu réactionnel (Marques et al., 2007), la start-up Synthelis a su optimiser les conditions du milieu réactionnel du système acellulaire pour aboutir à la formation de protéoliposomes contenant le cytochrome b_{558} complet avec intégration des hèmes. La présence des deux sous-unités dans les protéoliposomes a bien été validée (SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie et Western blot). Si la forme $p22^{phox}$ est bien détectée à une masse molaire d'environ 20-25 kDa, NOX2 semble migrer aux alentours de 55 kDa en SDS-PAGE. Le système *E. coli* n'est en effet pas capable de réaliser les modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation contrairement aux systèmes d'expression cellulaires comme baculovirus/cellules d'insectes ou des levures (*Pichia pastoris*) (Carlson et al., 2012). Celles-ci ne sont cependant nécessaires ni pour l'assemblage du dimère NOX2- $p22^{phox}$, ni pour l'intégration des hèmes, ni pour l'activité de l'enzyme (Kleinberg et al., 1989; Pacllet et al., 2001b). Le spectre est un bon « contrôle de qualité » de la production de protéoliposomes actifs puisque seuls les liposomes

possédant un spectre correct avec les deux pics caractéristiques à 426 nm et 558 nm présentent une activité NADPH oxydase *in vitro* dans un système acellulaire reconstitué recombinant. Ce système d'expression acellulaire est donc très efficace en termes de rendement mais également de temps, et il est peu coûteux et très facile d'utilisation. De plus, afin d'améliorer l'efficacité de production de FRO par le *cytb*₅₅₈, l'ADNc codant la protéine NOX2 utilisé porte la mutation R199Q qui améliore de 4-8 fois la production de FRO (Li et al., 2005). Il serait toutefois intéressant de produire des protéoliposomes contenant la forme non mutée de NOX2 pour analyser l'activité "normale" par rapport à celle "optimisée". De même, la spécificité de l'activité NADPH oxydase devra être démontrée par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques tels que la SOD (superoxyde dismutase) et le DPI (diphénylene iodonium). La caractérisation *in vitro* des protéoliposomes est encore incomplète à ce stade de la rédaction et d'autres analyses viendront prochainement compléter ce travail. Nous envisageons par exemple de déterminer la taille des protéoliposomes à l'aide de la technique de *Dynamic Light Scattering* (DLS), ce qui nous permettra d'évaluer leur stabilité et leur devenir dans l'organisme en vue d'une utilisation pré-clinique future.

L'un des obstacles majeurs de la technique de production est la stérilité des produits obtenus. Différentes techniques employées pour stériliser les échantillons (filtration, centrifugation) ont conduit à la production de protéoliposomes inactifs. Il est donc très difficile de trouver une condition optimale afin d'obtenir des protéoliposomes stériles ET actifs, et ce point reste encore à améliorer. Dans un second temps de ce travail, nous avons montré que les liposomes NOX2/p22^{phox} n'induisent aucune toxicité et sont capables de délivrer le *cytb*₅₅₈ à la membrane des macrophages cibles après 24h d'incubation, ce qui est très prometteur pour une application clinique future. La quantification du niveau de restauration de l'activité NADPH oxydase n'a pas été réalisée pour l'instant mais sera réalisée à l'aide d'une méthode plus quantitative (test NBT quantitatif, chimiluminescence, AmplexRed) (Dupré-Crochet et al., 2013; Maghzal et al., 2012).

La finalisation de cette démonstration de faisabilité sur les macrophages CGDX⁰ et donc la soumission de l'article est prévue pour début 2016. C'est la première fois que la reconstitution d'un complexe NADPH oxydase fonctionnel est démontrée dans des cellules phagocytaires déficientes. Nous envisageons également de valider la restauration de l'activité NADPH oxydase dans les neutrophiles CGDX⁰ ainsi que dans les neutrophiles et macrophages modélisant la forme CGDAR22.

Ce travail est très prometteur dans le développement d'une nouvelle approche de thérapie protéique pour la CGD. De nombreuses perspectives sont envisagées, notamment la démonstration de l'efficacité de cette approche thérapeutique *in vivo*. Des souris CGD KO *CYBB* modélisant la forme CGDX⁰ ont été très utilisées pour le développement des approches de thérapie génique (Pollock et al., 1995). Ces souris seraient donc utiles pour étudier les propriétés thérapeutiques des

protéoliposomes vis-à-vis d'infections provoquées (bactérienne avec *Pseudomonas aeruginosa*, ou fongique avec *Aspergillus fumigatus*). En effet, les infections fongiques pulmonaires sont la première cause de mortalité des patients atteints de CGD (van den Berg et al., 2009). La voie d'administration par instillation intranasale serait donc tout particulièrement adaptée pour protéger/soigner les patients localement vis-à-vis des infections pulmonaires (Kuzmov and Minko, 2015). Par contre, cela nécessitera une formulation galénique adaptée, sous la forme d'aérosols par exemple, et éventuellement une fonctionnalisation des protéoliposomes avec du polyéthylène glycol (PEG) pour les rendre plus furtifs vis-à-vis du système immunitaire et améliorer leur stabilité. Des études complémentaires de biodisponibilité et d'innocuité seront également à mettre en œuvre dans le modèle souris CGDX. Enfin, l'utilisation de cette approche en traitement préventif ou curatif sera également à étudier dans ce modèle murin ainsi que le rythme d'administration et le dosage.

A plus long terme, cette thérapie protéique, que l'on pourrait également appeler « enzymothérapie substitutive liposomale », pourrait un jour jouer un rôle important dans l'arsenal thérapeutique des patients CGD, tout comme les patients souffrant de maladies de surcharge (ex : maladies de Pompe et de Fabry dues à des déficits en enzymes α -glucosidase et α -galactosidase respectivement) qui bénéficient actuellement de traitements enzymatiques avec une autorisation de mise sur le marché (AMM).

Génération de souris humanisées à partir de cellules iPS

Introduction du travail

Pour développer de nouveaux traitements de la CGD comme nous l'avons décrit précédemment, il est nécessaire de disposer de modèles animaux performants mimant parfaitement la maladie. Il existe 5 formes génétiques de CGD, la plus fréquente est de transmission liée à l'X (CGDX, 70 % des cas) et les autres de transmission autosomale récessive (CGDAR47 (25 % des cas), CGDAR22, CGDAR67 et CGAR40). Or, il n'existe actuellement de modèles murins que pour 3 formes génétiques : CGDX (Pollock et al., 1995), CGDAR47 (Jackson et al., 1995) et CGDAR22 (Nakano et al., 2008). Ces modèles animaux se sont révélés très utiles à la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la maladie ainsi qu'à l'évaluation de nouvelles thérapeutiques telles que la thérapie génique. Mais ils ont également des limites puisqu'ils ne modélisent pas parfaitement la physiologie humaine et ne peuvent donc pas toujours prédire les réactions du système immunitaire humain vis-à-vis d'un nouveau médicament.

Les souris humanisées possédant un système hématopoïétique humain sont donc à l'heure actuelle le « must to have tool » pour les études pré-cliniques et pour le screening de nouvelles molécules thérapeutiques (Ito et al., 2012). Elles peuvent être obtenues par transplantation de cellules souches/progénéteurs hématopoïétiques (CSPH) CD34⁺ (issues de sang de cordon, de tissus fœtaux ou du sang circulant après mobilisation par du G-CSF) dans des souris immunodéficientes (cf Chapitre II.4). Mais pour créer des souris humanisées modélisant une pathologie hématologique/immunitaire donnée, la seule solution serait de prélever les CSPH CD34⁺ issues du sang des patients eux-mêmes. Or, la quantité de CSPH CD34⁺ circulante est trop faible et leur nombre est difficilement amplifiable. De plus, lorsqu'elles sont cultivées trop longtemps elles perdent alors leur potentiel de cellule souche. La seule alternative actuellement serait d'utiliser des cellules CD34⁺ différenciées à partir de cellules souches iPS. A ce jour seules deux équipes ont réussi à produire des cellules CD34⁺ capables de prise de greffe et de reconstitution multi-lignée (érythroïde, myéloïde et lymphoïde) à long terme grâce à la formation de tératomes (Amabile et al., 2013; Suzuki et al., 2013). La preuve de concept est donc établie mais les taux de reconstitution restent très faibles.

Notre objectif est donc de produire, à partir des cellules iPS humaines, des CSPH CD34⁺ capables de prise de greffe et de reconstitution hématopoïétique afin de générer des souris humanisées WT mais également CGDX, CGDAR22, CGDAR47 et CGDAR67. Les modèles humanisés CGDX et CGDAR22 nous permettront notamment d'évaluer *in vivo* la thérapie protéique utilisant

les protéoliposomes que nous développons actuellement (cf Article 2). Les autres modèles seront utilisés pour le développement d'autres approches thérapeutiques développées au laboratoire.

Dans cette troisième partie du travail expérimental effectué au cours de cette thèse, nous présenterons les protocoles de différenciation hématopoïétique des cellules souches iPS en CSPH CD34⁺ mis en œuvre pour atteindre deux objectifs :

1) la mise en place d'un protocole efficace permettant la production de grandes quantités de progéniteurs CD34⁺ pour l'obtention de neutrophiles et macrophages modèles (cf Article 1) ; seuls les résultats obtenus pour la lignée iPS WT seront présentés dans cette partie ;

2) la production de CSPH CD34⁺ capables de prise de greffe et reconstitution hématopoïétique pour la génération de souris HIS.

Pour une meilleure compréhension et pour simplifier l'interprétation des résultats obtenus au cours de ce travail, des éléments de discussion seront apportés au fur et à mesure de la présentation des résultats. Puis le matériel et méthodes spécifique ayant servi pour la réalisation de ces expériences sera décrit. Enfin, nous finirons par une discussion globale de cette partie et nous aborderons les pistes à explorer pour améliorer les expériences de transplantation réalisées dans ce travail.

Résultats

1. Optimisation quantitative de la production de progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺

Dans la littérature, deux principales techniques sont utilisées pour produire des progéniteurs CD34⁺ à partir des cellules iPS et pour induire leur différenciation terminale en neutrophiles et/ou macrophages. Nous avons donc testé la technique de formation des corps embryoides ainsi que des techniques utilisant le système de coculture avec la lignée stromale murine OP9.

1.1 Protocole « Yokoyama » : EBs pendant 16 jours en suspension

Yokoyama *et al.* ont été les premiers à décrire un protocole efficace permettant la production de neutrophiles avec une pureté de 70-80 % à partir de cellules ES humaines (Yokoyama et al., 2009). Ce protocole s'est également révélé efficace à partir de cellules iPS humaines (Zou et al., 2011b), c'est pourquoi nous avons choisi de le tester. A partir de nos cellules iPS humaines, nous avons donc formé des corps embryoides qui ont ensuite été cultivés en suspension pendant 16 jours en présence de BMP4, SCF, Flt3L, TPO, IL6 et IL3. Puis nous avons analysé le phénotype et le potentiel hématopoïétique des cellules issues des EBs J16 (Figure 21).

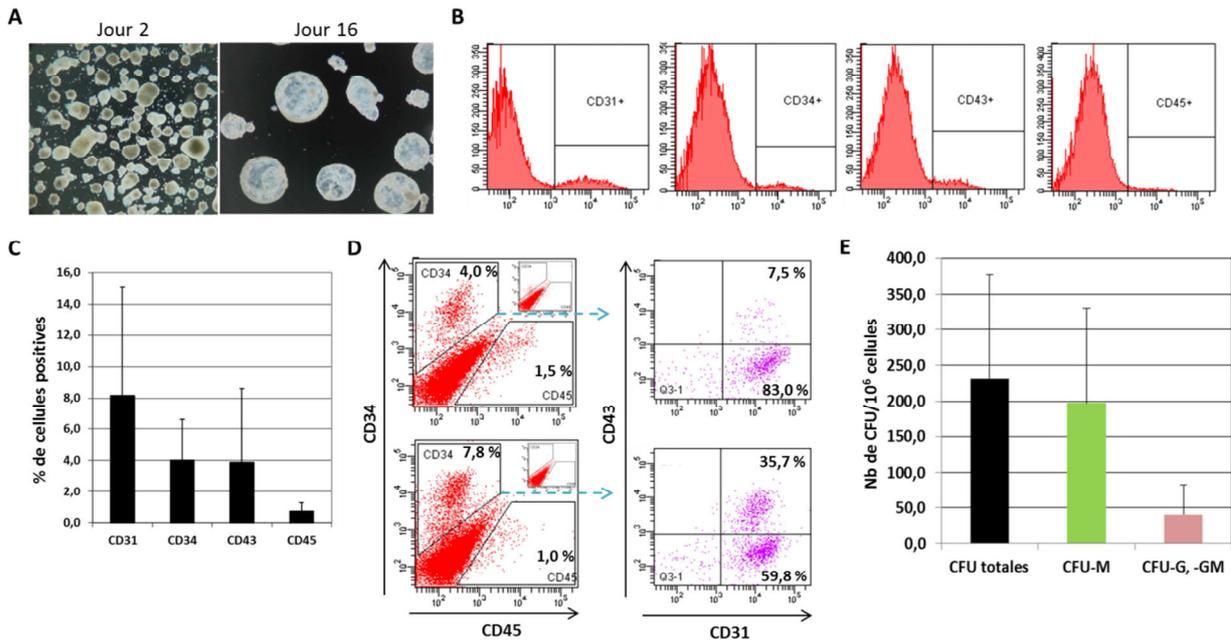


Figure 21. Formation des corps embryoides et analyse phénotypique et fonctionnelle après 16 jours de culture en présence de cytokines. A) Evolution de la morphologie des corps embryoides après 2 jours et après 16 jours de culture en suspension. B) Graphiques montrant l'expression des marqueurs CD31, CD34, CD43 et CD45 après 16 jours de culture des corps embryoides. C) Analyse des proportions de cellules positives pour les marqueurs CD31, CD34, CD43 et CD45 (n=9 expériences). D) Dot plots montrant l'expression des marqueurs CD34/CD45 (contrôle isotypique dans l'encart en haut à droite), et analyse de l'expression des marqueurs CD43 et CD31 par les cellules CD34⁺CD45⁻ (en violet). E) Histogramme donnant le nombre de CFU obtenues pour 10⁶ cellules mises en culture dans de la méthylcellulose (sans EPO), ainsi que la répartition en CFU-M ou CFU-G et -GM (n=8).

Comme le montre la Figure 21A, au fur et à mesure de la différenciation, la morphologie des corps embryoides évolue et devient « bulleuse » ou « cystique ». Au 16^{ème} jour, la dissociation de ces corps embryoides révèle la présence de cellules exprimant les marqueurs CD31, CD34, CD43 ou CD45 (Figure 21B). Cette expérience réalisée à 9 reprises a montré de façon systématique la présence de cellules CD34⁺ bien que la proportion retrouvée soit variable (4 % ± 2,6 %) (Figure 21C). Une analyse plus précise de ces cellules CD34⁺ montre qu'elles sont majoritairement CD31⁺CD45⁻ (Figure 21D). Par contre, en ce qui concerne le marqueur CD43, son expression est variable et est la plupart du temps faible dans les cellules CD34⁺ (7,5 % sur l'exemple montré ici (panel haut), 7 expériences sur 9) bien qu'elle puisse parfois atteindre près de 36 % des cellules CD34⁺ (2 expériences sur 9 (panel bas)) (Figure 21D). Il semble donc que dans la majorité des cas nous obtenions des cellules de type endothélial CD34⁺CD31⁺CD43⁻CD45⁻, et dans moins de 20 % des expériences, nous produisons des cellules hématopoïétiques CD34⁺CD31⁺CD43⁺CD45⁻ tel que défini par (Vodyanik et al., 2005).

En parallèle de cette analyse phénotypique, nous avons analysé *in vitro* le potentiel hématopoïétique des cellules contenues dans les EB J16 à l'aide du test des CFC (Figure 21E). En moyenne, entre 200 et 250 CFU peuvent être obtenues à partir de 1x10⁶ cellules issues des corps embryoides (Figure 21E). Mais aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre le nombre de colonies obtenues et le nombre de cellules CD34⁺ ou le phénotype CD34⁺CD43⁺CD45^{+/-}. La majorité des CFU obtenues sont de type macrophagique (CFU-M) et représentent 85 % des CFU, alors que les colonies granulocytaires (CFU-G et -GM) représentent à peine 15 % des colonies (Figure 21E). Des colonies de type érythroïde ne sont pas obtenues puisque la méthylcellulose utilisée ne contient pas d'érythropoïétine.

En termes de rendement, il faut 15-30x10⁶ cellules iPS pour obtenir en moyenne 2,7x10⁶ cellules dissociées à partir des EBs J16, ce qui donnerait à peine 1x10⁵ cellules CD34⁺ (pour une proportion moyenne de 4 %). Cela représente donc moins de 1 cellule CD34⁺ obtenue à partir de 100-150 cellules iPS. **Cette technique est donc peu efficace en termes de quantité de cellules CD34⁺ produites.**

Discussion des résultats du protocole « Yokoyama »

Avant de démarrer les protocoles de différenciation hématopoïétique, nous nous sommes d'abord intéressés aux différentes techniques de formation des corps embryoides. Nous avons ainsi testé la technique manuelle par simple décollement des colonies iPS et culture en suspension, mais également des techniques plus complexes comme le *hanging drop*, le *spin*, des plaques dédiées AggreWell™ (StemCell Technologies) et une technique en méthylcellulose 1 % en plaque 96 puits. Bien que les résultats n'aient pas été détaillés ici, la technique manuelle reste la plus simple à mettre en œuvre et la plus efficace en termes de formation d'EBs, c'est donc celle que nous avons utilisée dans ces expériences, et également celle utilisée dans ces deux articles (Yokoyama et al., 2009; Zou

et al., 2011b). Par contre, il est à noter qu'elle conduit à la formation d'EBs de taille relativement hétérogène, ce qui peut apporter une certaine variabilité dans l'efficacité de la différenciation.

Aucun des deux articles utilisés comme référence n'a analysé le phénotype des cellules issues des EBs après 16-17 jours de culture en suspension (Yokoyama et al., 2009; Zou et al., 2011b). Cependant, nos résultats sont comparables avec ceux de l'article de Zambidis *et al.* qui montrent un pic de production de cellules CD34⁺ à J15-20 (environ 6 %) alors que 1-3 % seulement de cellules CD45⁺ sont produites à cette même période à partir de cellules hES (Zambidis et al., 2005). Ils n'ont cependant utilisé aucunes cytokines pour induire la différenciation des EBs. Ainsi, lorsque les EBs issus de cellules hES humaines (Chadwick et al., 2003) ou d'iPS humaines (Lengerke et al., 2009) sont cultivées avec du SCF, Flt3L, BMP4, IL3, IL6 et G-CSF pendant 15 ou 17 jours respectivement, plus de 25 % de cellules CD34⁺ et 10 % de cellules CD45⁺ peuvent être obtenues. La faible efficacité de notre protocole de différenciation pourrait être due aux cytokines et concentrations différentes employées. L'autre hypothèse serait une cinétique de maturation différée à partir de notre lignée de cellules iPS. En effet, la population CD45⁺ apparaît après J15 dans leur protocole et s'accompagne d'une augmentation du potentiel hématopoïétique (test des CFC) (Chadwick et al., 2003). Après 16 jours de culture, les cellules CD34⁺ produites avec notre protocole sont principalement de phénotype CD34⁺CD31⁺CD43⁻CD45⁻ généralement associé au type endothélial (Vodyanik et al., 2005), bien que des cellules de phénotype hématopoïétique CD34⁺CD31⁺CD43⁺CD45⁻ soient également obtenues. Il est donc possible que dans nos conditions, la maturation en progéniteurs CD34⁺CD43⁺CD45⁺ se produise après 16 jours. Il sera donc envisagé de renouveler prochainement cette expérience en modifiant le cocktail de cytokines et/ou en analysant la cinétique d'apparition des progéniteurs hématopoïétiques à partir de J5 jusqu'à J25. Bien que nous n'ayons pas testé le potentiel de prise de greffe *in vivo* de ces cellules CD34⁺ issues des EBs J16, des analyses complémentaires pourraient s'avérer très intéressantes en vue de notre second objectif, l'obtention de souris humanisées.

1.2 Cocultures iPS/OP9

Comme montré par Vodyanik *et al.* en 2005, les cellules OP9 issues de souris déficientes en M-CSF sont les cellules stromales les plus efficaces pour induire la différenciation des cellules souches pluripotentes (Vodyanik et al., 2005). Cependant, un très grand nombre de protocoles différents par les milieux de culture, les cytokines ajoutées, la durée, etc. sont publiés dans la littérature. Parmi ceux-ci, trois nous ont semblés plus particulièrement pertinents, notamment car ils ont permis la production de progéniteurs CD34⁺ capables de donner naissance à cellules hématopoïétiques matures neutrophiles et/ou macrophages, ce qui était l'objectif principal du travail de thèse. Les conditions de culture optimales pour induire la différenciation hématopoïétique des cellules iPS ont donc été déterminées en testant trois protocoles : le premier utilisant de l'acide ascorbique (AA)

(Choi et al., 2009b), le second du VEGF (Morishima et al., 2011), et le troisième du BMP4 pendant 4 jours puis du VEGF et SCF pendant 2 jours et enfin un mélange de SCF, TPO, IL3, Flt3L et G-CSF (Niwa et al., 2011). Des cocultures iPS/OP9 avec du milieu seul ont été utilisées comme contrôle. Les cellules produites ont été analysées par cytométrie en flux après 7, 10 ou 13 j de culture (Figure 22).

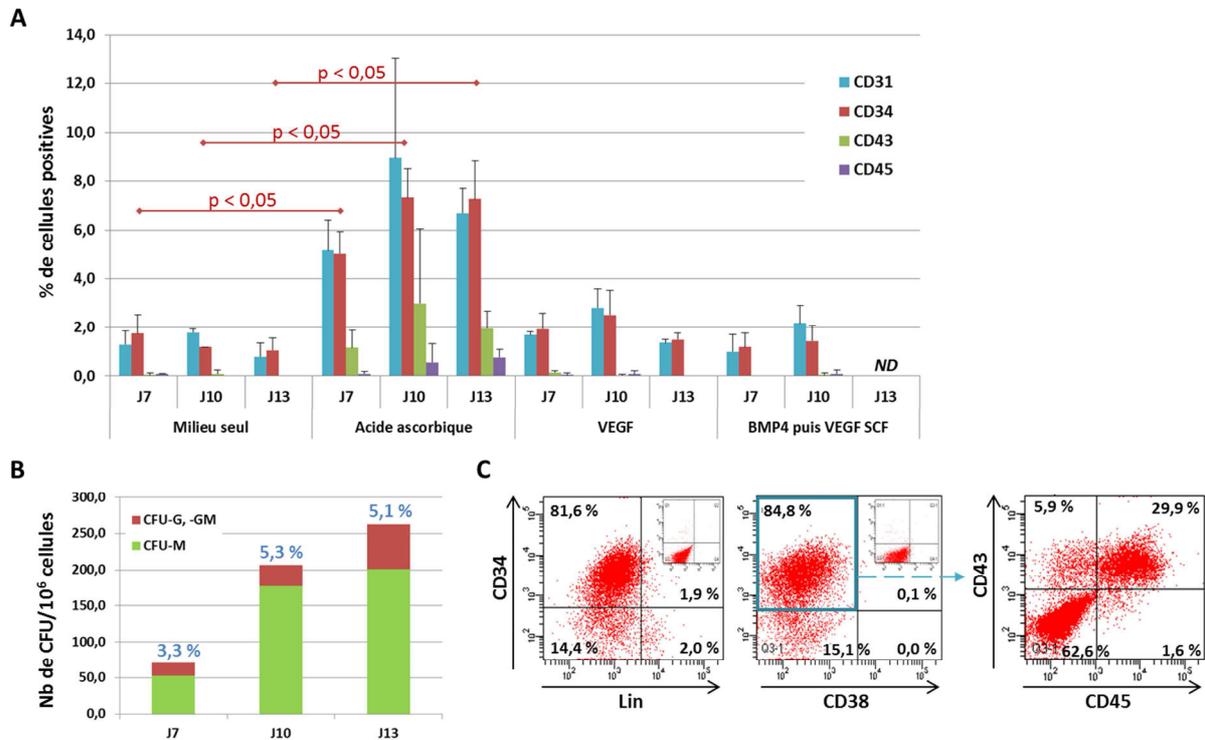


Figure 22. Influence des cytokines et de la durée de culture sur la différenciation hématopoïétique dans le système de coculture iPS/OP9. A) Analyse par cytométrie en flux des proportions de cellules positives pour les marqueurs CD31, CD34, CD43 ou CD45 lors de la culture sans cytokines (n=3), avec acide ascorbique (+ AA) (n=3 ou 4), avec BMP4 (n=2 à 4), ou avec BMP4 pendant 4j puis SCF et VEGF pendant 2j puis SCF, TPO, IL3, Flt3L et G-CSF (n=2). ND = non déterminé ; p < 0,05. B) Histogramme montrant, pour la condition de culture avec acide ascorbique, le nombre de CFU obtenues pour 10⁶ cellules mises en culture dans de la méthylcellulose, ainsi que la répartition en CFU-M, et CFU-G ou -GM (n=1). La proportion de cellules CD34⁺ dans la population analysée est indiquée en bleu. C) Analyse par cytométrie en flux de la maturation des cellules CD34⁺ isolées à partir des cocultures iPS/OP9 J10 (+AA) : dot plots montrant la co-expression du marqueur CD34 avec les marqueurs Lin (à gauche) ou CD38 (au milieu) (contrôle isotypique en haut à droite pour chaque marqueur). Sélection de la population CD34⁺CD38⁻ puis analyse de l'expression des marqueurs CD43 et CD45 sur cette population.

Comme le montre la Figure 22A, l'ajout d'acide ascorbique (+ AA) permet d'améliorer la quantité de cellules CD34⁺ produites avec une moyenne de 7,3 % (± 1,2) à J10. Dans cette condition, on peut également observer une maturation progressive avec l'augmentation de la proportion de cellules CD45⁺ de J7 à J13. De façon évidente, les autres conditions (contrôle, VEGF ou BMP4/VEGF/SCF...) sont moins efficaces pour induire la différenciation hématopoïétique des cellules iPS (Figure 22A).

Pour vérifier le potentiel hématopoïétique des cellules après 7, 10 ou 13 jours de coculture iPS/OP9 en présence d'AA, les cellules issues des cocultures ont été mises en culture en méthylcellulose en présence de cytokines (sans EPO) (Figure 22B). Dans cette expérience, le pourcentage de cellules CD34⁺ était de 3,3 %, 5,3 % et 5,1 % à J7, J10 et J13 respectivement (comme indiqué en bleu sur le graphique 22B). Ainsi, malgré une quantité équivalente de cellules CD34⁺ mises en culture à J10 et

J13, il semble qu'il y ait un plus grand nombre de colonies obtenu à J13 par rapport à J10 (250 versus 200).

Afin de mieux analyser le degré de maturation des cellules CD34⁺ produites après 10 jours de coculture iPS/OP9, les cellules CD34⁺ ont été isolées par tri magnétique et l'expression des marqueurs Lin, CD38, CD43 et CD45 a été analysée par cytométrie en flux (Figure 22C). Après tri magnétique, l'analyse phénotypique des cellules CD34⁺ montre qu'elles sont en majorité Lin⁻CD38⁻ (95 % des cellules) (Figure 22C). De plus, 30 % des cellules CD34⁺CD38⁻ sont également CD43⁺CD45⁺ (Figure 22C).

A partir de 10-15x10⁶ cellules iPS et après 10 jours de culture en présence d'acide ascorbique uniquement, il est théoriquement possible de produire en moyenne 1,1x10⁶ cellules CD34⁺ (si on considère une proportion moyenne de 7,3 % de cellules CD34⁺ comme présenté dans la figure 22A). Nous avons également montré que les cellules CD34⁺ isolées peuvent être congelées puis décongelées sans perdre leur potentiel hématopoïétique (cf Article 1).

La technique de coculture iPS/OP9 en présence d'acide ascorbique est plus efficace et plus rapide que les techniques utilisant les corps embryoïdes. Son avantage majeur est son faible coût et surtout sa mise à l'échelle facile pour obtenir plusieurs millions de cellules CD34⁺. Ces cellules nous ont ainsi permis de produire les neutrophiles et macrophages présentés dans l'Article 1.

De plus, le profil phénotypique et fonctionnel des cellules CD34⁺ produites étant très intéressant, leur potentiel de prise de greffe a été testé *in vivo* au cours de l'essai de Transplantation n°1 (partie résultats 2.1).

Discussion des résultats des cocultures iPS/OP9

Dans le protocole publié par Niwa *et al.*, les cellules CD34⁺ apparaissent après 4 jours de culture, les cellules CD43⁺ après 6 jours, et les cellules CD45⁺ après 10 jours en condition de culture sans sérum ni cellules stromales (Niwa *et al.*, 2011), ce qui est comparable aux résultats que nous avons obtenu avec sérum et en présence de cellules stromales (Figure 22A). Cependant, ce protocole est peu efficace en termes de rendement de progéniteurs CD34⁺ (1,5 % à J10) et nous n'avons donc pas réalisé d'analyses supplémentaires. En parallèle, nous avons testé le protocole établi par Morishima *et al.* pour la génération de progéniteurs hématopoïétiques puis neutrophiles matures (Morishima *et al.*, 2011). Après 10 jours de culture en présence de VEGF, nous obtenons une moyenne de 2,5 % cellules CD34⁺ (± 1,0 %, n=4) (Figure 22A) alors qu'eux avaient obtenu des proportions d'environ 7 à 12 % de cellules CD34⁺. **Dans nos conditions de culture, ces deux protocoles sont donc moins efficaces que les résultats publiés.**

Finalement, l'ajout d'AA dans les cocultures iPS/OP9 s'est révélé la technique la plus efficace en termes de rendement en cellules CD34⁺. A partir de 7 lignées iPS différentes, Choi *et al.* avaient obtenu 1,9 % à 16,1 % de cellules CD43⁺ après 8 jours de coculture (Choi et al., 2009b) alors que nous nous situons plutôt à 3 % de cellules CD43⁺ à J10. Comme déjà remarqué par d'autres équipes, le pic de différenciation hématopoïétique est plus précoce en système de coculture que dans les EBs (Vodyanik et al., 2005) puisque des cellules CD45⁺ apparaissent avant le 10^{ème} jour de coculture (Figure 22C).

Certains facteurs pouvant expliquer une plus faible efficacité des protocoles de différenciation par rapport aux données de la littérature seront discutés ci-après.

1.3 Discussion sur les facteurs pouvant influencer la différenciation hématopoïétique

Plusieurs facteurs peuvent expliquer la difficulté à produire des cellules souches hématopoïétiques à partir de nos cellules iPS mais également à partir des lignées iPS d'autres laboratoires (Wang et al., 2005c) :

- le **type cellulaire d'origine** : des cellules iPS de différentes origines peuvent posséder un potentiel de différenciation différent (Niwa et al., 2009; Reimer et al., 2012; Xu et al., 2012). Par exemple, les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse seraient plus efficaces que les fibroblastes pour produire des cellules iPS capables de donner naissance à des cellules CD34⁺ dans un système d'EBs (Xu et al., 2012). Nous possédons actuellement une lignée de cellules iPS BC1 issues de la reprogrammation de cellules CD34⁺ de la moelle osseuse grâce à un vecteur épisomal plasmidique EBNA1/OriP (OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC and LIN28) (Chou et al., 2011). Cette lignée utilisée en parallèle permettrait de comparer l'efficacité de la différenciation hématopoïétique de nos lignées issues de fibroblastes.

- la **méthode de reprogrammation** utilisée pour produire les cellules iPS pourrait également jouer un rôle bien que Choi *et al.* n'aient montré aucune corrélation entre l'origine des fibroblastes ou le nombre de facteurs de transcription utilisés sur l'efficacité de la différenciation hématopoïétique (Choi et al., 2009b). Nous avons récemment développé au laboratoire une technique de reprogrammation non virale et non intégrative utilisant des plasmides épisomiques (Okita et al., 2013). Nous souhaiterions donc étudier la différenciation hématopoïétique dans nos lignées iPS rétrovirales *versus* épisomales (sur les mêmes fibroblastes donneurs) pour voir l'influence de la technique de reprogrammation. De façon surprenante, nous avons noté un léger retard de maturation pour les deux lignées iPS épisomales (CGDAR22 et CGDAR47) par rapport aux deux lignées iPS rétrovirales (WT et CGDX) (données non présentées), l'influence de la méthode de reprogrammation sera donc à analyser plus précisément.

- le **potentiel intrinsèque de la lignée iPS** : toutes les lignées iPS ne possèdent pas le même potentiel hématopoïétique à cause de variations génétiques et épigénétiques intrinsèques (Mills et al., 2013). Alors que l'étude de Mills *et al.* a montré que deux clones de la même origine avaient le même potentiel, d'autres équipes ont montré que deux lignées iPS issues du même donneur et avec la même technique de reprogrammation peuvent avoir un potentiel de différenciation hématopoïétique différent mais qui pourrait s'expliquer, dans le cas de la reprogrammation par une méthode rétrovirale, d'une expression des FT ou d'une intégration dans des sites du génome liés au développement hématopoïétique (Choi et al., 2009b; Inoue et al., 2011). Produire 3-4 clones à partir d'un même donneur pourrait donc permettre de sélectionner une lignée avec un bon potentiel hématopoïétique. Nous possédons au moins 2 clones pour chaque lignée iPS mais aucune différence n'a pu être observée entre les deux clones d'une même lignée (cf Article 1).

- les **conditions de culture des cellules iPS** (avec ou sans cellules nourricières) peuvent influencer leur potentiel de différenciation. Il a d'ailleurs été montré que la culture des iPS sur MEFs est préférable pour initier la formation d'EBs pour la différenciation hématopoïétique (Kardel and Eaves, 2012). Toutes nos cellules iPS sont actuellement cultivées sur MEFs, mais nous sommes également capables de les maintenir dans un état indifférencié sur des supports matriciels comme le Matrigel™ (BD Biosciences) ou la Vitronectine XF™ (StemCell Technologies).

- la **technique de différenciation** : comme nous avons pu le voir dans la première partie de ces résultats, le type de protocole mis en œuvre influence fortement la différenciation des cellules iPS et différents types de cellules CD34⁺ avec des potentiels hématopoïétiques *in vitro* variés notamment peuvent être produits.

2. Production de CSPH CD34⁺ pour la génération de souris humanisées

Lors de la dernière année de thèse, nous avons tenté de produire des CSPH capables de prise de greffe et de reconstitution hématopoïétique *in vivo* après transplantation dans des souris immunodéficientes afin de générer des souris humanisées HIS. Au total, quatre essais de transplantation ont été réalisés dont un est encore en cours. Les trois premiers essais ont été réalisés en collaboration avec la start-up TransCure Biosciences (Archamps), et le quatrième avec le Pr Sophie Park (Clinique Universitaire d'Hématologie, CHU Grenoble) et le Dr Mathieu Meunier. Les caractéristiques des cellules transplantées, des souris utilisées et des résultats obtenus sont synthétisées dans le Tableau 7. Pour chaque essai, la prise de greffe a été analysée 4 mois après la transplantation en mesurant par cytométrie en flux la proportion de cellules humaines (marqueur CD45 humain *versus* CD45 murin) dans le sang périphérique, la moelle osseuse et/ou la rate comme précisé à chaque fois.

2.1 Coculture iPS/OP9 J10 + AA : Transplantation n°1

Nous avons montré précédemment que la différenciation en coculture iPS/OP9 J10 + AA permettait la production de cellules hématopoïétiques peu différenciées CD34⁺CD43⁺CD45^{+/-} capables de donner des colonies hématopoïétiques dans le test des CFC *in vitro* (Figure 22B et C). Nous avons donc réalisé avec ce protocole de différenciation un premier essai de transplantation dans des souris immunodéficientes NOG.

Les cellules issues des cocultures ont été triées ou non sur l'expression du marqueur CD34 : cellules CD34⁺ pures *versus* cellules non triées ; et trois doses ont été injectées par voie intraveineuse (veine caudale) : 100 000, 200 000 et 300 000 CD34⁺ (ou leur équivalent pour les conditions non triées) (Tableau 7). L'analyse phénotypique des cellules CD34⁺ produites pour cet essai montrait une proportion de 1,5 % de cellules CD34⁺CD43⁺CD45⁻ (soit environ 1500, 3000 et 4500 cellules transplantées pour chacune des 3 doses) et 4,5 % de cellules CD34⁺CD43⁺CD45⁺ (soit environ 4500, 9000 et 13500 cellules transplantées pour chacune des 3 doses) (résultats non présentés). Une souris est morte le jour même de l'injection (souris 5) et une autre la semaine suivante (souris 2), mais la cause de leur mort n'a pas été établie. **Aucune prise de greffe n'a pu être mise en évidence après analyse de la moelle osseuse (fémur), de la rate et du sang périphérique à 4 mois post-transplantation.**

Discussion des résultats

L'échec de ce premier essai de transplantation peut s'expliquer à la fois par la faible dose de cellules injectées et la voie d'administration utilisée. En effet, dans un article publié en 2012, Wang *et al.* avaient obtenu une prise de greffe de 6,5-9,5 % dans la moelle osseuse à 6 semaines et une reconstitution érythroïde après l'injection de 500 000 cellules CD34⁺ par voie intra-fémorale (Wang *et al.*, 2012). Ces cellules CD34⁺ étaient issues de la coculture de cellules iPS/OP9 pendant 8 jours, période à laquelle ils obtenaient des proportions de cellules CD43⁺CD31⁺ de 3,3 %, ce qui est équivalent avec les résultats obtenus dans notre protocole au jour 10 de différenciation (Figure 22A). Un autre point à prendre en compte est la présence de cellules non hématopoïétiques dans les cellules injectées et qui pourraient inhiber la prise de greffe. Cependant, il a été montré que la présence de cellules matures comme des cellules souches mésenchymateuses (CSM, ou cellules stromales murines comme OP9, S17, MS-5) pourrait avoir un rôle essentiel pour le *homing* et la prise de greffe des CSH (Bonnet *et al.*, 1999; Versteegen *et al.*, 1998). C'est la raison pour laquelle nous avons testé lors de cette transplantation l'injection de cellules CD34⁺ avec ou sans cellules stromales, et c'est probablement également la démarche d'autres équipes (Ledran *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2006).

Dans la suite du travail, d'autres marqueurs ont été étudiés afin d'améliorer la caractérisation phénotypique des cellules CD34⁺ produites : CXCR4 et CD133 exprimés par les CSH et CD38 non exprimé (marqueur de maturation) par les CSH. A l'inverse, le marqueur CD31 a été abandonné car il apportait peu d'informations supplémentaires puisqu'il était toujours exprimé par les cellules CD34⁺ (Figure 21D et 22A), et le marqueur CD43 également car, même s'il avait montré une certaine utilité pour suivre le stade de différenciation hématopoïétique (Vodyanik et al., 2006), il nous semblait peu intéressant pour définir le statut de CSH capables de prise de greffe.

2.2 Formation de tératomes et Transplantation n°2

Les deux équipes Amabile *et al.* et Suzuki *et al.* ont prouvé en 2013 que les tératomes formaient un microenvironnement propice au développement d'une niche hématopoïétique (Amabile et al., 2013; Suzuki et al., 2013). Nous avons donc étudié l'apparition de cellules hématopoïétiques CD34⁺ après formation de tératomes dans des souris immunodéficientes NOD/SCID. Trois expériences ont été réalisées, les deux premières par injection de cellules iPS seules, et la troisième par co-injection des cellules iPS avec des cellules OP9 en sous-cutané comme précisé dans le Matériel et Méthodes.

a) Tératome iPS

Expérience 1

Dans ce premier essai, des tératomes ont été formés par injection sous-cutanée de cellules iPS dans deux souris NOD/SCID. Après 6 semaines de croissance, les deux tératomes ont été dissociés et le phénotype hématopoïétique des cellules obtenues a été analysé par cytométrie en flux (Figure 23).

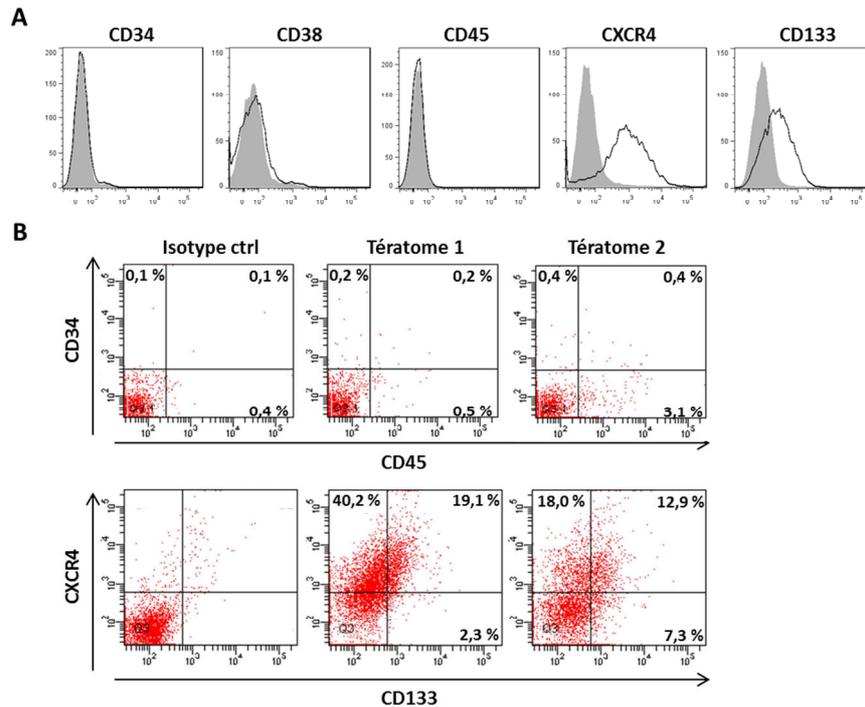


Figure 23. Analyse phénotypique par cytométrie en flux des tératomes iPS à 6 semaines de croissance. A) Graphiques montrant l'expression des marqueurs CD34, CD38, CD45, CXCR4 et CD133 pour le tératome 1 (la courbe grise représente le contrôle isotypique). B) Dot plots montrant la co-expression des marqueurs CD34/CD45 (en haut) et CXCR4/CD133 (en bas) pour le contrôle isotypique et les tératomes 1 et 2.

L'analyse phénotypique a révélé la présence de très peu de cellules CD34⁺CD45⁺ (< 0,5 %) pour les deux tératomes, bien que le tératome 2 semble contenir plus de cellules CD45⁺ (Figure 23A et B). Par contre de façon surprenante, une population exprimant les marqueurs CXCR4 et CD133 a été détectée (Figure 23A). Ces deux marqueurs sont co-exprimés par 12-20 % des cellules issues des tératomes (Figure 23B). **Pour cette première expérience, nous n'avons pas obtenu de cellules CD34⁺, et nous n'avons donc pas poursuivi l'investigation.**

Expérience 2

Afin de vérifier ces premiers résultats et de voir si une croissance plus longue des tératomes permettait d'améliorer leur différenciation hématopoïétique, une nouvelle implantation de tératomes a été réalisée dans des souris NOD/SCID et leur composition a été analysée après 7 semaines (Figure 24).

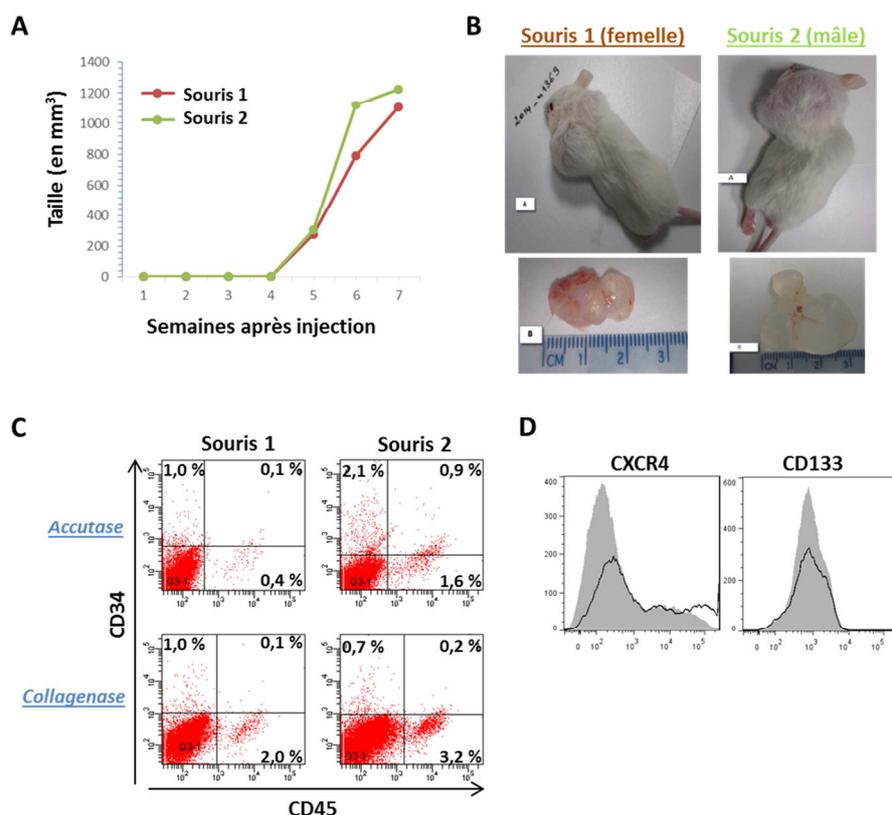


Figure 24. Développement des tératomes iPS dans des souris NOD/SCID et analyse phénotypique par cytométrie en flux des cellules issues de ces tératomes. A) Courbe de croissance des tératomes des souris 1 et 2 pendant 7 semaines après injection des cellules iPS seules. B) Images des souris 1 et 2 ainsi que des tératomes après sacrifice et dissection. C) Dot plot montrant l'expression des marqueurs CD34 et CD45 pour les 2 souris en fonction de la technique de dissociation (Accutase ou Collagénase IV pendant 1h30). D) Graphiques montrant l'expression des marqueurs CXCR4 et CD133 pour le tératome de la souris 1 dissocié avec de la Collagénase IV (la courbe grise représente le contrôle isotypique).

Le suivi de la croissance de ces tératomes montre que l'augmentation de la taille est exponentielle (Figure 24A). Les tératomes obtenus 7 semaines après l'implantation semblent vascularisés et forment des capsules liquides (Figure 24B). Dans cette expérience, nous avons comparé deux techniques de dissociation des tératomes, la première utilisant de l'Accutase comme précédemment, et la seconde de la Collagénase IV. La viabilité des cellules dissociées n'a pas été significativement améliorée avec une technique ou l'autre. Comme précédemment, peu de cellules CD34⁺ ont été obtenues (Figure 24C). Par contre, de façon surprenante, une population de cellules CD45⁺ a pu être détectée à près de 3 % pour la souris 2 (Figure 24C). Contrairement aux résultats obtenus dans l'expérience 1, très peu de cellules CXCR4⁺ et aucunes cellules CD133⁺ ne sont présentes dans les tératomes de la souris 1 (Figure 24D). Les mêmes résultats ont été obtenus pour la souris 2.

Le potentiel hématopoïétique *in vitro* des cellules présentes dans les tératomes a été analysé. Malheureusement, malgré les précautions prises, une contamination probablement lors de dissection des tératomes a rendu l'analyse impossible. Des colonies de type CFU-M ont cependant pu être détectées pour la souris 1 malgré la contamination, suggérant la présence de progéniteurs

hématopoïétiques au sein des tératomes. **Cette deuxième expérience confirme le peu d'efficacité des tératomes formés d'iPS seules à développer efficacement une hématopoïèse.**

b) Tératome iPS/OP9 : Transplantation n°2

Dans l'objectif d'améliorer la production de cellules CD34⁺, nous avons co-injecté en sous-cutané des cellules iPS avec des cellules OP9 dans des souris NOD/SCID (Amabile et al., 2013; Suzuki et al., 2013). Deux tératomes ont été implantés par souris. Les 4 tératomes obtenus ont ensuite été dissociés et les cellules rassemblées pour les analyses phénotypique et fonctionnelle (Figure 25).

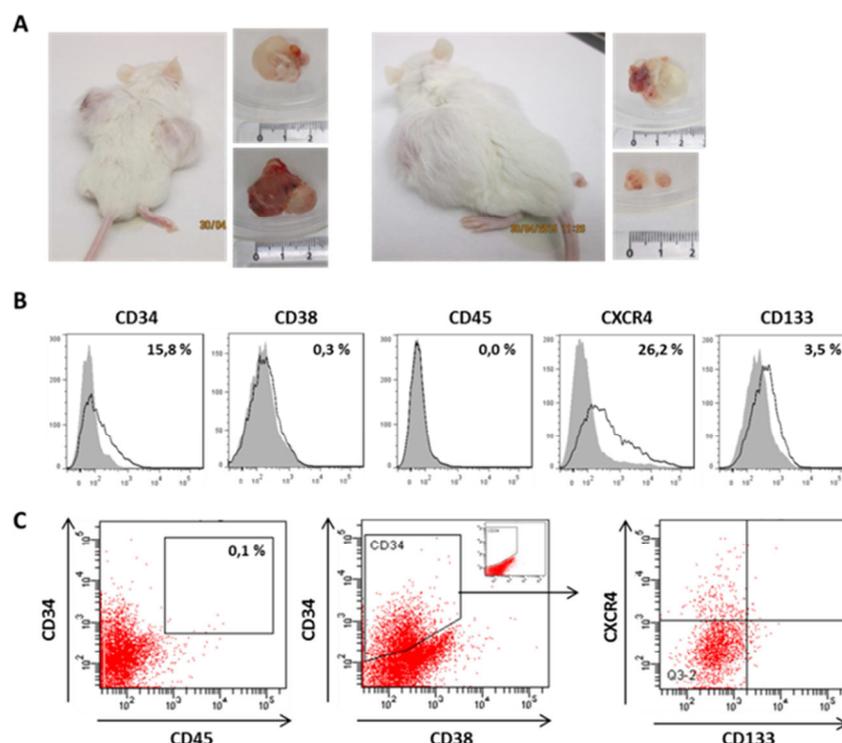


Figure 25. Formation de tératomes iPS/OP9 dans des souris NOD/SCID et analyse phénotypique par cytométrie en flux des cellules issues de ces tératomes. A) Images des deux souris ainsi que des quatre tératomes après sacrifice et dissection. B) Graphiques montrant l'expression des marqueurs CD34, CD38, CD45, CXCR4 et CD133 pour les 4 tératomes poolés (la courbe grise représente le contrôle isotypique). C) Dot plot montrant la co-expression des marqueurs CD34/CD45, CD34/CD38 (contrôle isotypique dans l'encart en haut à droite) et CXCR4/CD133 (dans la population CD34⁺).

Pour ces tératomes, 10 semaines de croissance ont été nécessaires pour atteindre une taille comparable à celle des tératomes précédents (Figure 25A). La présence des cellules OP9 semble avoir amélioré la production de cellules CD34⁺ puisque plus de 15 % de cellules CD34⁺ ont été obtenues (Figure 25B). Par contre, aucune cellule CD45⁺ n'a pu être détectée (Figure 25A et B) et des cellules CXCR4⁺ ou CD133⁺ sont à nouveau présentes (Figure 25B). L'analyse plus précise des cellules CD34⁺CD38⁻ montre qu'une faible proportion d'entre elles expriment le marqueur CXCR4 et aucune le marqueur CD133 (Figure 25C). La présence de cellules CD34⁺ étant encourageante, nous avons analysé le potentiel hématopoïétique *in vitro* des cellules issues de ces tératomes mais aucune CFU n'a été détectée.

En parallèle, nous avons analysé le potentiel hématopoïétique *in vivo* des cellules issues des tératomes par injection rétro-orbitale de 5×10^6 cellules (soit environ 8×10^5 cellules $CD34^+$) dans des souris NOG (Tableau 7). **Cependant, aucune prise de greffe n'a pu être mise en évidence au bout de 4 mois après analyse de la moelle osseuse (fémur), de la rate et du sang périphérique.**

Discussion des résultats de la formation des tératomes

La formation des tératomes par injection de cellules iPS seules est peu efficace pour induire la différenciation hématopoïétique même si lors du second essai, des cellules $CD45^+$ (mais très peu de cellules $CD34^+$) ont été mises en évidence (Figures 25 et 26), cela pouvant être dû à la croissance des tératomes pendant une semaine supplémentaire. En utilisant l'approche publiée par Amabile *et al.*, nous obtenons 0,1 % de cellules $CD34^+CD45^+$ après 10 semaines de croissance des tératomes iPS avec des cellules OP9 (Figure 25), contre 0,05 % pour Amabile *et al.* après 8 semaines de croissance des tératomes iPS/OP9-DL1 (avec 14,2 % de cellules $CD45^+$). Cependant, même en injectant une dose 80 fois supérieure en cellules $CD34^+$ (dont environ 8000 cellules $CD34^+CD45^+$) à celle d'Amabile *et al.*, aucune prise de greffe n'a pu être observée à 4 mois. Dans leur article, ils obtenaient pourtant des taux de chimérisme > 1 % dès la dose de 4000 cellules $CD34^+CD45^+$ injectées. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'échec de notre essai de transplantation. La première hypothèse est qu'il faudrait injecter une population purifiée et non, comme nous l'avons fait, toutes les cellules issues de tératomes. La seconde hypothèse est que les cellules $CD34^+$ injectées expriment peu le marqueur CXCR4 révélant un potentiel de *homing* assez faible pour aller coloniser la moelle osseuse (MO), d'autant plus que nous avons utilisé une voie d'administration rétro-orbitale (comme Amabile *et al.*). Nous pourrions essayer d'améliorer cette technique 1) en optimisant les conditions de formation des tératomes : utilisation de lignées OP9 modifiées, délivrance de cytokines hématopoïétiques humaines grâce à une pompe micro-osmotique tel que décrit par Suzuki *et al.* et isolement des cellules $CD34^+CD45^+$ humaines de la MO des souris portant les tératomes et non des tératomes eux-mêmes (Suzuki *et al.*, 2013), ou 2) en modifiant les conditions de transplantation : isolement des cellules d'intérêt ($CD34^+$ ou $CD34^+CD45^+$) et injection directe intra-fémorale dans des souris NOG ou NSG.

Malgré l'intérêt démontré de cette approche utilisant les tératomes dans la littérature, nous avons obtenu peu de résultats intéressants en termes de production de cellules progénitrices possédant un potentiel hématopoïétique *in vitro* ou *in vivo*. De plus, cette technique est contraignante et longue, peu éthique, coûteuse, et nous avons donc décidé de l'abandonner et de nous intéresser plus particulièrement aux techniques utilisant les EBs et les systèmes de cocultures.

2.3 Cocultures iPS/OP9 J4, J6, J8 : Transplantation n°3

Dans l’hypothèse où les cellules transplantées dans l’essai de Transplantation n°1 (iPS/OP9 J10 + AA) ne seraient pas assez primitives, nous avons modifié le milieu et raccourci la durée de culture. En effet, nous avons testé un milieu commercial sans sérum (dit « milieu HSC ») associé à des cytokines hématopoïétiques (BMP4, TPO, SCF, Flt3L, IL3 et IL6) pour induire la différenciation des cellules iPS. De plus, en considérant un éventuel potentiel de reconstitution hématopoïétique des cellules CD34⁺ comme cela a été décrit dans la littérature (Bhatia et al., 1998; Zanjani et al., 1998), nous avons décidé d’injecter toutes les cellules humaines issues des cocultures après tri anti-cellules murines OP9, comprenant donc à la fois les cellules CD34⁺ et les CD34⁻. La Figure 26 présente le phénotype des cellules humaines produites à J4, J6 et J8 de différenciation en milieu HSC comme précédemment décrit et après tri.

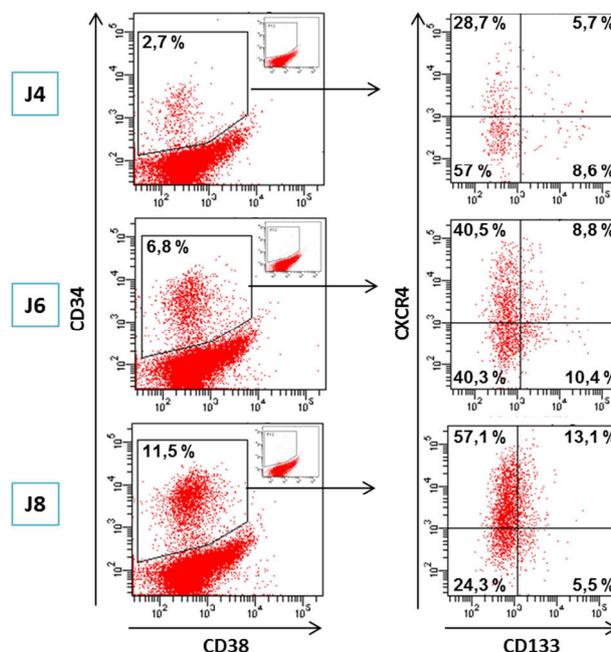


Figure 26. Analyse phénotypique par cytométrie en flux des cellules produites à J4, J6 et J8 de coculture iPS/OP9. Sur les graphiques de gauche, les cellules CD34⁺CD38⁻ ont été sélectionnées (contrôle isotypique dans l’encart en haut à droite) ; leur expression pour les marqueurs CXCR4 et CD133 est représentée dans les dot plots de droite.

Comme le montre cette figure, plus de 10 % de cellules CD34⁺ sont obtenues après 8 jours de coculture (Figure 26), ce qui est supérieur à la proportion moyenne obtenue après 10 jours de culture en milieu classique avec sérum et AA (Figure 22A). Aucune cellule n’exprime le marqueur CD45 (graphiques non montrés), montrant qu’il s’agit d’une population immature. Une augmentation de la proportion de cellules doubles positives CD34⁺CXCR4⁺ peut être observée au cours de la différenciation (Figure 26). Concernant le marqueur CD133, un léger décalage de la fluorescence observé à J6 et J8 semble indiquer l’apparition de cellules CD34⁺CD133⁺, mais ces résultats sont à re-

confirmer. Malheureusement, le potentiel hématopoïétique *in vitro* de ces cellules n'a pas pu être déterminé à cause d'une trop faible quantité de cellules mises en culture en méthylcellulose.

Le potentiel hématopoïétique *in vivo* des cellules humaines totales (CD34⁺ et CD34⁻) a été analysé par transplantation rétro-orbitale dans des souris NOG d'un équivalent de $0,2 \times 10^5$, $0,9 \times 10^5$ et $1,6 \times 10^5$ cellules CD34⁺ obtenues à partir des cocultures à J4, J6 et J8 respectivement (cf Tableau 7). **Comme précédemment, aucune prise de greffe n'a pu être détectée après 4 mois par analyse de la proportion de cellules humaines dans le fémur, la rate et le sang périphérique.**

Discussion des résultats

Du fait du stade de différenciation précoce, peu de cellules CD34⁺ sont présentes dans les cocultures, ce qui explique les faibles quantités de cellules CD34⁺ injectées et c'est sûrement l'une des causes principales de l'échec de la prise de greffe. De plus, la majorité des articles ayant obtenu une prise de greffe avait montré la présence de cellules CD34⁺CD45⁺. Or, dans cette expérience, peu voire aucunes cellules CD45⁺ n'ont été injectées.

2.4 Transplantation n°4

a) Protocole « Hanna » : EBs 7 j en suspension puis en coculture sur OP9

Hanna *et al.* ont été les premiers à produire des CSPH transplantables à partir de cellules iPS murines sur-exprimant le facteur de transcription HoxB4 (Hanna et al., 2007). Nous avons donc testé leur protocole de différenciation sur nos cellules iPS humaines. Des corps embryoïdes ont été formés puis, après 7 jours de culture en suspension avec de l'acide ascorbique uniquement, ces EBs ont été dissociés et mis en culture sur des cellules OP9 pendant 7 à 14 jours avec du Flt3L, SCF, TPO et VEGF. Nous avons analysé le phénotype et le potentiel hématopoïétique des cellules issues des EBs J7 et des cocultures EB/OP9 après 7 et 14 jours de culture (Figure 27).

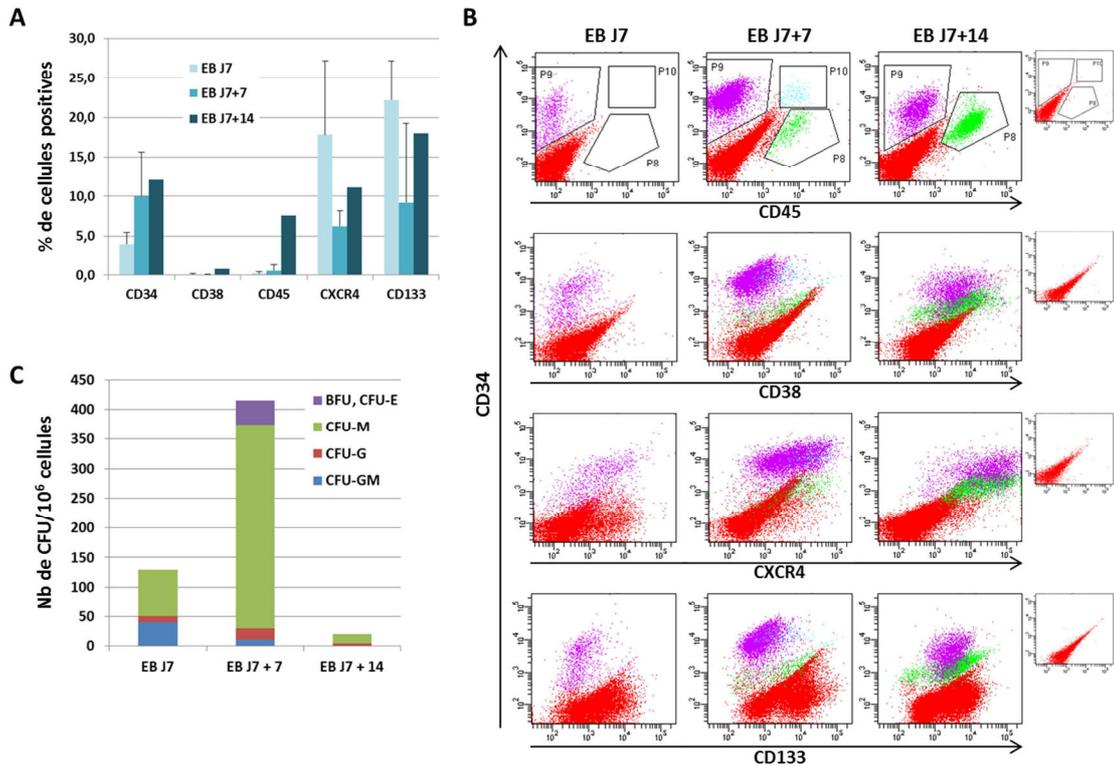


Figure 27. Analyse phénotypique et potentiel hématopoïétique (test CFC) des cellules issues des EBs J7, ou des EBs J7 cultivés pendant 7 à 14 jours sur les cellules OP9. A) Analyse par cytométrie en flux des proportions de cellules positives pour les marqueurs CD34, CD38, CD45, CXCR4 et CD133 (n=3, 2 et 1 pour les EBs J7, EBs J7+7 et EBs J7+14 respectivement). B) Dot plots montrant la co-expression du marqueur CD34 avec les marqueurs CD45, CD38, CXCR4 et CD133 pour les 3 conditions de culture (contrôle isotypique en haut à droite pour chaque marqueur). C) Histogramme montrant, pour chaque condition de culture, le nombre de CFU obtenues pour 10⁶ cellules mises en culture dans de la méthylcellulose, ainsi que la répartition en CFU-M, -G, -GM et BFU-E, CFU-E (n=1).

L'analyse globale des marqueurs phénotypiques montre une maturation au cours de la culture avec une augmentation de la proportion de cellules CD34⁺ et CD45⁺ mais très peu de cellules CD38⁺ à ces différents stades (Figure 27A et B). Si on analyse plus précisément le phénotype des cellules hématopoïétiques produites, on remarque que la population à EBs J7 est uniquement composée de cellules CD34⁺CD45⁻ (population en violet) alors qu'une population CD34⁺CD45⁺ (population en bleu ciel) apparaît à EBs J7+7. Cette population CD45⁺ devient plus importante au cours de la culture sur OP9 (population en vert dans la fenêtre) (Figure 27B). Cette maturation semble s'accompagner de l'acquisition du marqueur CD38 pour les EBs J7+14 et d'une augmentation de l'expression du marqueur CXCR4 (Figure 27B).

Le potentiel hématopoïétique *in vitro* évolue également au cours de la différenciation avec une augmentation du nombre de CFU dans la condition EBs J7+7, qui s'accompagne de l'apparition de colonies de type érythroïde (BFU-E et CFU-E) (méthylcellulose contenant de l'EPO) (Figure 27C). Comme précédemment, les progéniteurs produits sont en majorité de type macrophagique (CFU-M). A l'inverse, très peu de CFU sont obtenues à EBs J7+14 (Figure 27C).

A partir de $10\text{-}15 \times 10^6$ cellules iPS, on obtient à EBs J7 environ $0,54 \times 10^6$ cellules totales (dont $0,14 \times 10^6$ cellules CD34⁺ en moyenne, $n=3$), à EBs J7+7, environ $4,6 \times 10^6$ cellules totales (dont $0,41 \times 10^6$ cellules CD34⁺ en moyenne, $n=2$), et à EBs J7+14, 7×10^6 cellules totales (dont $0,81 \times 10^6$ cellules CD34⁺, $n=1$). Ainsi, en moyenne 8 cellules CD34⁺ peuvent être obtenues à partir de 100-150 cellules iPS.

Le phénotype ainsi que le potentiel hématopoïétique *in vitro* des cellules obtenues dans les conditions EBs J7 et EBs J7+7 étant intéressantes, nous avons analysé leur potentiel hématopoïétique *in vivo*. Les résultats de ceux-ci seront présentés plus loin.

Discussion des résultats

Dans le protocole « Hanna », après 7j de culture en présence d'acide ascorbique, les EBs contiennent déjà près de 4 % de progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ (et < 1 % de cellules CD45⁺) capables de former des CFU (Figure 27). L'association de la technique de formation des EBs puis la culture sur cellules OP9 se révèle très prometteuse puisque la proportion de cellules CD34⁺CD45⁺ est augmentée après 7 j et 14 j de coculture (Figure 27A et B). Pourtant, il est surprenant que le potentiel hématopoïétique *in vitro* soit si faible à EBs J7+14 alors que la proportion de cellules CD34⁺CD45⁺ est supérieure à celle des EBs J7+7. Il pourrait s'agir soit d'un problème technique ($n=1$ pour EBs J7+14) soit d'une perte du potentiel à cause d'une maturation trop importante de ces progéniteurs.

Ce protocole est très similaire à celui décrit par Woods *et al.* qui, après 7 j de culture d'EBs en présence de cytokines (notamment BMP4, SCF, Flt3L, VEGF et TGFβ) puis culture sur OP9 pendant 14 j, obtiennent des proportions très élevées de cellules CD45⁺ (jusqu'à 40 %) alors que nous atteignons à peine 7 % (Woods *et al.*, 2011). Après un total de 21 j de culture, ils produisent une majorité de progéniteurs matures CD34⁺CD38⁺CD45⁺, ce qui pourrait expliquer l'échec de leur essai de transplantation dans des souris immunodéprimées. En effet, 2 souris seulement sur 35 ont montré une prise de greffe qui a ensuite rapidement diminué, suggérant la production de ST (*short term*)-HSC et non de LT (*long term*)-HSC. Ces résultats orientent donc encore plus en faveur de la sélection de cellules plus primitives CD38⁻ qui seraient plutôt de type LT-HSC. Leur résultat semble donc indiquer que notre condition EBs J7+14 du protocole « Hanna » serait peu intéressante en terme de potentiel hématopoïétique et il n'est donc pas prévu de la tester *in vivo*.

b) Coculture iPS/OP9 et iPS/MS5

Bien que nous ayons déjà testé la condition iPS/OP9 J10 + AA avec 3 doses de cellules CD34⁺ injectées (Transplantation n°1) et qu'aucune prise de greffe n'ait été observée à 4 mois, nous espérons que cette nouvelle voie d'administration ainsi que le changement du milieu de culture améliorera la prise de greffe. Nous testons donc à nouveau le milieu sans sérum avec des cytokines comme dans la transplantation n°3, mais après 10 jours de coculture pour voir si la présence de cellules CD45⁺

permet d'augmenter la prise de greffe. Au cours d'analyses préliminaires non présentées dans la thèse ainsi que les données de la littérature (Vodyanik et al., 2005), les cellules iPS peuvent également être différenciées en cellules CD34⁺ par coculture sur des cellules stromales MS-5, et il nous a paru donc intéressant de comparer ces deux types de cellules stromales, OP9 et MS-5.

La Figure 28 présente l'analyse phénotypique et fonctionnelle *in vitro* des cellules CD34⁺ purifiées à partir des quatre conditions de cocultures (iPS/OP9 ou MS-5 pour les deux milieux de culture).

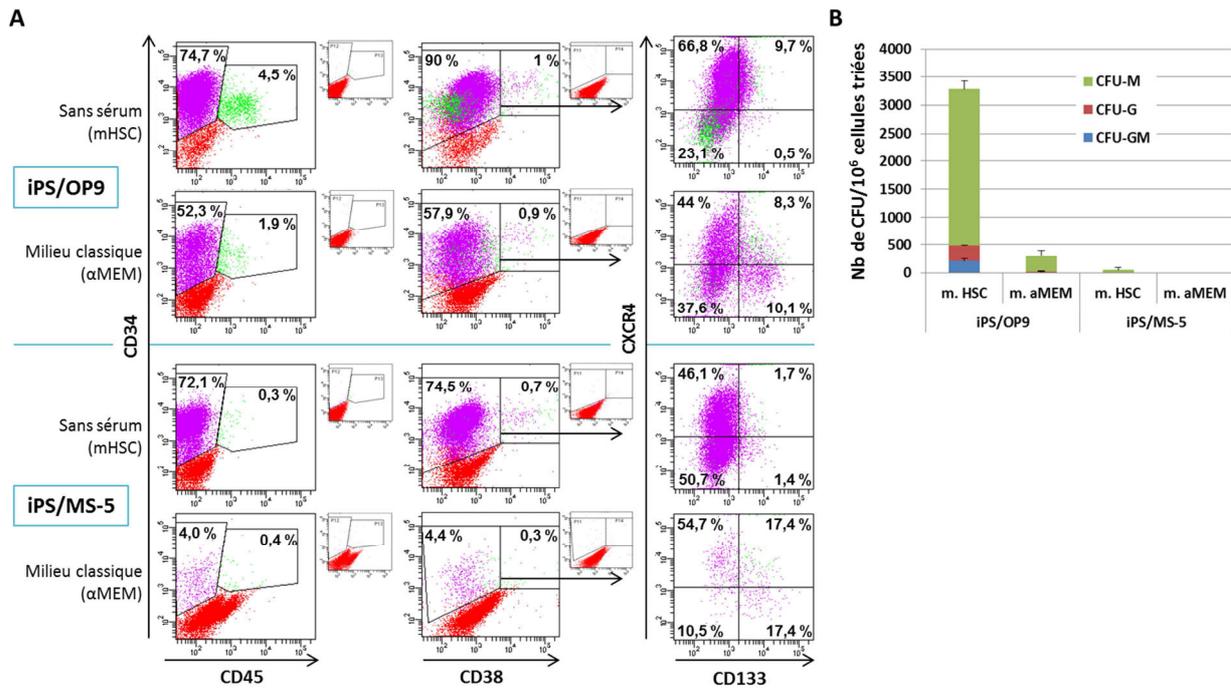


Figure 28. Analyse phénotypique et fonctionnelle *in vitro* des cellules CD34⁺ isolées à partir des cocultures iPS/OP9 ou MS-5 10 jours en milieu classique (avec sérum) ou sans sérum (milieu HSC et cytokines). A) Dot plot montrant la co-expression du marqueur CD34 avec CD45 (à gauche) ou CD38 (au milieu). Les cellules CD34⁺CD38⁺ ont été sélectionnées et l'expression des marqueurs CXCR4 et CD133 par ces cellules présentée sur les dots plot à droite. Les contrôles isotypiques sont indiqués dans les encarts. B) Histogramme montrant, pour les 4 conditions de culture, le nombre de CFU obtenues pour 10⁶ cellules mises en culture dans de la méthylcellulose (avec EPO), ainsi que la répartition en CFU-M, et CFU-G ou -GM (n=2).

La culture sans sérum semble favoriser la maturation des cellules CD34⁺ puisqu'une plus grande proportion de cellules CD45⁺ est visible dans la condition iPS/OP9 sans sérum (Figure 28A). Il est d'ailleurs intéressant de noter que dans cette condition, les cellules CD34⁺CD45⁺ (en vert sur le graphique) sont CXCR4⁻CD133⁻ alors que la majorité des cellules CD34⁺CD45⁻ sont CXCR4⁺ (66,8 %) et une faible proportion sont CD133⁺ (environ 10 %). Dans les 3 autres conditions, il n'y a pas ou peu de cellules CD45⁺.

Plus de colonies sont obtenues pour la condition iPS/OP9 sans sérum qu'en milieu classique (Figure 28B), ce phénomène pouvant s'expliquer d'une part par la plus faible pureté en cellules CD34⁺ après tri des cultures en milieu classique (59,5 % contre 92 %) ou d'autre part par l'immaturité de ces

cellules (faible proportion de cellules CD45⁺). Ces deux explications peuvent également s'appliquer aux deux conditions de coculture iPS/MS-5.

L'absence de sérum améliore également le rendement en cellules CD34⁺ : le rendement dans la condition iPS/OP9 J10 sans sérum en présence de cytokines est 4-5 fois supérieur (0,7x10⁶ cellules CD34⁺ à partir de 1x10⁶ cellules iPS) à la condition avec acide ascorbique en milieu classique (0,17x10⁶ cellules CD34⁺ à partir de 1x10⁶ cellules iPS), et de même, pour les cocultures iPS/MS-5 (0,26x10⁶ cellules CD34⁺ en condition sans sérum *versus* 0,01x10⁶ cellules CD34⁺ en milieu classique avec sérum à partir de 1x10⁶ cellules iPS).

Les résultats obtenus concernant l'évaluation du potentiel hématopoïétique *in vivo* des cellules obtenues dans ces 4 conditions de culture seront présentés plus loin.

Discussion des résultats

Les cocultures iPS/OP9 J4, J6, J8 en milieu HSC et cytokines produisent des cellules immatures CD34⁺CD45⁻ (Figure 26) mais n'ont pas permis la production de cellules greffables (Transplantation n°3). La coculture iPS/OP9 J10 en milieu HSC et cytokines permet d'améliorer de façon importante la proportion de cellules CD34⁺CD45⁺ (Figure 28). Nous avons confirmé que les cocultures sur cellules MS-5 sont moins efficaces pour induire la différenciation hématopoïétique, surtout en milieu classique avec sérum, ce qui avait déjà été montré avec les cellules hES (Vodyanik et al., 2005).

La pureté obtenue à l'issue du tri magnétique des cellules CD34⁺ réalisé sur ces 4 conditions de culture est très variable. Nous avons en effet déjà remarqué que la pureté est plus faible lorsque les cocultures sont précoces (63 %, 80 % et 91 % de cellules CD34⁺ purifiées à J4, J6 et J8 respectivement), alors qu'elle est habituellement supérieure à 90 % à J10 (données non montrées). La faible pureté obtenue sur cette expérience est peut-être donc liée à un problème technique.

c) Résultats de l'expérience de Transplantation n°4

L'intérêt majeur de ce 4^{ème} essai de transplantation, actuellement en cours, est l'injection des cellules CD34⁺ directement dans le tibia de souris NSG afin de suivre leur prise de greffe indépendamment de leur capacité de *homing*.

Six conditions de différenciation hématopoïétique sont testées : les conditions EBs J7 et EBs J7+7 pour lesquelles nous avons obtenu la production de cellules CD34⁺CXCR4⁺CD45^{+/-} possédant un potentiel hématopoïétique *in vitro* (Figure 27), ainsi que des conditions de culture iPS/OP9 ou MS-5 cultivées pendant 10 jours soit en milieu classique avec sérum (+ AA) ou en milieu sans sérum (+ cytokines hématopoïétiques) (Figure 28). Pour les deux conditions EBs J7 et EBs J7+7, environ 1x10⁵ cellules CD34⁺ purifiées ont été injectées. Pour les quatre conditions iPS/OP9 ou MS-5 avec les deux milieux de culture, les quantités en cellules CD34⁺ injectées sont variables et dépendent de la pureté

obtenue après tri (Tableau 7). Ces cellules ont été injectées par voie intra-fémorale dans des souris NSG irradiées. Malheureusement la souris injectée avec la condition EB J7+7 ainsi que des souris injectées avec les conditions iPS/OP9 et MS-5 (milieu HSC pour les deux) sont mortes dans les jours suivant l'injection.

La prise de greffe a été analysée 3 mois après la transplantation par prélèvement de la MO du tibia injecté et analyse par cytométrie en flux et coloration MGG (Figure 29).

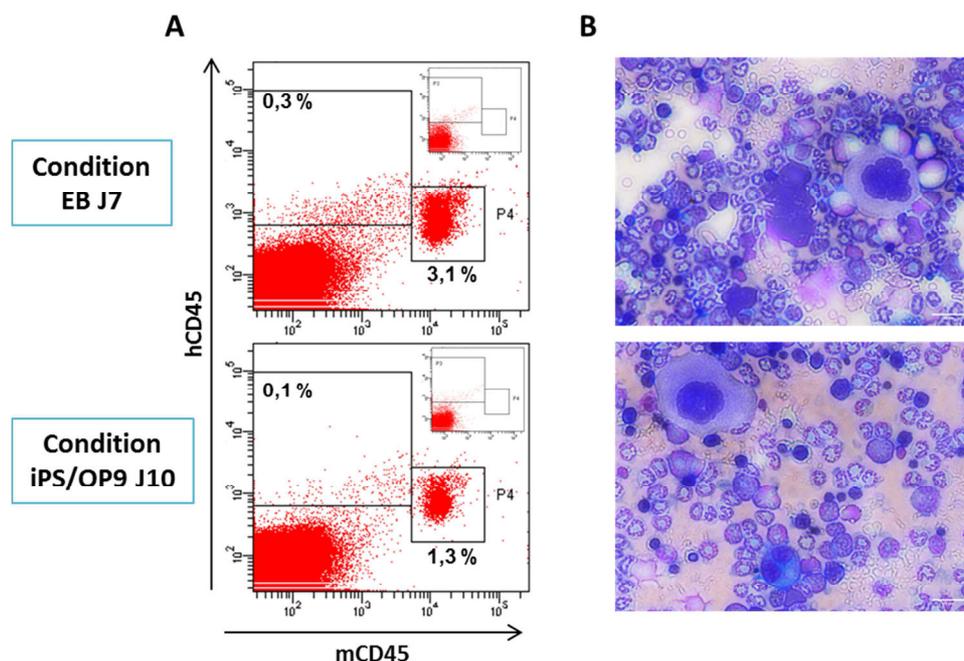


Figure 29. Analyse de la prise de greffe à 12 semaines dans le tibia injecté des souris injectées avec des cellules CD34⁺ issues des EBs J7 (panels hauts) ou iPS/OP9 J10 (panels bas). A) Analyse par cytométrie en flux de la proportion de cellules humaines (hCD45) versus murines (mCD45). B) Myélogramme et coloration MGG après ponction du tibia droit des souris transplantées (grossissement x40, échelle = 20 µm).

Les résultats présentés sont ceux obtenus pour les souris ayant reçu les cellules CD34⁺ isolées à partir des conditions EBs J7 (protocole Hanna) et coculture iPS/OP9 J10 (milieu HSC sans sérum). Plus de 99 % des cellules analysées sont vivantes (DAPI négatives, données non présentées). Une très faible proportion de cellules humaines hCD45⁺mCD45⁻ a été détectée et s'élève à 0,3 et 0,1 %, ainsi qu'une reprise de l'hématopoïèse murine (mCD45⁺) s'élevant à 3,1 et 1,3 % respectivement (Figure 29A). Cette hématopoïèse murine est également visible dans le myélogramme des souris montrant la présence de cellules à différents degrés de maturation dont des précurseurs/progéniteurs myéloïdes, mégacaryocytes et globules rouges (Figure 29B). L'analyse de la MO des autres souris n'a pas pu être réalisée à cause de difficultés de prélèvement intra-tibial à 3 mois.

Cependant ces résultats sont préliminaires et il est prévu d'évaluer la prise de greffe dans la MO du tibia non injecté à 5 mois puis sacrifier les souris à 6 mois (voire plus) pour analyser les fémurs, la rate

et le sang périphérique. Lors de cette dernière analyse, la reconstitution hématopoïétique sera plus largement étudiée en analysant également la reconstitution myéloïde, lymphoïde et érythroïde.

Discussion des résultats

Concernant les doses de cellules CD34⁺ injectées, certaines conditions de culture ont permis de produire et donc d'injecter de plus grandes quantités de cellules et également plus de souris, ce qui est notamment le cas des cocultures iPS/OP9 et MS-5 en milieu HSC. A l'inverse, les EBs ont un rendement très faible en cellules CD34⁺ et nous n'avons donc pu injecter qu'une seule souris avec environ 1×10^5 cellules CD34⁺ pour les EBs J7 et EBs J7+7 du protocole « Hanna ».

La voie intraveineuse (veine caudale ou rétro-orbital) utilisée dans les trois premiers essais de transplantation n'était probablement pas la voie la plus judicieuse à choisir dans ce contexte où la capacité de *homing* des cellules transplantées n'est pas certaine. C'est pourquoi dans cet essai, nous avons injecté les cellules directement dans la moelle osseuse des souris par voie intra-tibiale.

Il est encore trop tôt pour discuter véritablement ces résultats. Cependant, nous avons noté une reprise faible de l'hématopoïèse murine (mCD45⁺). Les souris NSG ont été irradiées à une dose de 1,5 Gy, ce qui est relativement faible par rapport aux protocoles publiés (généralement 2 à 3,5 Gy, cf Tableau 4) et pourrait expliquer la présence de cellules CD45⁺ murines. Le conditionnement des souris transplantées est un facteur qui peut influencer l'efficacité de la prise de greffe. En effet, une dose trop faible d'irradiation ou d'agent de chimiothérapie pourrait être inefficace pour supprimer l'hématopoïèse murine, ce qui limiterait la prise de greffe des cellules humaines.

Ces résultats restent encore préliminaires mais la présence de cellules hCD45⁺mCD45⁻ même en très faible proportion est très encourageante. Cependant, l'anticorps utilisé hCD45 manque de spécificité et détecte également le marqueur CD45 murin, expliquant le décalage de fluorescence des cellules mCD45⁺ (Figure 29A). Ces résultats sont donc à reconfirmer avec un anticorps plus spécifique. En parallèle, nous pourrions utiliser des techniques de détection des séquences ALU spécifiques des cellules humaines par hybridation *in situ* ou directement par PCR (Ueda et al., 2000).

2.5 Récapitulatif des expériences de transplantation et discussion globale des résultats

Le Tableau 7 récapitule toutes les caractéristiques de protocoles de différenciation utilisés pour les expériences de transplantation ainsi que les résultats obtenus.

Tableau 7. Tableau récapitulatif des caractéristiques des 4 essais de transplantation réalisés

Transplantation	Méthode de différenciation	Type de cellules injectées	Voie de transplantation et quantité de cellules injectées	Modèle animal (conditionnement)	Taux de chimérisme et reconstitution
1	Coculture iPS/OP9 + AA pendant 10 jours	CD34 ⁺ pures (pureté de 99,1 %) : souris 1 à 3 cellules non triées (8,3 % CD34 ⁺) : souris 4 à 6	Voie intraveineuse : souris 1 et 4 : 1x10 ⁵ CD34 ⁺ ou équivalent souris 2 et 5 : 2x10 ⁵ CD34 ⁺ ou équivalent souris 3 et 6 : 3x10 ⁵ CD34 ⁺ ou équivalent	6 souris NOG (busulfan 48h et 24h avant transplantation)	Suivi jusqu'à 4 mois : pas de prise de greffe
2	Formation de tératomes par co-injection iPS/OP9 en SC dans des souris NOD/SCID et croissance pendant 10 semaines	Cellules issues des tératomes : 15,8 % de cellules CD34 ⁺	Voie rétro-orbitale : 5x10 ⁶ cellules (soit environ 8x10 ⁵ cellules CD34 ⁺)	2 souris NOG (busulfan 48h et 24h avant transplantation)	Suivi jusqu'à 4 mois : pas de prise de greffe
3	Coculture iPS/OP9 + cytokines pendant 4, 6 ou 8 jours puis tri anti-cellules OP9	Cellules humaines issues des J4, J6 et J8 de coculture	Voie rétro-orbitale : souris 1 et 2 : 0,2x10 ⁵ CD34 ⁺ (J4) souris 3 et 4 : 0,9x10 ⁵ CD34 ⁺ (J6) souris 5 et 6 : 1,6x10 ⁵ CD34 ⁺ (J8)	6 souris NOG (busulfan 48h et 24h avant transplantation)	Suivi jusqu'à 4 mois : pas de prise de greffe
4	6 conditions de culture différentes : -EB J7 "Hanna" - EB J7+7j sur OP9 "Hanna" - iPS/OP9 J10 milieu HSC + cytokines - iPS/OP9 J10 milieu aMEM + AA - iPS/MS-5 J10 milieu HSC + cytokines - iPS/MS-5 J10 milieu aMEM + AA	Cellules triées CD34 ⁺ pureté = 70 % pureté = 95 % pureté = 92 % pureté = 59,5 % pureté = 70,5 % pureté = 10,3 %	Voie intra-tibiale : 1,1x10 ⁵ CD34 ⁺ 1x10 ⁵ CD34 ⁺ 1,7x10 ⁵ CD34 ⁺ 1,1x10 ⁵ CD34 ⁺ 1,7x10 ⁵ CD34 ⁺ 0,3x10 ⁵ CD34 ⁺	11 souris NSG (1,5 Gy) + 1 contrôle : 1 souris 1 souris 3 souris 2 souris 3 souris 1 souris	En cours 1/1 morte 1/3 morte 1/3 morte

Les choix que nous avons faits pour ces quatre essais concernant la quantité ou le type de cellules transplantées ont été largement discutés précédemment et peuvent être responsables de l'échec de certaines transplantations. Cependant, d'autres facteurs pourraient influencer la prise de greffe parmi lesquels :

- le **choix du type de souris receveuse** : les souris NOG et NSG sont les plus efficaces pour la génération de souris humanisées. L'utilisation de souris nouveau-nés pourrait améliorer la réussite de la transplantation non seulement car l'efficacité de prise de greffe est généralement plus élevée (Brehm et al., 2010a), mais également car les cellules produites par différenciation hématopoïétique des cellules iPS auraient un statut plutôt embryonnaire qui serait plus compatible avec le microenvironnement murin des souris nouveau-nés (Liu et al., 2015).

- le **choix de la voie d'administration** : l'échec des transplantations 1, 2 et 3 pourrait être en partie dû à un défaut de *homing* des cellules transplantées par voie IV même si la plupart d'entre elles expriment le marqueur CXCR4. Un taux d'expression comparable est d'ailleurs retrouvé dans d'autres études. L'expression de ce marqueur signe généralement un potentiel de *homing* dans la MO (Peled et al., 1999). Mais en réalité, l'absence d'expression de CXCR4 par les cellules CD34⁺ pourrait ne pas

limiter leur prise de greffe après transplantation puisqu'un article de Rosu-Myles *et al.* a montré que le compartiment des CSH était hétérogène en termes d'expression du marqueur CXCR4 et que les populations CXCR4⁺ et CXCR4⁻ possédaient des capacités de prolifération et de différenciation équivalentes après transplantation IV dans des souris NOD/SCID (Rosu-Myles et al., 2000). L'injection des cellules hématopoïétiques humaines directement dans la MO des souris permettrait ainsi de pallier à une éventuelle déficience de *homing* des cellules CD34⁺ dérivées hPSCs par rapport à la voie intraveineuse, raison pour laquelle nous avons choisi cette voie d'administration pour la Transplantation n°4.

De plus, la mortalité des souris après injection IV de grandes quantités de cellules dérivées des iPS ou ES peut s'expliquer dans certains cas par un phénomène d'embolie pulmonaire lié à une agrégation des cellules en réaction au sérum de souris (Wang et al., 2005b). C'est sans doute la cause de la mort de la souris 5 de l'expérience de Transplantation n°1. L'injection des cellules directement dans la MO (intra-tibiale ou intra-fémorale) pourrait donc limiter la mortalité immédiate des souris.

- la **durée de l'expérience** puisque l'analyse de la prise de greffe peut être évaluée à partir de 2 semaines et jusqu'à 12 mois après transplantation. Cette analyse est généralement estimée par l'expression du marqueur CD45 humain *versus* murin par cytométrie en flux par des prélèvements de la MO, rate, sang périphérique, comme nous l'avons fait. Cependant, les souris ont été sacrifiées au 4^{ème} mois post-transplantation. Cette durée n'est peut-être pas suffisante pour détecter une prise de greffe et nous avons donc décidé de prolonger ces essais jusqu'à 6 mois voire plus dans la Transplantation n°4.

Matériel et Méthodes

Culture cellulaire

La culture des cellules iPS et OP9 est réalisée tel que décrit dans l'article 1 (Brault et al., 2014). La lignée stromale murine MS-5 nous a été généreusement fournie par le Pr Sophie Park. Ces cellules sont cultivées dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 1X + GlutaMAX™-I (4,5 g/L glucose) (Gibco) avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF ; Gibco), 1 % de pénicilline-streptomycine 100X (Gibco) et 1 % d'acides aminés non essentiels (Minimum Essential Medium-Non Essential Amino Acid (MEM-NEAA) 100X (Gibco).

Différenciation hématopoïétique

Toutes les cytokines hématopoïétiques utilisées dans ces protocoles de différenciation proviennent de Miltenyi Biotec.

Formation de tératomes

1×10^6 cellules iPS seules ou $2-3 \times 10^6$ cellules iPS avec 1×10^6 cellules OP9 dans un mélange de Matrigel™ (BD Biosciences) et milieu DMEM/F12 (1 :1) (Gibco) sont injectées en sous-cutané dans le flanc de souris NOD/SCID (Amabile et al., 2013; Suzuki et al., 2013). La taille des tératomes est mesurée à l'aide d'un pied à coulisse et selon la formule suivante : épaisseur²×longueur/2. Les souris sont sacrifiées lorsque les tératomes atteignent une taille pouvant affecter leur comportement, leur mobilité ou leur alimentation ; cela correspond à une taille d'environ 1000 mm³. Après 7 à 10 semaines, les souris sont sacrifiées et les tératomes prélevés et coupés en petits fragments à l'aide d'un scalpel. Puis la dissociation est réalisée par incubation des fragments de tératome avec de la Collagénase IV 1 mg/mL (Gibco) ou de la StemPro® Accutase® (Gibco) pendant 1h30 à 37°C associée à une dissociation mécanique par aspiration-refoulement. La suspension obtenue est ensuite lavée et filtrée à l'aide d'un tamis cellulaire de 100 µm puis 40 µm avant d'être analysée (cytométrie en flux, test CFC, transplantation).

Formation de corps embryoides (EBs)

Les colonies iPS sont décollées de leur support de culture par traitement avec de la collagénase IV 1 mg/mL et transférées dans des disques recouverts de pHEMA (poly-hydroxyéthylméthacrylate, Sigma) puis cultivées en suspension dans différents milieux de culture.

Les EBs sont cultivés pendant 16 jours en milieu Iscove Modified Dulbecco Medium (IMDM, Gibco) avec 15 % de SVF, 1 % MEM-NEAA, 2 mM L-glutamine, 100 µM βME (β-mercaptoéthanol, Gibco), 25 ng/mL BMP4, 50 ng/mL SCF, 50 ng/mL Flt3L, 50 ng/mL IL6 et 20 ng/mL TPO (Yokoyama et al., 2009).

Les EBs sont ensuite dissociés par incubation avec de la collagénase IV 1 mg/mL pendant 10-30 min à 37°C.

Dans le protocole « Hanna » modifié (Hanna et al., 2007), les EBs sont cultivés pendant 7 jours en milieu IMDM avec 15 % de SVF et 50 µg/mL d'acide ascorbique (AA, Sigma). Puis, les EBs J7 sont dissociés avec de la collagénase IV 1 mg/mL pendant 30 min à 37°C avec une dissociation mécanique toutes les 5-10 min. Les cellules dissociées sont ensuite transférées sur des cellules OP9 en plaque 6 puits à une densité de 1×10^5 cellules/puits dans du milieu IMDM avec 10 % SVF, 100 ng/mL Flt3L, 100 ng/mL SCF, 40 ng/mL VEGF et 40 ng/mL TPO. La plaque est ensuite centrifugée 60 min à 900 rpm. Après 7 jours de culture, les cocultures sont dissociées avec de la Trypsine-EDTA 0,05 % (Gibco) pendant 5-10 min à 37°C, les cellules rincées puis cultivées dans une flasque T75 dans le même milieu que précédemment pendant 7 jours. La dissociation des cocultures EBs J7 + 14 est réalisée par incubation avec de la Trypsine-EDTA 0,05 % pendant 5-10 min à 37°C.

Les cellules issues des dissociations d'EBs ou de cocultures sont lavées et filtrées (40 µm).

Coculture iPS/OP9 ou iPS/MS-5

Les colonies iPS sont cultivées sur OP9 ou MS-5, décollées et dissociées comme décrit dans Brault *et al.* (Brault et al., 2014). Le milieu de différenciation sans sérum repose sur l'utilisation de milieu StemMACS HSC Expansion Media XF appelé « milieu HSC » (Miltenyi Biotec) dans lequel sont ajoutées les cytokines suivantes : 100 ng/mL Flt3L, 100 ng/mL SCF, 50 ng/mL IL3, 50 ng/mL IL6, 20 ng/mL BMP4 et 10 ng/mL TPO.

Purification des cellules (progéniteurs CD34⁺ ou cellules humaines) par tri magnétique

Le tri des cellules CD34⁺ (billes anti-CD34) (Brault et al., 2014) ou cellules humaines (billes anti-cellules murines) est réalisé selon les recommandations du fabricant (Miltenyi Biotec). La pureté de la fraction positive CD34⁺ ou négative humaine est ensuite analysée par cytométrie en flux.

Test des *Colony-forming cells* (CFC)

Pour analyser leur potentiel hématopoïétique, les cellules sont reprises dans 150 µL de milieu IMDM 2 % SVF et transférées dans 1,5 mL de StemMACS HSC-CFU media avec 3U/mL EPO (130-091-280) ou sans EPO (130-091-277) (Miltenyi Biotec). Le nombre de cellules mises en culture est fonction de leur pureté en cellules CD34⁺ : $1 \cdot 10^5$ cellules/1,5 mL lorsqu'elles sont non triées ou $5 \cdot 10^4$ cellules/1,5 mL lorsqu'il s'agit de cellules purifiées CD34⁺. Le nombre de CFU (*Colony-Forming Unit*) est compté après 14-21 jours d'incubation et rapporté pour 10^6 cellules. L'identification des colonies est réalisée sur des critères morphologiques (Brault et al., 2014).

Transplantation dans les souris immunodéficientes

Deux types de souris immunodéficientes ont été utilisées pour les essais de transplantation : des souris NOG (transplantations 1, 2 et 3) et des souris NSG (transplantation 4). Le conditionnement des souris NOG est réalisé 48h et 24h avant la transplantation par traitement avec du Busulfan à une dose totale de 25 mg/kg pour les femelles et 15 mg/kg pour les mâles, et celui des souris NSG par irradiation X avec une dose de 1,5 Gy. Lors de la transplantation, les souris sont anesthésiées soit par inhalation d'isoflurane à 3-4 % dans une chambre d'induction soit par injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine (50mg/kg) et de xylazine (5mg/kg). Trois voies d'administration ont été testées et pour chacune d'elle le volume maximal injecté est indiqué : injection intraveineuse dans la veine de la queue (200 µL), injection rétro-orbitale (200 µL) et injection intra-tibiale (40 µL). Les souris sont placées dans un environnement approprié, isolateur stérile (souris NSG) ou cages individuelles ventilées (souris NOD/SCID et NOG), et surveillées régulièrement durant toute la durée de l'expérience. Puis la prise de greffe est analysée comme décrit ci-après et les souris sacrifiées à 4 mois ou plus tard selon l'essai de transplantation.

Analyse de la prise de greffe

Le sang périphérique est prélevé par prélèvement rétro-orbital ou la moelle osseuse par prélèvement intra-tibial lors de l'évaluation de la prise de greffe jusqu'à 4 mois. Puis, lors du sacrifice, le sang périphérique, la rate et les fémurs des souris transplantées sont prélevés et analysés par cytométrie en flux et/ou coloration May-Grünwald-Giemsa (MGG).

Cytométrie en flux

Les cellules à analyser sont lavées en tampon FACS (PBS + 2 % SVF + EDTA 2 mM + azide de sodium 0,05 % (p/v, NaN₃)) puis incubées avec les anticorps couplés suivants dilués au 1/20^{ème} pendant 30 min à température ambiante : Lin-FITC (association des marqueurs CD14, CD3, CD20 et CD56 tous couplés au FITC), CD31-PE, CD34-VioBlue, CD38-PE, CD43-FITC, hCD45-APC, CXCR4-PE-Cy7 et CD133-FITC VioBright pour l'analyse du phénotype hématopoïétique ; DAPI, hCD45-VioGreen, et mCD45-PerCP-Vio700 pour l'analyse de la prise de greffe après transplantation. Tous les anticorps proviennent de Miltenyi Biotec. En parallèle, des cellules incubées avec des isotypes contrôles permettent d'établir le seuil de marquage positif. L'analyse est réalisée avec un cytomètre en flux FACS Canto II (BD Biosciences) par acquisition d'au moins 10000 évènements pour chaque marquage. Les logiciels Diva et FlowJo ont été utilisés pour le traitement des données.

Discussion/perspectives

Les modèles murins modélisant des pathologies génétiques, quand ils existent, sont très utiles pour étudier la physiopathologie d'une maladie ou développer de nouvelles thérapies par exemple. Cependant toutes les maladies ne possèdent pas de modèles animaux. Si on considère l'exemple de la CGD notamment, il n'existe pas de modèle animal pour les formes CGDAR67 et CGDAR40. Actuellement, les souris possédant un système immunitaire humanisé se présentent comme des outils de choix pour mieux modéliser les pathologies humaines touchant les cellules de l'immunité. Cependant, cette technologie est encore peu développée pour cette application alors que les souris humanisées seraient un atout inestimable.

Si la technologie des cellules iPS a largement démontré son efficacité pour le développement de modèles cellulaires physiopathologiques, elle est pour l'instant peu efficace pour permettre la génération de souris HIS modèle de maladies (cf Chapitre II.4.3). Notre objectif a donc été donc de produire, à partir de cellules iPS, des cellules CD34⁺ capables de générer des souris HIS.

Actuellement les souris humanisées sont produites principalement à partir de CSH issues de sang de cordon, de moelle osseuse ou de cellules CD34⁺ du sang périphérique après mobilisation par du G-CSF. En clinique, les CSH capables de reconstitution hématopoïétique à long terme sont présentes dans la population CD34⁺. Mais depuis plus de 40 ans les chercheurs s'attachent à définir plus précisément les CSH selon leur morphologie, les marqueurs de surface, leurs caractéristiques biochimiques... La plus grande probabilité de trouver des CSH capables de prise de greffe et de reconstitution hématopoïétique se trouverait plus précisément dans le compartiment des cellules Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁺HLA-DR⁻, mais d'autres marqueurs additionnels peuvent s'ajouter pour caractériser ces cellules puisque les CSH seraient également CXCR4⁺, CD117⁺, CD133⁺... A partir des cellules ES et iPS, le moment exact de la production de telles cellules est inconnu et, comme nous avons pu le voir, cela est dépendant de facteurs comme la technique employée, les conditions de culture, les cellules elles-mêmes..., de nombreux paramètres qui sont à prendre en compte pour atteindre notre objectif.

Au cours de ce travail, nous avons pu montrer la production de cellules CD34⁺ *in vitro* grâce à des approches de formation de tératomes, d'EBs ou de cocultures. Mais même si nous avons pu obtenir une différenciation hématopoïétique dans les tératomes iPS/OP9, nous avons jugé cette approche trop contraignante et surtout peu éthique. Les cellules CD34⁺ produites en systèmes EBs ou coculture possèdent un potentiel hématopoïétique *in vitro* mais pas de capacité de prise de greffe après transplantation *in vivo* dans des souris immunodéficientes dans nos conditions d'étude. Pour l'instant, nous ne pouvons donc pas conclure sur le choix de l'une ou l'autre de ces approches et

nous continuerons donc de les étudier toutes les deux. Deux hypothèses se présentent pour expliquer ces échecs : soit nous n'avons jamais réussi à produire des « CSH avec un potentiel transplantable », soit nous en avons produit mais les conditions de transplantation choisies n'étaient pas optimales pour permettre la prise de greffe de ces cellules. Sur ce dernier point, l'analyse de la dernière expérience de transplantation est actuellement en cours et les premiers résultats obtenus semblent indiquer que la voie intra-tibiale est idéale pour ces cellules différenciées à partir de hPSCs. Nous ne sommes en effet pas en présence de cellules CD34⁺ « physiologiques » qui, elles, présentent une très bonne prise de greffe après injection intraveineuse. Il est donc nécessaire de s'adapter aux contraintes de la technologie des cellules iPS. La voie intra-fémorale/intra-tibiale est la voie d'injection choisie par 4 équipes sur 5 ayant publié des résultats encourageants à partir de cellules iPS humaines au cours des 3 dernières années. Le peu d'articles publiés à ce sujet est d'ailleurs assez révélateur de la difficulté de cet objectif alors qu'il s'agit d'un enjeu majeur en médecine.

Les trois premiers essais de transplantation n'ont pas été concluants et nous en avons tiré les conclusions suivantes : en plus de modifier la voie d'injection, il nous faut mieux définir le phénotype des cellules hématopoïétiques avant de les transplanter et surtout évaluer leur potentiel hématopoïétique *in vitro* à l'aide d'un autre test, le test des LTC-IC.

Le sang de cordon serait plus riche en CSH possédant une activité SRC (*Scid-repopulating cell*), et notamment en cellules CD34⁺CD38⁻ que la moelle osseuse adulte. Si on s'arrête à cette définition, la population CD34⁺ que nous produisons est également CD38⁻ et devrait donc contenir, avec une probabilité impossible à déterminer, au moins 1 SRC. L'association d'autres marqueurs est donc nécessaire. Une difficulté supplémentaire est que les deux seules équipes ayant réussi à produire des cellules capables de reconstitution multi-lignée les ont définies uniquement comme des cellules CD34⁺CD45⁺, ce qui ne facilite pas la reproduction de leur travail (Amabile et al., 2013; Suzuki et al., 2013). C'est pourquoi, en utilisant l'association des marqueurs CD34, CD38, CD45, CXCR4 et CD133, nous pensons arriver à analyser et interpréter le phénotype des cellules produites (Wang et al., 2005c). Mais l'interprétation des deux derniers marqueurs, CXCR4 et CD133 s'avère finalement difficile. Dans la littérature, le potentiel de *homing* des CSH est associé à l'expression du marqueur CXCR4. Or, à présent que nous injectons les cellules CD34⁺ directement dans la moelle osseuse, l'analyse de son expression ne serait plus indispensable. Concernant le marqueur CD133, les cellules CD34⁺ produites avec nos protocoles de différenciation sont majoritairement CD133⁻. Vodyanik *et al.* avaient précédemment remarqué que seules 12 % des cellules CD34⁺ issues des hESCs exprimaient le marqueur CD133 après 8 jours de différenciation sur cellules OP9, ce qui est cohérent avec les résultats que nous obtenons (Vodyanik et al., 2005). Le marqueur CD133 est en réalité un marqueur des cellules souches de façon générale et il est par exemple exprimé par les neuroprogéniteurs (Peh et al., 2009) et les cellules ES humaines (Chadwick et al., 2003; Zambidis et al., 2005). La présence

d'une population CD34⁻CD133⁺ pourrait donc indiquer soit la présence de cellules iPS résiduelles, soit la différenciation de cellules souches non hématopoïétiques, soit représenter un stade immature pouvant donner naissance à des cellules CD34⁺CD133⁺ (Handgretinger and Kuçi, 2013). Les cellules iPS indifférenciées sont CD34⁻CD45⁻ mais nous n'avons pas examiné l'expression du marqueur CD133 dans ces cellules, cela sera donc à vérifier.

Ainsi, parmi les améliorations à apporter à ce projet, les deux principales seraient les suivantes :

1) Amélioration de l'analyse du phénotype : de nouveaux marqueurs phénotypiques seront ajoutés tels que CD90, CD45RA, HLA-DR, CD117 et KDR (VEGFR2) puisque leur absence ou au contraire leur expression selon le marqueur signerait la présence de cellules possédant un phénotype similaire à celui des CSH.

2) Amélioration de l'analyse du potentiel hématopoïétique : nous avons systématiquement analysé le potentiel des cellules hématopoïétiques produites par le test des CFC et nous produisons des cellules CD34⁺ possédant un potentiel hématopoïétique *in vitro*. Cependant, ce test ne détecte que des progéniteurs déjà engagés dans une voie de différenciation et est donc inapproprié pour détecter des CSH (Coulombel, 2004). Néanmoins, la présence de progéniteurs est un bon signe puisqu'elle implique la présence d'une cellule plus immature dans les jours précédant le développement de ces progéniteurs. Nous avons donc récemment mis en place au laboratoire le test des LTC-IC afin d'identifier des progéniteurs immatures actuellement non détectés par le test des CFC. La mise en œuvre systématique de ce test pour étudier le potentiel des cellules produites nous permettra de mieux déterminer la fenêtre d'apparition de CSPH immatures potentiellement capables de prise de greffe. Il est par contre important de prendre en compte que les tests fonctionnels *in vitro* ne représentent pas toujours le potentiel hématopoïétique *in vivo*.

En conclusion, les résultats présentés dans ce travail sont encourageants puisque nous montrons la production de cellules CD34⁺ avec un potentiel hématopoïétique *in vitro* (et *in vivo* à confirmer), mais certains paramètres restent encore à améliorer. La maîtrise de la cinétique de différenciation hématopoïétique est essentielle pour déterminer le stade d'apparition de « cellules souches hématopoïétiques » et c'est le point sur lequel nous allons à présent travailler activement.

D'autres études pourraient s'avérer intéressantes également pour atteindre cet objectif. Par exemple, le niveau d'expression des FRO dans les cellules hématopoïétiques serait un bon indicateur de leur capacité de repopulation à long terme (LT-HSC) ou à court terme (ST-HSC). Il a notamment été montré que ce phénotype ne serait pas figé et ainsi, à partir de ST-HSC, il serait possible de les faire retourner à un état de LT-HSC en modifiant le niveau de FRO dans ces cellules (Ludin et al., 2014). De même, en plus de l'étude de l'expression des marqueurs de surface et du potentiel hématopoïétique, la majorité des articles publiés ont également analysé la cinétique d'expression

des gènes impliqués dans l'induction mésodermale (gènes BRACHYURY, MIXL1...) ou dans la régulation de l'hématopoïèse. GATA-1, GATA-2, SCL/TAL1, RUNX1/AML, HOXB4, PU.1 et C/EBP α par exemple sont des facteurs de transcription majeurs jouant un rôle essentiel dans le développement hématopoïétique en régulant de nombreux gènes impliqués dans la différenciation (Liu et al., 2015). La cinétique d'expression de ces gènes au cours de la différenciation hématopoïétique diffère selon le système de différenciation mis en œuvre (coculture ou EBs), les modifications génétiques éventuelles des cellules souches ou l'utilisation de cytokines. Il serait donc très utile de compléter les analyses phénotypique et fonctionnelle par le suivi de l'expression des différents gènes impliqués dans la différenciation hématopoïétique.

L'enjeu de ce travail dépasse en réalité celui de la production de modèles murins humanisés pour modéliser la CGD et pourrait être étendu à l'Homme. Plus de 4000 greffes de CSH sont réalisées chaque année en France et la majorité des patients sont traités pour des hémopathies malignes (lymphome, myélome, leucémie) (données de l'Agence de Biomédecine). Plus de 60 % de ces greffes sont réalisées à partir de donneurs non apparentés (incluant le sang de cordon) et 40 % de donneurs apparentés. Mais il reste encore une proportion non négligeable de patients pour lesquels il n'existe aucun donneur compatible. Ainsi, produire des CSH autologues à partir des cellules iPS permettrait de pallier au manque de donneurs HLA compatibles et offrirait une alternative aux patients souffrant de maladies hématopoïétiques.

CONCLUSION

Les deux objectifs principaux de ce travail de thèse étaient de créer de nouveaux modèles cellulaires pertinents de différentes formes génétiques de CGD et de développer à partir de ces modèles, une nouvelle approche thérapeutique basée sur l'utilisation de protéoliposomes.

Grâce à l'utilisation de cellules souches iPS issues de la reprogrammation de fibroblastes de patients CGDX, CGDAR22 et CGDAR47, nous avons produit *in vitro*, par différenciation hématopoïétique, des neutrophiles et macrophages matures mimant ces 3 formes génétiques. Les cellules phagocytaires obtenues sont morphologiquement identiques aux cellules normales et possèdent les caractéristiques des cellules matures comme la présence des granules primaires (MPO), secondaires (lactoferrine) et tertiaires (gélatinase) pour les neutrophiles et l'expression de marqueurs de surface spécifiques pour les macrophages. Ceux-ci sont également fonctionnels pour les fonctions de phagocytose (*S. aureus* et ZOPS) et de relargage de cytokines. Nous avons confirmé que les neutrophiles et macrophages issus de cellules iPS CGD sont incapables de produire des FRO après stimulation par du PMA ou du ZOPS. Ils reproduisent donc bien *in vitro* le phénotype déficient des patients CGD. Ces nouveaux modèles cellulaires peuvent être produits en quantité quasi illimitée et à la demande. Grâce à la mise en place de cette technique efficace de différenciation hématopoïétique, nous pourrions modéliser des neutrophiles et macrophages porteurs d'autres mutations ou pour d'autres formes génétiques de CGD. Ces mises au point pourront également être adaptées à la modélisation physiopathologique d'autres maladies touchant le système hématopoïétique, et notamment les cellules phagocytaires.

Nous nous sommes ensuite intéressés au développement d'une nouvelle approche de thérapie protéique à l'aide de ces modèles cellulaires, et plus particulièrement des macrophages mimant la forme CGD liée à l'X. En effet, il s'agit de la forme majoritaire de CGD (70 % des patients) et est caractérisée par l'absence du *cytb*₅₅₈ membranaire (formé des sous-unités NOX2 et p22^{phox}). Le choix de l'approche de thérapie à l'aide de protéoliposomes s'est imposé d'une part car les liposomes sont actuellement des vecteurs de choix pour la délivrance de protéines membranaires, et d'autre part car la start-up Synthelis SAS, issue de notre équipe, possède l'expertise de la production de protéoliposomes thérapeutiques. A l'aide d'un système acellulaire optimisé basé sur des extraits d'*E. coli*, ils ont produit des liposomes contenant un complexe membranaire NOX2/p22^{phox} fonctionnel intégrant les deux hèmes au niveau de NOX2. Nous avons tout d'abord démontré que ces protéoliposomes contenant le *cytb*₅₅₈ recombinant sont capables de reconstituer, *in vitro* dans un système acellulaire reconstitué, un complexe NADPH oxydase capable de former des FRO réduisant le cytochrome c. De plus, ces protéoliposomes sont capables de délivrer le *cytb*₅₅₈ *in vivo* dans des macrophages CGDX, restaurant ainsi l'activité NADPH oxydase de ces cellules. Bien que certaines caractérisations de ces protéoliposomes manquent encore, nous avons fait au cours de ce travail la

preuve de concept de l'efficacité de cette nouvelle thérapie. Lorsque celle-ci sera complètement validée *in vitro*, des essais pré-cliniques sur des souris *KO* CGDX seront mis en place afin d'analyser leur efficacité *in vivo*.

Cette « enzymothérapie substitutive liposomale » permettrait d'apporter une alternative thérapeutique pour le traitement des infections pulmonaires réfractaires aux antibiotiques et antifongiques actuels. Une utilisation prophylactique pourrait également être envisagée afin de remplacer la chimioprophylaxie journalière responsable d'effets secondaires non négligeables.

De plus, d'autres maladies résultant de l'absence de protéines membranaires pourraient bénéficier de cette nouvelle approche thérapeutique.

L'objectif secondaire de cette thèse était d'initier un travail sur la génération de nouveaux modèles murins « humanisés » pour les différentes formes génétiques de CGD.

Pour réaliser cela, différents protocoles de différenciation hématopoïétiques ont été testés sur des cellules iPS saines contrôles dans un premier temps. Ainsi, grâce à la formation de tératomes ou de corps embryoides, ou encore par des systèmes de cocultures, nous avons obtenu des cellules hématopoïétiques CD34⁺. Le phénotype de ces cellules CD34⁺ s'est révélé très variable selon le protocole utilisé et la durée de culture. Dans la majorité des techniques de différenciation, les cellules CD34⁺ produites possèdent un potentiel hématopoïétique *in vitro* (test des CFC). Pourtant, elles ne sont pas capables de prise de greffe et de reconstitution hématopoïétique *in vivo* après transplantation par voie intra-veineuse dans des souris immunodéficientes de type NOG ou NSG. Notre dernier essai de transplantation utilisant la voie intra-tibiale a cependant montré des résultats encourageants qui seront à confirmer. Bien que de nombreuses pistes soient encore à explorer, ces essais préliminaires nous ont permis d'améliorer notre maîtrise de la différenciation hématopoïétique afin d'envisager prochainement la production de cellules hématopoïétiques capables de prise de greffe.

A moyen terme, le développement de souris humanisées contrôle puis CGD permettra de disposer de modèles animaux plus proches de l'Homme pour les essais pré-cliniques de nouvelles thérapies, et notamment pour le développement de la thérapie protéique grâce aux protéoliposomes.

A plus long terme, des modèles animaux humanisés pourraient être produits pour d'autres maladies touchant le système hématopoïétique et pour lesquelles il n'existe pas de modèles actuellement.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilić, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., et al. (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* *26*, 1276–1284.
- Accetta, D., Syverson, G., Bonacci, B., Reddy, S., Bengtson, C., Surfus, J., Harbeck, R., Huttenlocher, A., Grossman, W., Routes, J., et al. (2011). Human phagocyte defect caused by a *Rac2* mutation detected by means of neonatal screening for T-cell lymphopenia. *J. Allergy Clin. Immunol.* *127*, 535–538.e1–e2.
- Åhlin, A., and Fath, A. (2015). Chronic granulomatous disease - conventional treatment vs. hematopoietic stem cell transplantation: an update. *Curr. Opin. Hematol.* *22*, 41–45.
- Ahram, M., Litou, Z.I., Fang, R., and Al-Tawallbeh, G. (2006). Estimation of membrane proteins in the human proteome. *In Silico Biol.* *6*, 379–386.
- Amabile, G., Welner, R.S., Nombela-Arrieta, C., D’Alise, A.M., Di Ruscio, A., Ebralidze, A.K., Kravtsov, Y., Ye, M., Kocher, O., Neubergh, D.S., et al. (2013). In vivo generation of transplantable human hematopoietic cells from induced pluripotent stem cells. *Blood* *121*, 1255–1264.
- Ambruso, D.R., Knall, C., Abell, A.N., Panepinto, J., Kurkchubasche, A., Thurman, G., Gonzalez-Aller, C., Hiester, A., deBoer, M., Harbeck, R.J., et al. (2000). Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory *Rac2* mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 4654–4659.
- Amit, M., Margulets, V., Segev, H., Shariki, K., Laevsky, I., Coleman, R., and Itskovitz-Eldor, J. (2003). Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biol. Reprod.* *68*, 2150–2156.
- Amit, M., Shariki, C., Margulets, V., and Itskovitz-Eldor, J. (2004). Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biol. Reprod.* *70*, 837–845.
- Anderson, J.S., Bandi, S., Kaufman, D.S., Akkina, R. (2006). Derivation of normal macrophages from human embryonic stem (hES) cells for applications in HIV gene therapy. *Retrovirology.* *19*, 3-24.
- Andrews, P.W., Cavagnaro, J., Cavanagro, J., Deans, R., Feigal, E., Feigel, E., Horowitz, E., Keating, A., Rao, M., Turner, M., et al. (2014). Harmonizing standards for producing clinical-grade therapies from pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* *32*, 724–726.
- Anson, B.D., Kolaja, K.L., and Kamp, T.J. (2011). Opportunities for use of human iPS cells in predictive toxicology. *Clin. Pharmacol. Ther.* *89*, 754–758.

B

- Baeshen, N.A., Baeshen, M.N., Sheikh, A., Bora, R.S., Ahmed, M.M.M., Ramadan, H.A.I., Saini, K.S., and Redwan, E.M. (2014). Cell factories for insulin production. *Microb. Cell Factories* *13*, 141.
- Bakri, F.G., Martel, C., Khuri-Bulos, N., Mahafzah, A., El-Khateeb, M.S., Al-Wahadneh, A.M., Hayajneh, W.A., Hamamy, H.A., Maquet, E., Molin, M., et al. (2009). First report of clinical, functional, and molecular investigation of chronic granulomatous disease in nine Jordanian families. *J. Clin. Immunol.* *29*, 215–230.
- Bally, M., Bailey, K., Sugihara, K., Grieshaber, D., Vörös, J., and Städler, B. (2010). Liposome and lipid bilayer arrays towards biosensing applications. *Small Weinh. Bergstr. Ger.* *6*, 2481–2497.
- Bánfi, B., Malgrange, B., Knisz, J., Steger, K., Dubois-Dauphin, M., and Krause, K.-H. (2004). NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J. Biol. Chem.* *279*, 46065–46072.
- Barese, C.N., Goebel, W.S., and Dinauer, M.C. (2004). Gene therapy for chronic granulomatous disease. *Expert Opin. Biol. Ther.* *4*, 1423–1434.

- Barry, J., Hyllner, J., Stacey, G., Taylor, C.J., and Turner, M. (2015). Setting Up a Haplobank: Issues and Solutions. *Curr. Stem Cell Rep.* *1*, 110–117.
- Batot, G., Paclet, M.H., Doussi re, J., Vergnaud, S., Martel, C., Vignais, P.V., and Morel, F. (1998). Biochemical and immunochemical properties of B lymphocyte cytochrome b558. *Biochim. Biophys. Acta* *1406*, 188–202.
- Battersby, A.C., Cale, A.M., Goldblatt, D., and Gennery, A.R. (2013). Clinical manifestations of disease in X-linked carriers of chronic granulomatous disease. *J. Clin. Immunol.* *33*, 1276–1284.
- Bayart, E., and Cohen-Haguenaer, O. (2013). Technological overview of iPSC induction from human adult somatic cells. *Curr. Gene Ther.* *13*, 73–92.
- Beaumel, S., Grunwald, D., Fieschi, F., and Stasia, M.J. (2014). Identification of NOX2 regions for normal biosynthesis of cytochrome b558 in phagocytes highlighting essential residues for p22phox binding. *Biochem. J.* *464*, 425–437.
- Bedard, K., and Krause, K.-H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* *87*, 245–313.
- Bedel, A., Taillepierre, M., Guyonnet-Duperat, V., Lippert, E., Dubus, P., Dabernat, S., Mautuit, T., Cardinaud, B., Pain, C., Rousseau, B., et al. (2012). Metabolic correction of congenital erythropoietic porphyria with iPSCs free of reprogramming factors. *Am. J. Hum. Genet.* *91*, 109–121.
- Berendes, H., Bridges, R.A., and Good, R.A. (1957). A fatal granulomatosis of childhood: the clinical study of a new syndrome. *Minn. Med.* *40*, 309–312.
- van den Berg, J.M., van Koppen, E., Ahlin, A., Belohradsky, B.H., Bernatowska, E., Corbeel, L., Español, T., Fischer, A., Kurenko-Deptuch, M., Mouy, R., et al. (2009). Chronic granulomatous disease: the European experience. *PLoS One* *4*, e5234.
- Bhatia, M., Bonnet, D., Murdoch, B., Gan, O.I., and Dick, J.E. (1998). A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat. Med.* *4*, 1038–1045.
- Bhattacharya, A., Slatter, M., Curtis, A., Chapman, C.E., Barge, D., Jackson, A., Flood, T.J., Abinun, M., Cant, A.J., and Gennery, A.R. (2003). Successful umbilical cord blood stem cell transplantation for chronic granulomatous disease. *Bone Marrow Transplant.* *31*, 403–405.
- Bianchi, M., Hakkim, A., Brinkmann, V., Siler, U., Seger, R.A., Zychlinsky, A., and Reichenbach, J. (2009). Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood* *114*, 2619–2622.
- Biberstine-Kinkade, K.J., DeLeo, F.R., Epstein, R.I., LeRoy, B.A., Nauseef, W.M., and Dinauer, M.C. (2001). Heme-ligating histidines in flavocytochrome b(558): identification of specific histidines in gp91(phox). *J. Biol. Chem.* *276*, 31105–31112.
- Bielorai, B., Toren, A., Wolach, B., Mandel, M., Golan, H., Neumann, Y., Kaplinisky, C., Weintraub, M., Keller, N., Amariglio, N., et al. (2000). Successful treatment of invasive aspergillosis in chronic granulomatous disease by granulocyte transfusions followed by peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* *26*, 1025–1028.
- Bigas, A., Robert-Moreno, A., and Espinosa, L. (2010). The Notch pathway in the developing hematopoietic system. *Int. J. Dev. Biol.* *54*, 1175–1188.
- Billerbeck, E., Barry, W.T., Mu, K., Dorner, M., Rice, C.M., and Ploss, A. (2011). Development of human CD4+FoxP3+ regulatory T cells in human stem cell factor-, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-, and interleukin-3-expressing NOD-SCID IL2R γ (null) humanized mice. *Blood* *117*, 3076–3086.

- Bonnet, D., Bhatia, M., Wang, J.C., Kapp, U., and Dick, J.E. (1999). Cytokine treatment or accessory cells are required to initiate engraftment of purified primitive human hematopoietic cells transplanted at limiting doses into NOD/SCID mice. *Bone Marrow Transplant.* *23*, 203–209.
- Borregaard, N., and Cowland, J.B. (1997). Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* *89*, 3503–3521.
- Borsook, H. (1950). Protein turnover and incorporation of labeled amino acids into tissue proteins in vivo and in vitro. *Physiol. Rev.* *30*, 206–219.
- Bosma, G.C., Custer, R.P., and Bosma, M.J. (1983). A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* *301*, 527–530.
- Boulais, P.E., and Frenette, P.S. (2015). Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood* *125*, 2621–2629.
- Bowles, K.M., Vallier, L., Smith, J.R., Alexander, M.R.J., and Pedersen, R.A. (2006). HOXB4 overexpression promotes hematopoietic development by human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* *24*, 1359–1369.
- Braut, J., Goutagny, E., Telugu, N., Shao, K., Baquié, M., Satre, V., Coutton, C., Grunwald, D., Brion, J.-P., Barlogis, V., et al. (2014). Optimized Generation of Functional Neutrophils and Macrophages from Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells: Ex Vivo Models of X(0)-Linked, AR22(0)- and AR47(0)-Chronic Granulomatous Diseases. *BioResearch Open Access* *3*, 311–326.
- Brehm, M.A., and Shultz, L.D. (2012). Human allograft rejection in humanized mice: a historical perspective. *Cell. Mol. Immunol.* *9*, 225–231.
- Brehm, M.A., Cuthbert, A., Yang, C., Miller, D.M., Dilorio, P., Laning, J., Burzenski, L., Gott, B., Foreman, O., Kavirayani, A., et al. (2010a). Parameters for establishing humanized mouse models to study human immunity: analysis of human hematopoietic stem cell engraftment in three immunodeficient strains of mice bearing the IL2rgamma(null) mutation. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *135*, 84–98.
- Brehm, M.A., Cuthbert, A., Yang, C., Miller, D.M., Dilorio, P., Laning, J., Burzenski, L., Gott, B., Foreman, O., Kavirayani, A., et al. (2010b). Parameters for establishing humanized mouse models to study human immunity: analysis of human hematopoietic stem cell engraftment in three immunodeficient strains of mice bearing the IL2rgamma(null) mutation. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *135*, 84–98.
- Brehm, M.A., Racki, W.J., Leif, J., Burzenski, L., Hosur, V., Wetmore, A., Gott, B., Herlihy, M., Ignatz, R., Dunn, R., et al. (2012). Engraftment of human HSCs in nonirradiated newborn NOD-scid IL2 γ null mice is enhanced by transgenic expression of membrane-bound human SCF. *Blood* *119*, 2778–2788.
- Brehm, M.A., Wiles, M.V., Greiner, D.L., and Shultz, L.D. (2014). Generation of improved humanized mouse models for human infectious diseases. *J. Immunol. Methods.*
- Bridges, R.A., Berendes, H., and Good, R.A. (1959). A fatal granulomatous disease of childhood; the clinical, pathological, and laboratory features of a new syndrome. *AMA J. Dis. Child.* *97*, 387–408.
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F.J., and Krause, K.-H. (2012). Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med. Wkly.* *142*, w13659.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* *303*, 1532–1535.
- Brödel, A.K., Sonnabend, A., and Kubick, S. (2014). Cell-free protein expression based on extracts from CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.* *111*, 25–36.

Buescher, E.S., and Gallin, J.I. (1982). Leukocyte transfusions in chronic granulomatous disease: persistence of transfused leukocytes in sputum. *N. Engl. J. Med.* *307*, 800–803.

Burritt, J.B., Busse, S.C., Gizachew, D., Siemsen, D.W., Quinn, M.T., Bond, C.W., Dratz, E.A., and Jesaitis, A.J. (1998). Antibody imprint of a membrane protein surface. Phagocyte flavocytochrome b. *J. Biol. Chem.* *273*, 24847–24852.

C

Carlson, E.D., Gan, R., Hodgman, C.E., and Jewett, M.C. (2012). Cell-free protein synthesis: applications come of age. *Biotechnol. Adv.* *30*, 1185–1194.

Cathébras, P., Sauron, C., Morel, F., and Stasia, M.J. (2001). An unusual case of sarcoidosis. *Lancet Lond. Engl.* *358*, 294.

Catlin, S.N., Busque, L., Gale, R.E., Guttorp, P., and Abkowitz, J.L. (2011). The replication rate of human hematopoietic stem cells in vivo. *Blood* *117*, 4460–4466.

Cerdan, C., Rouleau, A., and Bhatia, M. (2004). VEGF-A165 augments erythropoietic development from human embryonic stem cells. *Blood* *103*, 2504–2512.

Cerdan, C., Hong, S.H., and Bhatia, M. (2007). Formation and hematopoietic differentiation of human embryoid bodies by suspension and hanging drop cultures. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol. Chapter 1*, Unit 1D.2.

Chadwick, K., Wang, L., Li, L., Menendez, P., Murdoch, B., Rouleau, A., and Bhatia, M. (2003). Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood* *102*, 906–915.

Chanock, S.J., Roesler, J., Zhan, S., Hopkins, P., Lee, P., Barrett, D.T., Christensen, B.L., Curnutte, J.T., and Görlach, A. (2000). Genomic structure of the human p47-phox (NCF1) gene. *Blood Cells. Mol. Dis.* *26*, 37–46.

Choi, K.-D., Vodyanik, M.A., and Slukvin, I.I. (2009a). Generation of mature human myelomonocytic cells through expansion and differentiation of pluripotent stem cell-derived lin⁻CD34⁺CD43⁺CD45⁺ progenitors. *J. Clin. Invest.* *119*, 2818–2829.

Choi, K.-D., Yu, J., Smuga-Otto, K., Salvaggio, G., Rehrauer, W., Vodyanik, M., Thomson, J., and Slukvin, I. (2009b). Hematopoietic and endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* *27*, 559–567.

Choi, K.-D., Vodyanik, M., and Slukvin, I.I. (2011). Hematopoietic differentiation and production of mature myeloid cells from human pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* *6*, 296–313.

Chong, S. (2014). Overview of cell-free protein synthesis: historic landmarks, commercial systems, and expanding applications. *Curr. Protoc. Mol. Biol. Ed. Frederick M Ausubel AI* *108*, 16.30.1–16.30.11.

Chou, B.-K., Mali, P., Huang, X., Ye, Z., Dowey, S.N., Resar, L.M., Zou, C., Zhang, Y.A., Tong, J., and Cheng, L. (2011). Efficient human iPS cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures. *Cell Res.* *21*, 518–529.

Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J., and Voytas, D.F. (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* *186*, 757–761.

Christianson, S.W., Greiner, D.L., Hesselton, R.A., Leif, J.H., Wagar, E.J., Schweitzer, I.B., Rajan, T.V., Gott, B., Roopenian, D.C., and Shultz, L.D. (1997). Enhanced human CD4⁺ T cell engraftment in beta2-microglobulin-deficient NOD-scid mice. *J. Immunol. Baltim. Md* *158*, 3578–3586.

Ciancaglini, P., Simão, A.M.S., Bolean, M., Millán, J.L., Rigos, C.F., Yoneda, J.S., Colhone, M.C., and Stabeli, R.G. (2012). Proteoliposomes in nanobiotechnology. *Biophys. Rev.* *4*, 67–81.

Coulombel, L. (2004). Identification of hematopoietic stem/progenitor cells: strength and drawbacks of functional assays. *Oncogene* 23, 7210–7222.

Cross, A.R., Rae, J., and Curnutte, J.T. (1995). Cytochrome b-245 of the neutrophil superoxide-generating system contains two nonidentical hemes. Potentiometric studies of a mutant form of gp91phox. *J. Biol. Chem.* 270, 17075–17077.

D

Dahan, I., Issaeva, I., Gorzalczy, Y., Sigal, N., Hirshberg, M., and Pick, E. (2002). Mapping of functional domains in the p22(phox) subunit of flavocytochrome b(559) participating in the assembly of the NADPH oxidase complex by “peptide walking.” *J. Biol. Chem.* 277, 8421–8432.

Dang, P.M.-C., Raad, H., Derkawi, R.A., Boussetta, T., Paclet, M.-H., Belambri, S.A., Makni-Maalej, K., Kroviarski, Y., Morel, F., Gougerot-Pocidallo, M.-A., et al. (2011). The NADPH oxidase cytosolic component p67phox is constitutively phosphorylated in human neutrophils: Regulation by a protein tyrosine kinase, MEK1/2 and phosphatases 1/2A. *Biochem. Pharmacol.* 82, 1145–1152.

Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E., and Taylor, P.R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nat. Immunol.* 14, 986–995.

Debeurme, F., Picciocchi, A., Dagher, M.-C., Grunwald, D., Beaumel, S., Fieschi, F., and Stasia, M.-J. (2010). Regulation of NADPH oxidase activity in phagocytes: relationship between FAD/NADPH binding and oxidase complex assembly. *J. Biol. Chem.* 285, 33197–33208.

Defendi, F., Decleva, E., Martel, C., Dri, P., and Stasia, M.J. (2009). A novel point mutation in the CYBB gene promoter leading to a rare X minus chronic granulomatous disease variant--impact on the microbicidal activity of neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta* 1792, 201–210.

Deffert, C., Olleros, M.L., Huiping, Y., Herrmann, F.R., Zekry, D., Garcia, I., Krause, K.-H., and Schäppi, M.G. (2011). TNF- α blockade in chronic granulomatous disease-induced hyperinflammation: patient analysis and murine model. *J. Allergy Clin. Immunol.* 128, 675–677.

DeLeo, F.R., Burritt, J.B., Yu, L., Jesaitis, A.J., Dinauer, M.C., and Nauseef, W.M. (2000). Processing and maturation of flavocytochrome b558 include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly. *J. Biol. Chem.* 275, 13986–13993.

DeLeo, F.R., Diep, B.A., and Otto, M. (2009). Host defense and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* infections. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 23, 17–34.

Deniaud, A., Liguori, L., Blesneac, I., Lenormand, J.L., and Pebay-Peyroula, E. (2010). Crystallization of the membrane protein hVDAC1 produced in cell-free system. *Biochim. Biophys. Acta* 1798, 1540–1546.

DeVries, J.K., and Zubay, G. (1967). DNA-directed peptide synthesis. II. The synthesis of the alpha-fragment of the enzyme beta-galactosidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 57, 1010–1012.

Dick, J.E., Bhatia, M., Gan, O., Kapp, U., and Wang, J.C. (1997). Assay of human stem cells by repopulation of NOD/SCID mice. *Stem Cells Dayt. Ohio* 15 *Suppl* 1, 199–203; discussion 204–207.

Dinauer, M.C., Pierce, E.A., Bruns, G.A., Curnutte, J.T., and Orkin, S.H. (1990). Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *J. Clin. Invest.* 86, 1729–1737.

Doulatov, S., Vo, L.T., Chou, S.S., Kim, P.G., Arora, N., Li, H., Hadland, B.K., Bernstein, I.D., Collins, J.J., Zon, L.I., et al. (2013). Induction of multipotential hematopoietic progenitors from human pluripotent stem cells via respecification of lineage-restricted precursors. *Cell Stem Cell* 13, 459–470.

Dreyer, A.-K., Hoffmann, D., Lachmann, N., Ackermann, M., Steinemann, D., Timm, B., Siler, U., Reichenbach, J., Grez, M., Moritz, T., et al. (2015). TALEN-mediated functional correction of X-linked chronic granulomatous disease in patient-derived induced pluripotent stem cells. *Biomaterials* *69*, 191–200.

Dupré-Crochet, S., Erard, M., and Nüße, O. (2013). ROS production in phagocytes: why, when, and where? *J. Leukoc. Biol.* *94*, 657–670.

E

Efthymiou, A.G., Chen, G., Rao, M., Chen, G., and Boehm, M. (2014). Self-renewal and cell lineage differentiation strategies in human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Expert Opin. Biol. Ther.* *14*, 1333–1344.

El-Benna, J., Dang, P.M.-C., Gougerot-Pocidallo, M.A., Marie, J.C., and Braut-Boucher, F. (2009). p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp. Mol. Med.* *41*, 217–225.

Elliott, A.M., Elliott, K.A.H., and Kammesheidt, A. (2010). High resolution array-CGH characterization of human stem cells using a stem cell focused microarray. *Mol. Biotechnol.* *46*, 234–242.

Eminli, S., Foudi, A., Stadtfeld, M., Maherali, N., Ahfeldt, T., Mostoslavsky, G., Hock, H., and Hochedlinger, K. (2009). Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat. Genet.* *41*, 968–976.

Esteban, M.A., Wang, T., Qin, B., Yang, J., Qin, D., Cai, J., Li, W., Weng, Z., Chen, J., Ni, S., et al. (2010). Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* *6*, 71–79.

Ezekowitz, R.A., Dinauer, M.C., Jaffe, H.S., Orkin, S.H., and Newburger, P.E. (1988). Partial correction of the phagocyte defect in patients with X-linked chronic granulomatous disease by subcutaneous interferon gamma. *N. Engl. J. Med.* *319*, 146–151.

Ezure, T., Suzuki, T., Shikata, M., Ito, M., Ando, E., Utsumi, T., Nishimura, O., and Tsunasawa, S. (2010). Development of an insect cell-free system. *Curr. Pharm. Biotechnol.* *11*, 279–284.

F

Fagerberg, L., Jonasson, K., von Heijne, G., Uhlén, M., and Berglund, L. (2010). Prediction of the human membrane proteome. *Proteomics* *10*, 1141–1149.

Fanconi, S., Seger, R., Gmür, J., Willi, U., Schaer, G., Spiess, H., Otto, R., and Hitzig, W.H. (1985). Surgery and granulocyte transfusions for life-threatening infections in chronic granulomatous disease. *Helv. Paediatr. Acta* *40*, 277–284.

Feng, B., Ng, J.-H., Heng, J.-C.D., and Ng, H.-H. (2009). Molecules that promote or enhance reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* *4*, 301–312.

Fernández, S., Fajardo, E.M., Mandiarote, A., Año, G., Padrón, M.A., Acosta, M., Cabrera, R.A., Riverón, L.A., Álvarez, M., Blain, K., et al. (2013). A proteoliposome formulation derived from *Bordetella pertussis* induces protection in two murine challenge models. *BMC Immunol.* *14 Suppl 1*, S8.

Fernandez-Boyanapalli, R., Frasnich, S.C., Riches, D.W.H., Vandivier, R.W., Henson, P.M., and Bratton, D.L. (2010). PPAR γ activation normalizes resolution of acute sterile inflammation in murine chronic granulomatous disease. *Blood* *116*, 4512–4522.

Flynn, R., Grundmann, A., Renz, P., Haenseler, W., James, W.S., Cowley, S.A., and Moore, M.D. (2015). CRISPR-mediated genotypic and phenotypic correction of a chronic granulomatous disease mutation in human iPS cells. *Exp. Hematol.*

- Franzen, U., Vermehren, C., Jensen, H., and Østergaard, J. (2011). Physicochemical characterization of a PEGylated liposomal drug formulation using capillary electrophoresis. *Electrophoresis* *32*, 738–748.
- Fuchs, T.A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* *176*, 231–241.
- Fujita, M., Harada, E., Matsumoto, T., Mizuta, Y., Ikegame, S., Ouchi, H., Inoshima, I., Yoshida, S., Watanabe, K., and Nakanishi, Y. (2010). Impaired host defence against *Mycobacterium avium* in mice with chronic granulomatous disease. *Clin. Exp. Immunol.* *160*, 457–460.
- Fukushima, H., Mizutani, M., Imamura, K., Morino, K., Kobayashi, J., Okumura, K., Tsumoto, K., and Yoshimura, T. (2008). Development of a novel preparation method of recombinant proteoliposomes using baculovirus gene expression systems. *J. Biochem. (Tokyo)* *144*, 763–770.
- Fukushima, H., Matsuo, H., Imamura, K., Morino, K., Okumura, K., Tsumoto, K., and Yoshimura, T. (2009). Diagnosis and discrimination of autoimmune Graves' disease and Hashimoto's disease using thyroid-stimulating hormone receptor-containing recombinant proteoliposomes. *J. Biosci. Bioeng.* *108*, 551–556.
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., and Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* *85*, 348–362.

G

- Gallin, J.I., Alling, D.W., Malech, H.L., Wesley, R., Koziol, D., Marciano, B., Eisenstein, E.M., Turner, M.L., DeCarlo, E.S., Starling, J.M., et al. (2003). Itraconazole to prevent fungal infections in chronic granulomatous disease. *N. Engl. J. Med.* *348*, 2416–2422.
- Gayet, L., and Lenormand, J.-L. (2015). [Biomimetic sensors in biomedical research]. *Médecine Sci. MS* *31*, 654–659.
- Giorgetti, A., Montserrat, N., Aasen, T., Gonzalez, F., Rodríguez-Pizà, I., Vassena, R., Raya, A., Boué, S., Barrero, M.J., Corbella, B.A., et al. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell Stem Cell* *5*, 353–357.
- Glimm, H., Eisterer, W., Lee, K., Cashman, J., Holyoake, T.L., Nicolini, F., Shultz, L.D., von Kalle, C., and Eaves, C.J. (2001). Previously undetected human hematopoietic cell populations with short-term repopulating activity selectively engraft NOD/SCID-beta2 microglobulin-null mice. *J. Clin. Invest.* *107*, 199–206.
- Goldblatt, D. (2002). Current treatment options for chronic granulomatous disease. *Expert Opin. Pharmacother.* *3*, 857–863.
- Gonçalves, A.M., Pedro, A.Q., Maia, C., Sousa, F., Queiroz, J.A., and Passarinha, L.A. (2013). *Pichia pastoris*: a recombinant microfactory for antibodies and human membrane proteins. *J. Microbiol. Biotechnol.* *23*, 587–601.
- González, F., Boué, S., and Izpisua Belmonte, J.C. (2011). Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming à la carte. *Nat. Rev. Genet.* *12*, 231–242.
- Görlach, A., Lee, P.L., Roesler, J., Hopkins, P.J., Christensen, B., Green, E.D., Chanock, S.J., and Curnutte, J.T. (1997). A p47-phox pseudogene carries the most common mutation causing p47-phox-deficient chronic granulomatous disease. *J. Clin. Invest.* *100*, 1907–1918.
- Goudemand, J., Anssens, R., Delmas-Marsalet, Y., Farriaux, J.P., and Fontaine, G. (1976). [Attempt to treat a case of chronic familial granulomatous disease by allogenic bone marrow transplantation]. *Arch. Fr. Pédiatrie* *33*, 121–129.

- Gourraud, P.-A., Gilson, L., Girard, M., and Peschanski, M. (2012). The role of human leukocyte antigen matching in the development of multiethnic “haplobank” of induced pluripotent stem cell lines. *Stem Cells Dayt. Ohio* 30, 180–186.
- Goździk, J., Pituch-Noworolska, A., Skoczeń, S., Czogała, W., Wędrychowicz, A., Baran, J., Krasowska-Kwiecień, A., Wiecha, O., and Zembala, M. (2011). Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation as therapy for chronic granulomatous disease--single centre experience. *J. Clin. Immunol.* 31, 332–337.
- Grabundzija, I., Wang, J., Sebe, A., Erdei, Z., Kajdi, R., Devaraj, A., Steinemann, D., Szuhai, K., Stein, U., Cantz, T., et al. (2013). Sleeping Beauty transposon-based system for cellular reprogramming and targeted gene insertion in induced pluripotent stem cells. *Nucleic Acids Res.* 41, 1829–1847.
- Greenberg, D.E., Ding, L., Zelazny, A.M., Stock, F., Wong, A., Anderson, V.L., Miller, G., Kleiner, D.E., Tenorio, A.R., Brinster, L., et al. (2006). A Novel Bacterium Associated with Lymphadenitis in a Patient with Chronic Granulomatous Disease. *PLoS Pathog.* 2, e28.
- Greiner, D.L., Shultz, L.D., Yates, J., Appel, M.C., Perdrizet, G., Hesselton, R.M., Schweitzer, I., Beamer, W.G., Shultz, K.L., and Pelsue, S.C. (1995). Improved engraftment of human spleen cells in NOD/LtSz-scid/scid mice as compared with C.B-17-scid/scid mice. *Am. J. Pathol.* 146, 888–902.
- Grez, M., Reichenbach, J., Schwäble, J., Seger, R., Dinauer, M.C., and Thrasher, A.J. (2011). Gene therapy of chronic granulomatous disease: the engraftment dilemma. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 19, 28–35.
- Grizot, S., Fieschi, F., Dagher, M.C., and Pebay-Peyroula, E. (2001a). The active N-terminal region of p67phox. Structure at 1.8 Å resolution and biochemical characterizations of the A128V mutant implicated in chronic granulomatous disease. *J. Biol. Chem.* 276, 21627–21631.
- Grizot, S., Fauré, J., Fieschi, F., Vignais, P.V., Dagher, M.C., and Pebay-Peyroula, E. (2001b). Crystal structure of the Rac1-RhoGDI complex involved in nadph oxidase activation. *Biochemistry (Mosc.)* 40, 10007–10013.
- Groemping, Y., and Rittinger, K. (2005). Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem. J.* 386, 401–416.
- Guarino, C., and DeLisa, M.P. (2012). A prokaryote-based cell-free translation system that efficiently synthesizes glycoproteins. *Glycobiology* 22, 596–601.
- Güngör, T., Halter, J., Klink, A., Junge, S., Stumpe, K.D.M., Seger, R., and Schanz, U. (2005). Successful low toxicity hematopoietic stem cell transplantation for high-risk adult chronic granulomatous disease patients. *Transplantation* 79, 1596–1606.
- Güngör, T., Teira, P., Slatter, M., Stussi, G., Stepensky, P., Moshous, D., Vermont, C., Ahmad, I., Shaw, P.J., Telles da Cunha, J.M., et al. (2014). Reduced-intensity conditioning and HLA-matched haemopoietic stem-cell transplantation in patients with chronic granulomatous disease: a prospective multicentre study. *Lancet Lond. Engl.* 383, 436–448.

H

- Han, C.H., Freeman, J.L., Lee, T., Motalebi, S.A., and Lambeth, J.D. (1998). Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox). *J. Biol. Chem.* 273, 16663–16668.
- Handgretinger, R., and Kuçi, S. (2013). CD133-Positive Hematopoietic Stem Cells: From Biology to Medicine. *Adv. Exp. Med. Biol.* 777, 99–111.

- Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C.-W., Meissner, A., Cassady, J.P., Beard, C., Brambrink, T., Wu, L.-C., Townes, T.M., et al. (2007). Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPSCs generated from autologous skin. *Science* 318, 1920–1923.
- Hanna, J., Saha, K., Pando, B., van Zon, J., Lengner, C.J., Creighton, M.P., van Oudenaarden, A., and Jaenisch, R. (2009). Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* 462, 595–601.
- Harbers, M. (2014). Wheat germ systems for cell-free protein expression. *FEBS Lett.* 588, 2762–2773.
- Harding, J., and Mirochnitchenko, O. (2014). Preclinical studies for induced pluripotent stem cell-based therapeutics. *J. Biol. Chem.* 289, 4585–4593.
- Harper, A.M., Chaplin, M.F., and Segal, A.W. (1985). Cytochrome b-245 from human neutrophils is a glycoprotein. *Biochem. J.* 227, 783–788.
- Hasegawa, D., Fukushima, M., Hosokawa, Y., Takeda, H., Kawasaki, K., Mizukami, T., Nuno, H., Ochiai, H., Morio, T., and Kosaka, Y. (2008). Successful treatment of chronic granulomatous disease with fludarabine-based reduced-intensity conditioning and unrelated bone marrow transplantation. *Int. J. Hematol.* 87, 88–90.
- Hayakawa, J., Hsieh, M.M., Uchida, N., Phang, O., and Tisdale, J.F. (2009). Busulfan produces efficient human cell engraftment in NOD/LtSz-Scid IL2Rgamma(null) mice. *Stem Cells Dayt. Ohio* 27, 175–182.
- He, M., He, Y., Luo, Q., and Wang, M. (2011). From DNA to protein: No living cells required. *Process Biochem.* 46, 615–620.
- Heim, K.F., Fleisher, T.A., Stroncek, D.F., Holland, S.M., Gallin, J.I., Malech, H.L., and Leitman, S.F. (2011). The relationship between alloimmunization and posttransfusion granulocyte survival: experience in a chronic granulomatous disease cohort. *Transfusion (Paris)* 51, 1154–1162.
- Higuchi, A., Ling, Q.-D., Kumar, S.S., Munusamy, M.A., Alarfaj, A.A., Chang, Y., Kao, S.-H., Lin, K.-C., Wang, H.-C., and Umezawa, A. (2015). Generation of pluripotent stem cells without the use of genetic material. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 95, 26–42.
- Hodiamont, C.J., Dolman, K.M., Ten Berge, I.J.M., Melchers, W.J.G., Verweij, P.E., and Pajkrt, D. (2009). Multiple-azole-resistant *Aspergillus fumigatus* osteomyelitis in a patient with chronic granulomatous disease successfully treated with long-term oral posaconazole and surgery. *Med. Mycol. Off. Publ. Int. Soc. Hum. Anim. Mycol.* 47, 217–220.
- Hogenes, M., Huibers, M., Kroone, C., and de Weger, R. (2014). Humanized mouse models in transplantation research. *Transplant. Rev. Orlando Fla* 28, 103–110.
- Holland, S.M. (2010). Chronic granulomatous disease. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 38, 3–10.
- Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Kanagawa, O., Nakagawa, M., Okita, K., and Yamanaka, S. (2009). Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* 460, 1132–1135.
- Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., Zhao, T., Ye, J., Yang, W., Liu, K., et al. (2013). Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science* 341, 651–654.
- Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A.E., and Melton, D.A. (2008a). Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat. Biotechnol.* 26, 795–797.
- Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., and Melton, D.A. (2008b). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat. Biotechnol.* 26, 1269–1275.

I

- Inoue, T., Kulkeaw, K., Okayama, S., Tani, K., and Sugiyama, D. (2011). Variation in mesodermal and hematopoietic potential of adult skin-derived induced pluripotent stem cell lines in mice. *Stem Cell Rev.* *7*, 958–968.
- International Chronic Granulomatous Disease Cooperative Study Group (1991). A controlled trial of interferon gamma to prevent infection in chronic granulomatous disease. *N. Engl. J. Med.* *324*, 509–516.
- Inzunza, J., Gertow, K., Strömberg, M.A., Matilainen, E., Blennow, E., Skottman, H., Wolbank, S., Ahrlund-Richter, L., and Hovatta, O. (2005). Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* *23*, 544–549.
- Ishikawa, F., Yasukawa, M., Lyons, B., Yoshida, S., Miyamoto, T., Yoshimoto, G., Watanabe, T., Akashi, K., Shultz, L.D., and Harada, M. (2005). Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor $\{\gamma\}$ chain(null) mice. *Blood* *106*, 1565–1573.
- Ito, M., Hiramatsu, H., Kobayashi, K., Suzue, K., Kawahata, M., Hioki, K., Ueyama, Y., Koyanagi, Y., Sugamura, K., Tsuji, K., et al. (2002). NOD/SCID/ γ (c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* *100*, 3175–3182.
- Ito, R., Takahashi, T., Katano, I., and Ito, M. (2012). Current advances in humanized mouse models. *Cell. Mol. Immunol.* *9*, 208–214.

J

- Jackson, R.J., and Hunt, T. (1983). Preparation and use of nuclease-treated rabbit reticulocyte lysates for the translation of eukaryotic messenger RNA. *Methods Enzymol.* *96*, 50–74.
- Jackson, S.H., Gallin, J.I., and Holland, S.M. (1995). The p47phox mouse knock-out model of chronic granulomatous disease. *J. Exp. Med.* *182*, 751–758.
- Jackson, S.H., Miller, G.F., Segal, B.H., Mardiney, M., 3rd, Domachowske, J.B., Gallin, J.I., and Holland, S.M. (2001). IFN- γ is effective in reducing infections in the mouse model of chronic granulomatous disease (CGD). *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* *21*, 567–573.
- Jaing, T.-H., Lee, W.I., Cheng, P.-J., Chen, S.-H., Huang, J.-L., and Soong, Y.-K. (2010). Successful unrelated donor cord blood transplantation for chronic granulomatous disease. *Int. J. Hematol.* *91*, 670–672.
- Janeway, C., Craig, J., and Davidson, M. (1954). Hypergammaglobulinemia associated with severe, recurrent and chronic non-specific infection. *Am. J. Dis. Child.* *88*, 388–392.
- Ji, J., Vijayaragavan, K., Bosse, M., Menendez, P., Weisel, K., and Bhatia, M. (2008). OP9 stroma augments survival of hematopoietic precursors and progenitors during hematopoietic differentiation from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* *26*, 2485–2495.
- Jiang, Y., Cowley, S.A., Siler, U., Melguizo, D., Tilgner, K., Browne, C., Dewilton, A., Przyborski, S., Saretzki, G., James, W.S., et al. (2012). Derivation and functional analysis of patient-specific induced pluripotent stem cells as an in vitro model of chronic granulomatous disease. *Stem Cells Dayt. Ohio* *30*, 599–611.
- Jung, D.-W., Kim, W.-H., and Williams, D.R. (2014). Reprogram or reboot: small molecule approaches for the production of induced pluripotent stem cells and direct cell reprogramming. *ACS Chem. Biol.* *9*, 80–95.

Junge, F., Haberstock, S., Roos, C., Stefer, S., Proverbio, D., Dötsch, V., and Bernhard, F. (2011). Advances in cell-free protein synthesis for the functional and structural analysis of membrane proteins. *New Biotechnol.* *28*, 262–271.

K

Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., and Woltjen, K. (2009). Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* *458*, 771–775.

Kang, E.M., and Malech, H.L. (2009). Advances in treatment for chronic granulomatous disease. *Immunol. Res.* *43*, 77–84.

Kang, E.M., and Malech, H.L. (2012). Gene therapy for chronic granulomatous disease. *Methods Enzymol.* *507*, 125–154.

Kang, E.M., Choi, U., Theobald, N., Linton, G., Long Priel, D.A., Kuhns, D., and Malech, H.L. (2010). Retrovirus gene therapy for X-linked chronic granulomatous disease can achieve stable long-term correction of oxidase activity in peripheral blood neutrophils. *Blood* *115*, 783–791.

Kang, E.M., Marciano, B.E., DeRavin, S., Zarembek, K.A., Holland, S.M., and Malech, H.L. (2011a). Chronic granulomatous disease: overview and hematopoietic stem cell transplantation. *J. Allergy Clin. Immunol.* *127*, 1319–1326; quiz 1327–1328.

Kang, H.J., Bartholomae, C.C., Paruzynski, A., Arens, A., Kim, S., Yu, S.S., Hong, Y., Joo, C.-W., Yoon, N.-K., Rhim, J.-W., et al. (2011b). Retroviral gene therapy for X-linked chronic granulomatous disease: results from phase I/II trial. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *19*, 2092–2101.

Kardel, M.D., and Eaves, C.J. (2012). Modeling human hematopoietic cell development from pluripotent stem cells. *Exp. Hematol.* *40*, 601–611.

Karlsson, K.R., Cowley, S., Martinez, F.O., Shaw, M., Minger, S.L., and James, W. (2008). Homogeneous monocytes and macrophages from human embryonic stem cells following coculture-free differentiation in M-CSF and IL-3. *Exp. Hematol.* *36*, 1167–1175.

Katzen, F., Chang, G., and Kudlicki, W. (2005). The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends Biotechnol.* *23*, 150–156.

Katzen, F., Peterson, T.C., and Kudlicki, W. (2009). Membrane protein expression: no cells required. *Trends Biotechnol.* *27*, 455–460.

Kaufman, D.S., Hanson, E.T., Lewis, R.L., Auerbach, R., and Thomson, J.A. (2001). Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 10716–10721.

Kaufmann, K.B., Brendel, C., Suerth, J.D., Mueller-Kuller, U., Chen-Wichmann, L., Schwäble, J., Pahujani, S., Kunkel, H., Schambach, A., Baum, C., et al. (2013). Alpharetroviral vector-mediated gene therapy for X-CGD: functional correction and lack of aberrant splicing. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *21*, 648–661.

Kaufmann, K.B., Chiriaco, M., Siler, U., Finocchi, A., Reichenbach, J., Stein, S., and Grez, M. (2014). Gene therapy for chronic granulomatous disease: current status and future perspectives. *Curr. Gene Ther.* *14*, 447–460.

Kaushansky, A., Mikolajczak, S.A., Vignali, M., and Kappe, S.H.I. (2014). Of men in mice: the success and promise of humanized mouse models for human malaria parasite infections. *Cell. Microbiol.* *16*, 602–611.

Kawamata, S., Kanemura, H., Sakai, N., Takahashi, M., and Go, M.J. (2015). Design of a Tumorigenicity Test for Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Derived Cell Products. *J. Clin. Med.* *4*, 159–171.

- Kawamura, T., Suzuki, J., Wang, Y.V., Menendez, S., Morera, L.B., Raya, A., Wahl, G.M., and Izpisua Belmonte, J.C. (2009). Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 460, 1140–1144.
- Kennedy, M., D'Souza, S.L., Lynch-Kattman, M., Schwantz, S., and Keller, G. (2007). Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures. *Blood* 109, 2679–2687.
- Kennedy, M., Awong, G., Sturgeon, C.M., Ditadi, A., LaMotte-Mohs, R., Zúñiga-Pflücker, J.C., and Keller, G. (2012). T lymphocyte potential marks the emergence of definitive hematopoietic progenitors in human pluripotent stem cell differentiation cultures. *Cell Rep.* 2, 1722–1735.
- Kenney, R.T., Malech, H.L., Epstein, N.D., Roberts, R.L., and Leto, T.L. (1993). Characterization of the p67phox gene: genomic organization and restriction fragment length polymorphism analysis for prenatal diagnosis in chronic granulomatous disease. *Blood* 82, 3739–3744.
- Khoury, G.A., Baliban, R.C., and Floudas, C.A. (2011). Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Sci. Rep.* 1.
- Khow, O., and Suntrarachun, S. (2012). Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2, 159–162.
- Kigawa, T., Yabuki, T., Matsuda, N., Matsuda, T., Nakajima, R., Tanaka, A., and Yokoyama, S. (2004). Preparation of Escherichia coli cell extract for highly productive cell-free protein expression. *J. Struct. Funct. Genomics* 5, 63–68.
- Kim, D.-M., and Swartz, J.R. (2004). Efficient production of a bioactive, multiple disulfide-bonded protein using modified extracts of Escherichia coli. *Biotechnol. Bioeng.* 85, 122–129.
- Kim, D., Kim, C.-H., Moon, J.-I., Chung, Y.-G., Chang, M.-Y., Han, B.-S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R., et al. (2009). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4, 472–476.
- Kim, H.-Y., Kim, H.-J., Ki, C.-S., Kim, D.W., Yoo, K.H., and Kang, E.-S. (2013). Rapid determination of chimerism status using dihydrorhodamine assay in a patient with X-linked chronic granulomatous disease following hematopoietic stem cell transplantation. *Ann. Lab. Med.* 33, 288–292.
- Kim, K., Zhao, R., Doi, A., Ng, K., Unternaehrer, J., Cahan, P., Huo, H., Loh, Y.-H., Aryee, M.J., Lensch, M.W., et al. (2011). Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 29, 1117–1119.
- Kim, S.J., Kim, B.S., Ryu, S.W., Yoo, J.H., Oh, J.H., Song, C.H., Kim, S.H., Choi, D.S., Seo, J.H., Choi, C.W., et al. (2005). Hematopoietic Differentiation of Embryoid Bodies Derived from the Human Embryonic Stem Cell Line SNUHES3 in Co-culture with Human Bone Marrow Stromal Cells. *Yonsei Med. J.* 46, 693.
- Kishida, K.T., Hoeffler, C.A., Hu, D., Pao, M., Holland, S.M., and Klann, E. (2006). Synaptic plasticity deficits and mild memory impairments in mouse models of chronic granulomatous disease. *Mol. Cell. Biol.* 26, 5908–5920.
- Klammt, C., Schwarz, D., Fendler, K., Haase, W., Dötsch, V., and Bernhard, F. (2005). Evaluation of detergents for the soluble expression of alpha-helical and beta-barrel-type integral membrane proteins by a preparative scale individual cell-free expression system. *FEBS J.* 272, 6024–6038.
- Klammt, C., Schwarz, D., Löhr, F., Schneider, B., Dötsch, V., and Bernhard, F. (2006). Cell-free expression as an emerging technique for the large scale production of integral membrane protein. *FEBS J.* 273, 4141–4153.

- Kleinberg, M.E., Rotrosen, D., and Malech, H.L. (1989). Asparagine-linked glycosylation of cytochrome b558 large subunit varies in different human phagocytic cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *143*, 4152–4157.
- Kleinman, H.K., McGarvey, M.L., Hassell, J.R., Star, V.L., Cannon, F.B., Laurie, G.W., and Martin, G.R. (1986). Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry (Mosc.)* *25*, 312–318.
- Klepsch, M.M., Persson, J.O., and de Gier, J.-W.L. (2011). Consequences of the overexpression of a eukaryotic membrane protein, the human KDEL receptor, in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* *407*, 532–542.
- Knaus, U.G., Heyworth, P.G., Evans, T., Curnutte, J.T., and Bokoch, G.M. (1991). Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science* *254*, 1512–1515.
- Knop, J., Hanses, F., Leist, T., Archin, N.M., Buchholz, S., Gläsner, J., Gessner, A., and Wege, A.K. (2015). Staphylococcus aureus Infection in Humanized Mice: A New Model to Study Pathogenicity Associated With Human Immune Response. *J. Infect. Dis.* *212*, 435–444.
- Knop, K., Hoogenboom, R., Fischer, D., and Schubert, U.S. (2010). Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *49*, 6288–6308.
- Kobari, L., Yates, F., Oudrhiri, N., Francina, A., Kiger, L., Mazurier, C., Rouzbeh, S., El-Nemer, W., Hebert, N., Giarratana, M.-C., et al. (2012). Human induced pluripotent stem cells can reach complete terminal maturation: in vivo and in vitro evidence in the erythropoietic differentiation model. *Haematologica* *97*, 1795–1803.
- Kobayashi, T., Kato-Itoh, M., and Nakauchi, H. (2015). Targeted organ generation using Mixl1-inducible mouse pluripotent stem cells in blastocyst complementation. *Stem Cells Dev.* *24*, 182–189.
- Koglin, A., Klammt, C., Trbovic, N., Schwarz, D., Schneider, B., Schäfer, B., Löhr, F., Bernhard, F., and Dötsch, V. (2006). Combination of cell-free expression and NMR spectroscopy as a new approach for structural investigation of membrane proteins. *Magn. Reson. Chem. MRC* *44 Spec No*, S17–S23.
- Kollet, O., Peled, A., Byk, T., Ben-Hur, H., Greiner, D., Shultz, L., and Lapidot, T. (2000). beta2 microglobulin-deficient (B2m(null)) NOD/SCID mice are excellent recipients for studying human stem cell function. *Blood* *95*, 3102–3105.
- Kraft, T.E., Hresko, R.C., and Hruz, P.W. (2015). Expression, Purification, and Functional Characterization of the Insulin-Responsive Facilitative Glucose Transporter GLUT4. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.*
- Kreir, M., Farre, C., Beckler, M., George, M., and Fertig, N. (2008). Rapid screening of membrane protein activity: electrophysiological analysis of OmpF reconstituted in proteoliposomes. *Lab. Chip* *8*, 587–595.
- Kuhns, D.B., Alvord, W.G., Heller, T., Feld, J.J., Pike, K.M., Marciano, B.E., Uzel, G., DeRavin, S.S., Priel, D.A.L., Soule, B.P., et al. (2010). Residual NADPH oxidase and survival in chronic granulomatous disease. *N. Engl. J. Med.* *363*, 2600–2610.
- Kuzmov, A., and Minko, T. (2015). Nanotechnology approaches for inhalation treatment of lung diseases. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*
- Kyba, M., Perlingeiro, R.C.R., and Daley, G.Q. (2002). HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. *Cell* *109*, 29–37.

L

- Lachmann, N., Ackermann, M., Frenzel, E., Liebhaber, S., Brenning, S., Happle, C., Hoffmann, D., Klimenkova, O., Lüttge, D., Buchegger, T., et al. (2015). Large-scale hematopoietic differentiation of

- human induced pluripotent stem cells provides granulocytes or macrophages for cell replacement therapies. *Stem Cell Rep.* **4**, 282–296.
- Lambeth, J.D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 181–189.
- Lamshead, J.W., Meagher, L., O'Brien, C., and Laslett, A.L. (2013). Defining synthetic surfaces for human pluripotent stem cell culture. *Cell Regen. Lond. Engl.* **2**, 7.
- Laouini, A., Jaafar-Maalej, C., Limayem-Blouza, I., Sfar, S., Charcosset, C., and Fessi, H. (2012). Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *J. Colloid Sci. Biotechnol.* **1**, 147–168.
- Lapasset, L., Milhavet, O., Prieur, A., Besnard, E., Babled, A., Aït-Hamou, N., Leschik, J., Pellestor, F., Ramirez, J.-M., De Vos, J., et al. (2011). Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes Dev.* **25**, 2248–2253.
- Lapidot, T., and Kollet, O. (2002). The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Leukemia* **16**, 1992–2003.
- Lapillonne, H., Kobari, L., Mazurier, C., Tropel, P., Giarratana, M.-C., Zanella-Cleon, I., Kiger, L., Wattenhofer-Donzé, M., Puccio, H., Hebert, N., et al. (2010). Red blood cell generation from human induced pluripotent stem cells: perspectives for transfusion medicine. *Haematologica* **95**, 1651–1659.
- Laugsch, M., Rostovskaya, M., Velychko, S., Richter, C., Zimmer, A., Klink, B., Schröck, E., Haase, M., Neumann, K., Thieme, S., et al. (2015). Functional restoration of gp91phox-oxidase activity by BAC transgenesis and gene targeting in X-linked chronic granulomatous disease iPSCs. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*
- Ledran, M.H., Krassowska, A., Armstrong, L., Dimmick, I., Renström, J., Lang, R., Yung, S., Santibanez-Coref, M., Dzierzak, E., Stojkovic, M., et al. (2008). Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches. *Cell Stem Cell* **3**, 85–98.
- Lee, G.S., Kim, B.S., Sheih, J.-H., and Moore, M. (2008). Forced expression of HoxB4 enhances hematopoietic differentiation by human embryonic stem cells. *Mol. Cells* **25**, 487–493.
- Legrand, N., Weijer, K., and Spits, H. (2008). Experimental model for the study of the human immune system: production and monitoring of “human immune system” Rag2^{-/-}gamma c^{-/-} mice. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **415**, 65–82.
- Leiding, J.W., Freeman, A.F., Marciano, B.E., Anderson, V.L., Uzel, G., Malech, H.L., DeRavin, S., Wilks, D., Venkatesan, A.M., Zerbe, C.S., et al. (2012). Corticosteroid therapy for liver abscess in chronic granulomatous disease. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **54**, 694–700.
- Leiding, J.W., Marciano, B.E., Zerbe, C.S., Deravin, S.S., Malech, H.L., and Holland, S.M. (2013). Diabetes, renal and cardiovascular disease in p47 phox^{-/-} chronic granulomatous disease. *J. Clin. Immunol.* **33**, 725–730.
- Lengerke, C., Grauer, M., Niebuhr, N.I., Riedt, T., Kanz, L., Park, I.-H., and Daley, G.Q. (2009). Hematopoietic development from human induced pluripotent stem cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1176**, 219–227.
- Lepus, C.M., Gibson, T.F., Gerber, S.A., Kawikova, I., Szczepanik, M., Hossain, J., Ablamunits, V., Kirkiles-Smith, N., Herold, K.C., Donis, R.O., et al. (2009). Comparison of human fetal liver, umbilical cord blood, and adult blood hematopoietic stem cell engraftment in NOD-scid/gammac^{-/-}, Balb/c-Rag1^{-/-}gammac^{-/-}, and C.B-17-scid/bg immunodeficient mice. *Hum. Immunol.* **70**, 790–802.

- Levenstein, M.E., Ludwig, T.E., Xu, R.-H., Llanas, R.A., VanDenHeuvel-Kramer, K., Manning, D., and Thomson, J.A. (2006). Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells Dayt. Ohio* 24, 568–574.
- Li, F., Linton, G.F., Sekhsaria, S., Whiting-Theobald, N., Katkin, J.P., Gallin, J.I., and Malech, H.L. (1994). CD34+ peripheral blood progenitors as a target for genetic correction of the two flavocytochrome b558 defective forms of chronic granulomatous disease. *Blood* 84, 53–58.
- Li, H.L., Nakano, T., and Hotta, A. (2014). Genetic correction using engineered nucleases for gene therapy applications. *Dev. Growth Differ.* 56, 63–77.
- Li, H.L., Fujimoto, N., Sasakawa, N., Shirai, S., Ohkame, T., Sakuma, T., Tanaka, M., Amano, N., Watanabe, A., Sakurai, H., et al. (2015). Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Rep.* 4, 143–154.
- Li, X.J., Grunwald, D., Mathieu, J., Morel, F., and Stasia, M.-J. (2005). Crucial role of two potential cytosolic regions of Nox2, 191TSSTKTIRRS200 and 484DESQANHFVHHDEEKD500, on NADPH oxidase activation. *J. Biol. Chem.* 280, 14962–14973.
- Lieber, J.G., Webb, S., Suratt, B.T., Young, S.K., Johnson, G.L., Keller, G.M., Worthen, G.S. (2004). The in vitro production and characterization of neutrophils from embryonic stem cells. *Blood.* 103, 852-9.
- Lieschke, G.J., Dunn, A.R. (1995). Development of functional macrophages from embryonal stem cells in vitro. *Exp Hematol.* 23, 328-34.
- Liese, J.G., Jendrossek, V., Jansson, A., Petropoulou, T., Kloos, S., Gahr, M., and Belohradsky, B.H. (1996). Chronic granulomatous disease in adults. *Lancet* 347, 220–223.
- Liguori, L., Marques, B., Villegas-Mendez, A., Rothe, R., and Lenormand, J.-L. (2008). Liposomes-mediated delivery of pro-apoptotic therapeutic membrane proteins. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 126, 217–227.
- Liguori, L., Blesneac, I., Madern, D., Vivaudou, M., and Lenormand, J.-L. (2010). Single-step production of functional OEP24 proteoliposomes. *Protein Expr. Purif.* 69, 106–111.
- Liguori, L., Pastorino, F., Rousset, X., Alfano, S., Cortes, S., Emionite, L., Daga, A., Ponzoni, M., and Lenormand, J.-L. (2015). Anti-Tumor Effects of Bak-Proteoliposomes against Glioblastoma. *Mol. Basel Switz.* 20, 15893–15909.
- Lin, T., and Wu, S. (2015). Reprogramming with Small Molecules instead of Exogenous Transcription Factors. *Stem Cells Int.* 2015, 794632.
- Lin, C.-J., Wang, S.-C., Ku, C.-L., Kao, J.-K., Chen, M., and Liu, C.-S. (2013). Successful Unrelated Cord Blood Stem Cell Transplantation in an X-linked Chronic Granulomatous Disease Patient with Disseminated BCG-induced Infection. *Pediatr. Neonatol.*
- Lindmark, H., Rosengren, B., Hurt-Camejo, E., Bruder, C.E. (2004). Gene expression profiling shows that macrophages derived from mouse embryonic stem cells is an improved in vitro model for studies of vascular disease. *Exp Cell Res.* 300, 335-44.
- Lingappa, V.R., Lingappa, J.R., Prasad, R., Ebner, K.E., and Blobel, G. (1978). Coupled cell-free synthesis, segregation, and core glycosylation of a secretory protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 2338–2342.
- Litzinger, D.C., Buiting, A.M., van Rooijen, N., and Huang, L. (1994). Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipathic poly(ethylene glycol)-containing liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1190, 99–107.

- Liu, S., Xu, Y., Zhou, Z., Feng, B., and Huang, H. (2015). Progress and challenges in generating functional hematopoietic stem/progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Cytotherapy*.
- Loisel, T.P., Ansanay, H., St-Onge, S., Gay, B., Boulanger, P., Strosberg, A.D., Marullo, S., and Bouvier, M. (1997). Recovery of homogeneous and functional beta 2-adrenergic receptors from extracellular baculovirus particles. *Nat. Biotechnol.* *15*, 1300–1304.
- López, F.C.R., de Luna, F.F.-A., Delgado, M.C.G., de la Rosa, I.I., Valdezate, S., Nieto, J.A.S., and Casal, M. (2008). *Granulibacter thebesdensis* isolated in a child patient with chronic granulomatous disease. *J. Infect.* *57*, 275–277.
- Lu, M., Kardel, M.D., O'Connor, M.D., and Eaves, C.J. (2009). Enhanced generation of hematopoietic cells from human hepatocarcinoma cell-stimulated human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Exp. Hematol.* *37*, 924–936.e4.
- Lublin, M., Bartlett, D.L., Danforth, D.N., Kauffman, H., Gallin, J.I., Malech, H.L., Shawker, T., Choyke, P., Kleiner, D.E., Schwartzentruber, D.J., et al. (2002). Hepatic abscess in patients with chronic granulomatous disease. *Ann. Surg.* *235*, 383–391.
- de Luca, A., Smeekens, S.P., Casagrande, A., Iannitti, R., Conway, K.L., Gresnigt, M.S., Begun, J., Plantinga, T.S., Joosten, L.A.B., van der Meer, J.W.M., et al. (2014). IL-1 receptor blockade restores autophagy and reduces inflammation in chronic granulomatous disease in mice and in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 3526–3531.
- Ludin, A., Gur-Cohen, S., Golan, K., Kaufmann, K.B., Itkin, T., Medaglia, C., Lu, X.-J., Ledergor, G., Kollet, O., and Lapidot, T. (2014). Reactive oxygen species regulate hematopoietic stem cell self-renewal, migration and development, as well as their bone marrow microenvironment. *Antioxid. Redox Signal.* *21*, 1605–1619.
- Ludwig, T.E., Bergendahl, V., Levenstein, M.E., Yu, J., Probasco, M.D., and Thomson, J.A. (2006). Feeder-independent culture of human embryonic stem cells. *Nat. Methods* *3*, 637–646.
- Lundstrom, K. (2007). Structural genomics and drug discovery. *J. Cell. Mol. Med.* *11*, 224–238.

M

- MacMicking, J., Xie, Q.W., and Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* *15*, 323–350.
- Maghzal, G.J., Krause, K.-H., Stocker, R., and Jaquet, V. (2012). Detection of reactive oxygen species derived from the family of NOX NADPH oxidases. *Free Radic. Biol. Med.* *53*, 1903–1918.
- Maherali, N., and Hochedlinger, K. (2008). Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* *3*, 595–605.
- Majeti, R., Park, C.Y., and Weissman, I.L. (2007). Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Cell Stem Cell* *1*, 635–645.
- Malech, H.L., Maples, P.B., Whiting-Theobald, N., Linton, G.F., Sekhsaria, S., Vowells, S.J., Li, F., Miller, J.A., DeCarlo, E., Holland, S.M., et al. (1997). Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 12133–12138.
- Malech, H.L., Choi, U., and Brenner, S. (2004). Progress toward effective gene therapy for chronic granulomatous disease. *Jpn. J. Infect. Dis.* *57*, S27–S28.
- Maly, F.E., Cross, A.R., Jones, O.T., Wolf-Vorbeck, G., Walker, C., Dahinden, C.A., and De Weck, A.L. (1988). The superoxide generating system of B cell lines. Structural homology with the phagocytic oxidase and triggering via surface Ig. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *140*, 2334–2339.

- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* *25*, 677–686.
- Marchetto, M.C.N., Carrromeu, C., Acab, A., Yu, D., Yeo, G.W., Mu, Y., Chen, G., Gage, F.H., and Muotri, A.R. (2010). A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* *143*, 527–539.
- Marciano, B.E., Rosenzweig, S.D., Kleiner, D.E., Anderson, V.L., Darnell, D.N., Anaya-O'Brien, S., Hilligoss, D.M., Malech, H.L., Gallin, J.I., and Holland, S.M. (2004). Gastrointestinal involvement in chronic granulomatous disease. *Pediatrics* *114*, 462–468.
- Marciano, B.E., Spalding, C., Fitzgerald, A., Mann, D., Brown, T., Osgood, S., Yockey, L., Darnell, D.N., Barnhart, L., Daub, J., et al. (2015). Common severe infections in chronic granulomatous disease. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *60*, 1176–1183.
- Marcoux, J., Man, P., Petit-Haertlein, I., Vivès, C., Forest, E., and Fieschi, F. (2010). p47phox molecular activation for assembly of the neutrophil NADPH oxidase complex. *J. Biol. Chem.* *285*, 28980–28990.
- Marques, B., Liguori, L., Paclet, M.-H., Villegas-Mendéz, A., Rothe, R., Morel, F., and Lenormand, J.-L. (2007). Liposome-mediated cellular delivery of active gp91(phox). *PLoS One* *2*, e856.
- Marsden, M.D., and Zack, J.A. (2015). Studies of retroviral infection in humanized mice. *Virology* *479-480*, 297–309.
- Martel, C., Mollin, M., Beaumel, S., Brion, J.P., Coutton, C., Satre, V., Vieville, G., Callanan, M., Lefebvre, C., Salmon, A., et al. (2012). Clinical, functional and genetic analysis of twenty-four patients with chronic granulomatous disease - identification of eight novel mutations in CYBB and NCF2 genes. *J. Clin. Immunol.* *32*, 942–958.
- Martí, M., Mulero, L., Pardo, C., Morera, C., Carrió, M., Laricchia-Robbio, L., Esteban, C.R., and Izpisua Belmonte, J.C. (2013). Characterization of pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* *8*, 223–253.
- Martinez, C.A., Shah, S., Shearer, W.T., Rosenblatt, H.M., Paul, M.E., Chinen, J., Leung, K.S., Kennedy-Nasser, A., Brenner, M.K., Heslop, H.E., et al. (2012). Excellent survival after sibling or unrelated donor stem cell transplantation for chronic granulomatous disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* *129*, 176–183.
- Matsunari, H., Nagashima, H., Watanabe, M., Umeyama, K., Nakano, K., Nagaya, M., Kobayashi, T., Yamaguchi, T., Sumazaki, R., Herzenberg, L.A., et al. (2013). Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 4557–4562.
- Matute, J.D., Arias, A.A., Dinauer, M.C., and Patiño, P.J. (2005). p40phox: the last NADPH oxidase subunit. *Blood Cells. Mol. Dis.* *35*, 291–302.
- Matute, J.D., Arias, A.A., Wright, N.A.M., Wrobel, I., Waterhouse, C.C.M., Li, X.J., Marchal, C.C., Stull, N.D., Lewis, D.B., Steele, M., et al. (2009). A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40 phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity. *Blood* *114*, 3309–3315.
- Mayadas, T.N., Cullere, X., and Lowell, C.A. (2014). The multifaceted functions of neutrophils. *Annu. Rev. Pathol.* *9*, 181–218.
- McCune, J.M., Namikawa, R., Kaneshima, H., Shultz, L.D., Lieberman, M., and Weissman, I.L. (1988). The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* *241*, 1632–1639.
- Merling, R.K., Sweeney, C.L., Choi, U., De Ravin, S.S., Myers, T.G., Otaizo-Carrasquero, F., Pan, J., Linton, G., Chen, L., Koontz, S., et al. (2013). Transgene-free iPSCs generated from small volume peripheral blood nonmobilized CD34+ cells. *Blood* *121*, e98–e107.

- Merling, R.K., Sweeney, C.L., Chu, J., Bodansky, A., Choi, U., Priel, D.L., Kuhns, D.B., Wang, H., Vasilevsky, S., De Ravin, S.S., et al. (2015). An AAVS1-targeted minigene platform for correction of iPSCs from all five types of chronic granulomatous disease. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *23*, 147–157.
- Migliaccio, V., Santos, F.R., Ciancaglini, P., and Ramalho-Pinto, F.J. (2008). Use of proteoliposome as a vaccine against *Trypanosoma cruzi* in mice. *Chem. Phys. Lipids* *152*, 86–94.
- Mikami, S., Kobayashi, T., and Imataka, H. (2010). Cell-free protein synthesis systems with extracts from cultured human cells. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *607*, 43–52.
- Mills, J.A., Wang, K., Paluru, P., Ying, L., Lu, L., Galvão, A.M., Xu, D., Yao, Y., Sullivan, S.K., Sullivan, L.M., et al. (2013). Clonal genetic and hematopoietic heterogeneity among human-induced pluripotent stem cell lines. *Blood* *122*, 2047–2051.
- Mochizuki, K., Kikuta, A., Ito, M., Akaihata, M., Sano, H., Ohto, H., and Hosoya, M. (2009). Successful unrelated cord blood transplantation for chronic granulomatous disease: a case report and review of the literature. *Pediatr. Transplant.* *13*, 384–389.
- Moles, E., Urbán, P., Jiménez-Díaz, M.B., Viera-Morilla, S., Angulo-Barturen, I., Busquets, M.A., and Fernández-Busquets, X. (2015). Immunoliposome-mediated drug delivery to *Plasmodium*-infected and non-infected red blood cells as a dual therapeutic/prophylactic antimalarial strategy. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *210*, 217–229.
- Monteiro, N., Martins, A., Reis, R.L., and Neves, N.M. (2014). Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *J. R. Soc. Interface R. Soc.* *11*, 20140459.
- Moore, K.J., Fabunmi, R.P., Andersson, L.P., Freeman, M.W. (1998). In vitro-differentiated embryonic stem cell macrophages: a model system for studying atherosclerosis-associated macrophage functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* *18*, 1647–54.
- Moreno, J.C., Bikker, H., Kempers, M.J.E., van Trotsenburg, A.S.P., Baas, F., de Vijlder, J.J.M., Vulsma, T., and Ris-Stalpers, C. (2002). Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N. Engl. J. Med.* *347*, 95–102.
- Moreno-Carranza, B., Gentsch, M., Stein, S., Schambach, A., Santilli, G., Rudolf, E., Ryser, M.F., Haria, S., Thrasher, A.J., Baum, C., et al. (2009). Transgene optimization significantly improves SIN vector titers, gp91phox expression and reconstitution of superoxide production in X-CGD cells. *Gene Ther.* *16*, 111–118.
- Morishima, T., Watanabe, K., Niwa, A., Fujino, H., Matsubara, H., Adachi, S., Suemori, H., Nakahata, T., and Heike, T. (2011). Neutrophil differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *J. Cell. Physiol.* *226*, 1283–1291.
- Mukherjee, S., Santilli, G., Blundell, M.P., Navarro, S., Bueren, J.A., and Thrasher, A.J. (2011). Generation of Functional Neutrophils from a Mouse Model of X-Linked Chronic Granulomatous Disorder Using Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS ONE* *6*, e17565.
- Mulens, V., de la Torre, A., Marinello, P., Rodríguez, R., Cardoso, J., Díaz, R., O’Farrill, M., Macias, A., Viada, C., Saurez, G., et al. (2010). Immunogenicity and safety of a NeuGcGM3 based cancer vaccine: Results from a controlled study in metastatic breast cancer patients. *Hum. Vaccin.* *6*.
- Münz, C. (2014). Viral infections in mice with reconstituted human immune system components. *Immunol. Lett.* *161*, 118–124.
- Murray, D.T., Griffin, J., and Cross, T.A. (2014). Detergent optimized membrane protein reconstitution in liposomes for solid state NMR. *Biochemistry (Mosc.)* *53*, 2454–2463.

N

- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., and Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* *26*, 101–106.
- Nakajima-Takagi, Y., Osawa, M., Oshima, M., Takagi, H., Miyagi, S., Endoh, M., Endo, T.A., Takayama, N., Eto, K., Toyoda, T., et al. (2013). Role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells. *Blood* *121*, 447–458.
- Nakamura, S., Takayama, N., Hirata, S., Seo, H., Endo, H., Ochi, K., Fujita, K., Koike, T., Harimoto, K., Dohda, T., et al. (2014). Expandable megakaryocyte cell lines enable clinically applicable generation of platelets from human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* *14*, 535–548.
- Nakano, T. (1996). In vitro development of hematopoietic system from mouse embryonic stem cells: a new approach for embryonic hematopoiesis. *Int. J. Hematol.* *65*, 1–8.
- Nakano, Y., Longo-Guess, C.M., Bergstrom, D.E., Nauseef, W.M., Jones, S.M., and Bánfi, B. (2008). Mutation of the *Cyba* gene encoding p22phox causes vestibular and immune defects in mice. *J. Clin. Invest.* *118*, 1176–1185.
- Nakatsuji, N., Nakajima, F., and Tokunaga, K. (2008). HLA-haplotype banking and iPS cells. *Nat. Biotechnol.* *26*, 739–740.
- Narayan, A.D., Chase, J.L., Lewis, R.L., Tian, X., Kaufman, D.S., Thomson, J.A., and Zanjani, E.D. (2006). Human embryonic stem cell-derived hematopoietic cells are capable of engrafting primary as well as secondary fetal sheep recipients. *Blood* *107*, 2180–2183.
- Naumann, N., De Ravin, S.S., Choi, U., Moayeri, M., Whiting-Theobald, N., Linton, G.F., Ikeda, Y., and Malech, H.L. (2007). Simian immunodeficiency virus lentivector corrects human X-linked chronic granulomatous disease in the NOD/SCID mouse xenograft. *Gene Ther.* *14*, 1513–1524.
- Neelapu, S.S., Gause, B.L., Harvey, L., Lee, S.-T., Frye, A.R., Horton, J., Robb, R.J., Popescu, M.C., and Kwak, L.W. (2007). A novel proteoliposomal vaccine induces antitumor immunity against follicular lymphoma. *Blood* *109*, 5160–5163.
- Ng, E.S., Davis, R.P., Azzola, L., Stanley, E.G., and Elefanty, A.G. (2005). Forced aggregation of defined numbers of human embryonic stem cells into embryoid bodies fosters robust, reproducible hematopoietic differentiation. *Blood* *106*, 1601–1603.
- Nirenberg, M.W., and Matthaei, J.H. (1961). The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *47*, 1588–1602.
- Nishishita, N., Takenaka, C., Fusaki, N., and Kawamata, S. (2011). Generation of human induced pluripotent stem cells from cord blood cells. *J. Stem Cells* *6*, 101–108.
- Nisimoto, Y., Freeman, J.L., Motalebi, S.A., Hirshberg, M., and Lambeth, J.D. (1997). Rac binding to p67(phox). Structural basis for interactions of the Rac1 effector region and insert region with components of the respiratory burst oxidase. *J. Biol. Chem.* *272*, 18834–18841.
- Niwa, A., Umeda, K., Chang, H., Saito, M., Okita, K., Takahashi, K., Nakagawa, M., Yamanaka, S., Nakahata, T., and Heike, T. (2009). Orderly hematopoietic development of induced pluripotent stem cells via Flk-1(+) hemoangiogenic progenitors. *J. Cell. Physiol.* *221*, 367–377.
- Niwa, A., Heike, T., Umeda, K., Oshima, K., Kato, I., Sakai, H., Suemori, H., Nakahata, T., and Saito, M.K. (2011). A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. *PLoS One* *6*, e22261.

Nolte-'t Hoen, E.N.M., van der Vlist, E.J., Aalberts, M., Mertens, H.C.H., Bosch, B.J., Bartelink, W., Mastrobattista, E., van Gaal, E.V.B., Stoorvogel, W., Arkesteijn, G.J.A., et al. (2012). Quantitative and qualitative flow cytometric analysis of nanosized cell-derived membrane vesicles. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* *8*, 712–720.

O

Ochs, H.D., and Igo, R.P. (1973). The NBT slide test: a simple screening method for detecting chronic granulomatous disease and female carriers. *J. Pediatr.* *83*, 77–82.

Odegaard, J.I., Vats, D., Zhang, L., Ricardo-Gonzalez, R., Smith, K.L., Sykes, D.B., Kamps, M.P., Chawla, A. (2007). Quantitative expansion of ES cell-derived myeloid progenitors capable of differentiating into macrophages. *J Leukoc Biol.* *81*, 711-9.

Ohashi, H., Kanamori, T., Shimizu, Y., and Ueda, T. (2010). A highly controllable reconstituted cell-free system—a breakthrough in protein synthesis research. *Curr. Pharm. Biotechnol.* *11*, 267–271.

Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* *448*, 313–317.

Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., Hong, H., Nakagawa, M., Tanabe, K., Tezuka, K., et al. (2011). A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat. Methods* *8*, 409–412.

Okita, K., Yamakawa, T., Matsumura, Y., Sato, Y., Amano, N., Watanabe, A., Goshima, N., and Yamanaka, S. (2013). An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* *31*, 458–466.

O'Neill, S., Brault, J., Stasia, M.-J., and Knaus, U.G. (2015a). Genetic disorders coupled to ROS deficiency. *Redox Biol.* *6*, 135–156.

Ott, M.G., Schwarzwaelder, K., Stein, S., Siler, U., Koehl, U., Glimm, H., Kühlcke, K., Schilz, A., Kunkel, H., Naundorf, S., et al. (2006). Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat. Med.* *12*, 401–409.

P

Paclet, M.H., Coleman, A.W., Vergnaud, S., and Morel, F. (2000). P67-phox-mediated NADPH oxidase assembly: imaging of cytochrome b558 liposomes by atomic force microscopy. *Biochemistry (Mosc.)* *39*, 9302–9310.

Paclet, M.H., Coleman, A.W., Burritt, J., and Morel, F. (2001a). NADPH oxidase of Epstein-Barr-virus immortalized B lymphocytes. Effect of cytochrome b(558) glycosylation. *Eur. J. Biochem. FEBS* *268*, 5197–5208.

Paclet, M.H., Coleman, A.W., Burritt, J., and Morel, F. (2001b). NADPH oxidase of Epstein-Barr-virus immortalized B lymphocytes. Effect of cytochrome b(558) glycosylation. *Eur. J. Biochem. FEBS* *268*, 5197–5208.

Palmberger, D., Wilson, I.B.H., Berger, I., Grabherr, R., and Rendic, D. (2012). SweetBac: a new approach for the production of mammalianised glycoproteins in insect cells. *PloS One* *7*, e34226.

Papp, B., and Plath, K. (2011). Reprogramming to pluripotency: stepwise resetting of the epigenetic landscape. *Cell Res.* *21*, 486–501.

Parikh, S.H., Szabolcs, P., Prasad, V.K., Lakshminarayanan, S., Martin, P.L., Driscoll, T.A., and Kurtzberg, J. (2007). Correction of chronic granulomatous disease after second unrelated-donor umbilical cord blood transplantation. *Pediatr. Blood Cancer* *49*, 982–984.

- Parkos, C.A., Allen, R.A., Cochrane, C.G., and Jesaitis, A.J. (1987). Purified cytochrome b from human granulocyte plasma membrane is comprised of two polypeptides with relative molecular weights of 91,000 and 22,000. *J. Clin. Invest.* *80*, 732–742.
- Parkos, C.A., Dinauer, M.C., Jesaitis, A.J., Orkin, S.H., and Curnutte, J.T. (1989). Absence of both the 91kD and 22kD subunits of human neutrophil cytochrome b in two genetic forms of chronic granulomatous disease. *Blood* *73*, 1416–1420.
- Pedruzzi, E., Fay, M., Elbim, C., Gaudry, M., and Gougerot-Pocidallo, M.-A. (2002). Differentiation of PLB-985 myeloid cells into mature neutrophils, shown by degranulation of terminally differentiated compartments in response to N-formyl peptide and priming of superoxide anion production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Br. J. Haematol.* *117*, 719–726.
- Peh, G.S.-L., Lang, R.J., Pera, M.F., and Hawes, S.M. (2009). CD133 expression by neural progenitors derived from human embryonic stem cells and its use for their prospective isolation. *Stem Cells Dev.* *18*, 269–282.
- Peled, A., Petit, I., Kollet, O., Magid, M., Ponomaryov, T., Byk, T., Nagler, A., Ben-Hur, H., Many, A., Shultz, L., et al. (1999). Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* *283*, 845–848.
- Peyrard, T., Bardiaux, L., Krause, C., Kobari, L., Lapillonne, H., Andreu, G., and Douay, L. (2011). Banking of pluripotent adult stem cells as an unlimited source for red blood cell production: potential applications for alloimmunized patients and rare blood challenges. *Transfus. Med. Rev.* *25*, 206–216.
- Phillips, B.W., and Crook, J.M. (2010). Pluripotent human stem cells: A novel tool in drug discovery. *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.* *24*, 99–108.
- Piccocchi, A., Debeurme, F., Beaumel, S., Dagher, M.-C., Grunwald, D., Jesaitis, A.J., and Stasia, M.-J. (2011). Role of putative second transmembrane region of Nox2 protein in the structural stability and electron transfer of the phagocytic NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* *286*, 28357–28369.
- Piccoli, C., D'Aprile, A., Ripoli, M., Scrima, R., Lecce, L., Boffoli, D., Tabilio, A., and Capitanio, N. (2007). Bone-marrow derived hematopoietic stem/progenitor cells express multiple isoforms of NADPH oxidase and produce constitutively reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *353*, 965–972.
- Pick, M., Azzola, L., Mossman, A., Stanley, E.G., and Elefanty, A.G. (2007). Differentiation of human embryonic stem cells in serum-free medium reveals distinct roles for bone morphogenetic protein 4, vascular endothelial growth factor, stem cell factor, and fibroblast growth factor 2 in hematopoiesis. *Stem Cells Dayt. Ohio* *25*, 2206–2214.
- Pillay, J., den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L.M., de Boer, R.J., Borghans, J.A.M., Tesselaar, K., and Koenderman, L. (2010). In vivo labeling with $^2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* *116*, 625–627.
- Pivot-Pajot, C., Chouinard, F.C., El Azreq, M.A., Harbour, D., and Bourgoin, S.G. (2010). Characterisation of degranulation and phagocytic capacity of a human neutrophilic cellular model, PLB-985 cells. *Immunobiology* *215*, 38–52.
- Pollock, J.D., Williams, D.A., Gifford, M.A., Li, L.L., Du, X., Fisherman, J., Orkin, S.H., Doerschuk, C.M., and Dinauer, M.C. (1995). Mouse model of X-linked chronic granulomatous disease, an inherited defect in phagocyte superoxide production. *Nat. Genet.* *9*, 202–209.
- Porter, C.D., Parkar, M.H., Verhoeven, A.J., Levinsky, R.J., Collins, M.K., and Kinnon, C. (1994). p22-phox-deficient chronic granulomatous disease: reconstitution by retrovirus-mediated expression and identification of a biosynthetic intermediate of gp91-phox. *Blood* *84*, 2767–2775.

Pripuzova, N.S., Getie-Kehtie, M., Grunseich, C., Sweeney, C., Malech, H., and Alterman, M.A. (2015). Development of a protein marker panel for characterization of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) using global quantitative proteome analysis. *Stem Cell Res.* *14*, 323–338.

Prochazka, M., Gaskins, H.R., Shultz, L.D., and Leiter, E.H. (1992). The nonobese diabetic scid mouse: model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 3290–3294.

Q

Qiu, C., Hanson, E., Olivier, E., Inada, M., Kaufman, D.S., Gupta, S., and Bouhassira, E.E. (2005). Differentiation of human embryonic stem cells into hematopoietic cells by coculture with human fetal liver cells recapitulates the globin switch that occurs early in development. *Exp. Hematol.* *33*, 1450–1458.

R

Ran, D., Shia, W.-J., Lo, M.-C., Fan, J.-B., Knorr, D.A., Ferrell, P.I., Ye, Z., Yan, M., Cheng, L., Kaufman, D.S., et al. (2013). RUNX1a enhances hematopoietic lineage commitment from human embryonic stem cells and inducible pluripotent stem cells. *Blood* *121*, 2882–2890.

Rappeport, J.M., Newburger, P.E., Goldblum, R.M., Goldman, A.S., Nathan, D.G., and Parkman, R. (1982). Allogeneic bone marrow transplantation for chronic granulomatous disease. *J. Pediatr.* *101*, 952–955.

Rathinam, C., Poueymirou, W.T., Rojas, J., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Rongvaux, A., Eynon, E.E., Manz, M.G., and Flavell, R.A. (2011). Efficient differentiation and function of human macrophages in humanized CSF-1 mice. *Blood* *118*, 3119–3128.

Raya, A., Rodríguez-Pizà, I., Guenechea, G., Vassena, R., Navarro, S., Barrero, M.J., Consiglio, A., Castellà, M., Río, P., Sleep, E., et al. (2009). Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* *460*, 53–59.

Reimer, A., Seiler, K., Tornack, J., Tsuneto, M., and Melchers, F. (2012). Reprogramming to iPS cells and their subsequent hematopoietic differentiation is more efficient from MEFs than from preB cells. *Immunol. Lett.* *143*, 70–76.

Rigaud, J.-L., and Lévy, D. (2003). Reconstitution of membrane proteins into liposomes. *Methods Enzymol.* *372*, 65–86.

Risueño, R.M., Sachlos, E., Lee, J.-H., Lee, J.B., Hong, S.-H., Szabo, E., and Bhatia, M. (2012). Inability of human induced pluripotent stem cell-hematopoietic derivatives to downregulate microRNAs in vivo reveals a block in xenograft hematopoietic regeneration. *Stem Cells Dayt. Ohio* *30*, 131–139.

Robinton, D.A., and Daley, G.Q. (2012). The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* *481*, 295–305.

Roesler, J., Brenner, S., Bukovsky, A.A., Whiting-Theobald, N., Dull, T., Kelly, M., Civin, C.I., and Malech, H.L. (2002). Third-generation, self-inactivating gp91(phox) lentivector corrects the oxidase defect in NOD/SCID mouse-repopulating peripheral blood-mobilized CD34+ cells from patients with X-linked chronic granulomatous disease. *Blood* *100*, 4381–4390.

Rongvaux, A., Willinger, T., Takizawa, H., Rathinam, C., Auerbach, W., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Eynon, E.E., Stevens, S., et al. (2011). Human thrombopoietin knockin mice efficiently support human hematopoiesis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 2378–2383.

Rongvaux, A., Willinger, T., Martinek, J., Strowig, T., Gearty, S.V., Teichmann, L.L., Saito, Y., Marches, F., Halene, S., Palucka, A.K., et al. (2014). Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model. *Nat. Biotechnol.* *32*, 364–372.

- Roos, D. (1994). The genetic basis of chronic granulomatous disease. *Immunol. Rev.* *138*, 121–157.
- Roos, D., and de Boer, M. (2014). Molecular diagnosis of chronic granulomatous disease. *Clin. Exp. Immunol.* *175*, 139–149.
- Roos, D., Kuhns, D.B., Maddalena, A., Roesler, J., Lopez, J.A., Ariga, T., Avcin, T., de Boer, M., Bustamante, J., Condino-Neto, A., et al. (2010a). Hematologically important mutations: X-linked chronic granulomatous disease (third update). *Blood Cells. Mol. Dis.* *45*, 246–265.
- Roos, D., Kuhns, D.B., Maddalena, A., Bustamante, J., Kannengiesser, C., de Boer, M., van Leeuwen, K., Köker, M.Y., Wolach, B., Roesler, J., et al. (2010b). Hematologically important mutations: the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease (second update). *Blood Cells. Mol. Dis.* *44*, 291–299.
- Rosh, J.R., Tang, H.B., Mayer, L., Groisman, G., Abraham, S.K., and Prince, A. (1995). Treatment of intractable gastrointestinal manifestations of chronic granulomatous disease with cyclosporine. *J. Pediatr.* *126*, 143–145.
- Rosu-Myles, M., Gallacher, L., Murdoch, B., Hess, D.A., Keeney, M., Kelvin, D., Dale, L., Ferguson, S.S., Wu, D., Fellows, F., et al. (2000). The human hematopoietic stem cell compartment is heterogeneous for CXCR4 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 14626–14631.
- Rotrosen, D., Yeung, C.L., and Katkin, J.P. (1993). Production of recombinant cytochrome b558 allows reconstitution of the phagocyte NADPH oxidase solely from recombinant proteins. *J. Biol. Chem.* *268*, 14256–14260.
- Rowntree, R.K., and McNeish, J.D. (2010). Induced pluripotent stem cells: opportunities as research and development tools in 21st century drug discovery. *Regen. Med.* *5*, 557–568.
- Royer-Pokora, B., Kunkel, L.M., Monaco, A.P., Goff, S.C., Newburger, P.E., Baehner, R.L., Cole, F.S., Curnutte, J.T., and Orkin, S.H. (1986). Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. *Nature* *322*, 32–38.
- Ruozi, B., Belletti, D., Tombesi, A., Tosi, G., Bondioli, L., Forni, F., and Vandelli, M.A. (2011). AFM, ESEM, TEM, and CLSM in liposomal characterization: a comparative study. *Int. J. Nanomedicine* *6*, 557–563.

S

- Sachse, R., Dondapati, S.K., Fenz, S.F., Schmidt, T., and Kubick, S. (2014). Membrane protein synthesis in cell-free systems: from bio-mimetic systems to bio-membranes. *FEBS Lett.* *588*, 2774–2781.
- Saeki, K., Saeki, K., Nakahara, M., Matsuyama, S., Nakamura, N., Yogiashi, Y., Yoneda, A., Koyanagi, M., Kondo, Y., Yuo, A. (2009). A feeder-free and efficient production of functional neutrophils from human embryonic stem cells. *Stem Cells.* *27*, 59–67.
- Saibil, H. (2013). Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 630–642.
- Salvagiotto, G., Burton, S., Daigh, C.A., Rajesh, D., Slukvin, I.I., and Seay, N.J. (2011). A defined, feeder-free, serum-free system to generate in vitro hematopoietic progenitors and differentiated blood cells from hESCs and hiPSCs. *PLoS One* *6*, e17829.
- Sancho-Martinez, I., and Izpisua Belmonte, J.C. (2013). Stem cells: Surf the waves of reprogramming. *Nature* *493*, 310–311.
- Sanders, C.R., and Myers, J.K. (2004). Disease-related misassembly of membrane proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* *33*, 25–51.
- Santilli, G., Almarza, E., Brendel, C., Choi, U., Beilin, C., Blundell, M.P., Haria, S., Parsley, K.L., Kinnon, C., Malech, H.L., et al. (2011). Biochemical correction of X-CGD by a novel chimeric promoter

- regulating high levels of transgene expression in myeloid cells. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *19*, 122–132.
- Santos, F.R., Ferraz, D.B., Daghashtanli, K.R.P., Ramalho-Pinto, F.J., and Ciancaglini, P. (2006). Mimetic membrane system to carry multiple antigenic proteins from *Leishmania amazonensis*. *J. Membr. Biol.* *210*, 173–181.
- Sardina, J.L., López-Ruano, G., Sánchez-Sánchez, B., Llanillo, M., and Hernández-Hernández, A. (2012). Reactive oxygen species: are they important for haematopoiesis? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *81*, 257–274.
- Sarfstein, R., Gorzalczyk, Y., Mizrahi, A., Berdichevsky, Y., Molshanski-Mor, S., Weinbaum, C., Hirshberg, M., Dagher, M.-C., and Pick, E. (2004). Dual role of Rac in the assembly of NADPH oxidase, tethering to the membrane and activation of p67phox: a study based on mutagenesis of p67phox-Rac1 chimeras. *J. Biol. Chem.* *279*, 16007–16016.
- Schäppi, M.G., Jaquet, V., Belli, D.C., and Krause, K.-H. (2008). Hyperinflammation in chronic granulomatous disease and anti-inflammatory role of the phagocyte NADPH oxidase. *Semin. Immunopathol.* *30*, 255–271.
- Scheer, N., Snaith, M., Wolf, C.R., and Seibler, J. (2013). Generation and utility of genetically humanized mouse models. *Drug Discov. Today* *18*, 1200–1211.
- Schlegel, S., Hjelm, A., Baumgarten, T., Vikström, D., and de Gier, J.-W. (2014). Bacterial-based membrane protein production. *Biochim. Biophys. Acta* *1843*, 1739–1749.
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* *4*, 7–25.
- Schuetz, C., Hoenig, M., Schulz, A., Lee-Kirsch, M.A., Roesler, J., Friedrich, W., and von Bernuth, H. (2007). Successful unrelated bone marrow transplantation in a child with chronic granulomatous disease complicated by pulmonary and cerebral granuloma formation. *Eur. J. Pediatr.* *166*, 785–788.
- Sebastiano, V., Maeder, M.L., Angstman, J.F., Haddad, B., Khayter, C., Yeo, D.T., Goodwin, M.J., Hawkins, J.S., Ramirez, C.L., Batista, L.F.Z., et al. (2011). In situ genetic correction of the sickle cell anemia mutation in human induced pluripotent stem cells using engineered zinc finger nucleases. *Stem Cells Dayt. Ohio* *29*, 1717–1726.
- Sechler, J.M., Malech, H.L., White, C.J., and Gallin, J.I. (1988). Recombinant human interferon-gamma reconstitutes defective phagocyte function in patients with chronic granulomatous disease of childhood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 4874–4878.
- Seddon, A.M., Curnow, P., and Booth, P.J. (2004). Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim. Biophys. Acta* *1666*, 105–117.
- Segal, A.W., West, I., Wientjes, F., Nugent, J.H., Chavan, A.J., Haley, B., Garcia, R.C., Rosen, H., and Scrace, G. (1992). Cytochrome b-245 is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH-binding site of the microbicidal oxidase of phagocytes. *Biochem. J.* *284 (Pt 3)*, 781–788.
- Segal, B.H., Leto, T.L., Gallin, J.I., Malech, H.L., and Holland, S.M. (2000). Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)* *79*, 170–200.
- Segal, B.H., Barnhart, L.A., Anderson, V.L., Walsh, T.J., Malech, H.L., and Holland, S.M. (2005). Posaconazole as salvage therapy in patients with chronic granulomatous disease and invasive filamentous fungal infection. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* *40*, 1684–1688.
- Seger, R.A. (2008). Modern management of chronic granulomatous disease. *Br. J. Haematol.* *140*, 255–266.

- Seger, R.A. (2010a). Advances in the diagnosis and treatment of chronic granulomatous disease. *Curr. Opin. Hematol.*
- Seger, R.A. (2010b). Chronic granulomatous disease: recent advances in pathophysiology and treatment. *Neth. J. Med.* 68, 334–340.
- Seger, R.A., Gungor, T., Belohradsky, B.H., Blanche, S., Bordigoni, P., Di Bartolomeo, P., Flood, T., Landais, P., Müller, S., Ozsahin, H., et al. (2002). Treatment of chronic granulomatous disease with myeloablative conditioning and an unmodified hemopoietic allograft: a survey of the European experience, 1985-2000. *Blood* 100, 4344–4350.
- Sekhsaria, S., Gallin, J.I., Linton, G.F., Mallory, R.M., Mulligan, R.C., and Malech, H.L. (1993). Peripheral blood progenitors as a target for genetic correction of p47phox-deficient chronic granulomatous disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 7446–7450.
- Sekhsaria, S., Fleisher, T.A., Vowells, S., Brown, M., Miller, J., Gordon, I., Blaese, R.M., Dunbar, C.E., Leitman, S., and Malech, H.L. (1996). Granulocyte colony-stimulating factor recruitment of CD34+ progenitors to peripheral blood: impaired mobilization in chronic granulomatous disease and adenosine deaminase--deficient severe combined immunodeficiency disease patients. *Blood* 88, 1104–1112.
- Senju, S., Haruta, M., Matsunaga, Y., Fukushima, S., Ikeda, T., Takahashi, K., Okita, K., Yamanaka, S., Nishimura, Y. (2009). Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells. *Stem Cells.* 27, 1021-31.
- Senju, S., Haruta, M., Matsumura, K., Matsunaga, Y., Fukushima, S., Ikeda, T., Takamatsu, K., Irie, A., and Nishimura, Y. (2011). Generation of dendritic cells and macrophages from human induced pluripotent stem cells aiming at cell therapy. *Gene Ther.* 18, 874–883.
- Severs, N.J. (2007). Freeze-fracture electron microscopy. *Nat. Protoc.* 2, 547–576.
- Sfaihi, L., Maaloul, I., Fourati, H., Stasia, M.J., Mnif, Z., and Hachicha, M. (2013). Resistant invasive aspergillosis in an autosomal recessive chronic granulomatous disease. *Fetal Pediatr. Pathol.* 32, 241–245.
- Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., and Ueda, T. (2001). Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat. Biotechnol.* 19, 751–755.
- Shirokov, V.A., Kommer, A., Kolb, V.A., and Spirin, A.S. (2007). Continuous-exchange protein-synthesizing systems. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 375, 19–55.
- Shultz, L.D., Schweitzer, P.A., Christianson, S.W., Gott, B., Schweitzer, I.B., Tennent, B., McKenna, S., Mobraaten, L., Rajan, T.V., and Greiner, D.L. (1995). Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 154, 180–191.
- Shultz, L.D., Banuelos, S., Lyons, B., Samuels, R., Burzenski, L., Gott, B., Lang, P., Leif, J., Appel, M., Rossini, A., et al. (2003). NOD/LtSz-Rag1nullPfpnull mice: a new model system with increased levels of human peripheral leukocyte and hematopoietic stem-cell engraftment. *Transplantation* 76, 1036–1042.
- Shultz, L.D., Lyons, B.L., Burzenski, L.M., Gott, B., Chen, X., Chaleff, S., Kotb, M., Gillies, S.D., King, M., Mangada, J., et al. (2005). Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 6477–6489.
- Sokol, H., Suarez, F., Meatchi, T., Malamut, G., Pocidalo, M.-A., Blanche, S., Cellier, C., and Hermine, O. (2009). Thalidomide as a treatment for refractory CGD colitis. *Am. J. Gastroenterol.* 104, 1069.

- Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G.W., Cook, E.G., Hargus, G., Blak, A., Cooper, O., Mitalipova, M., et al. (2009). Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 136, 964–977.
- Soncini, E., Slatter, M.A., Jones, L.B.K.R., Hughes, S., Hodges, S., Flood, T.J., Barge, D., Spickett, G.P., Jackson, G.H., Collin, M.P., et al. (2009). Unrelated donor and HLA-identical sibling haematopoietic stem cell transplantation cure chronic granulomatous disease with good long-term outcome and growth. *Br. J. Haematol.* 145, 73–83.
- Song, J., Willinger, T., Rongvaux, A., Eynon, E.E., Stevens, S., Manz, M.G., Flavell, R.A., and Galán, J.E. (2010). A mouse model for the human pathogen *Salmonella typhi*. *Cell Host Microbe* 8, 369–376.
- Spirin, A.S. (2004). High-throughput cell-free systems for synthesis of functionally active proteins. *Trends Biotechnol.* 22, 538–545.
- Spirin, A.S., Baranov, V.I., Ryabova, L.A., Ovodov, S.Y., and Alakhov, Y.B. (1988). A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science* 242, 1162–1164.
- Srivastava, A.S., Nedelcu, E., Esmaeli-Azad, B., Mishra, R., and Carrier, E. (2007). Thrombopoietin enhances generation of CD34+ cells from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 25, 1456–1461.
- Stadtfeld, M., and Hochedlinger, K. (2010). Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev.* 24, 2239–2263.
- Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D.T., and Hochedlinger, K. (2008). Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell* 2, 230–240.
- Stasia, M.J., and Li, X.J. (2008). Genetics and immunopathology of chronic granulomatous disease. *Semin. Immunopathol.* 30, 209–235.
- Stasia, M.J., Brion, J.-P., Boutonnat, J., and Morel, F. (2003). Severe clinical forms of cytochrome b-negative chronic granulomatous disease (X91-) in 3 brothers with a point mutation in the promoter region of CYBB. *J. Infect. Dis.* 188, 1593–1604.
- Stasia, M.J., Bordigoni, P., Floret, D., Brion, J.P., Bost-Bru, C., Michel, G., Gatel, P., Durant-Vital, D., Voelckel, M.A., Li, X.J., et al. (2005). Characterization of six novel mutations in the CYBB gene leading to different sub-types of X-linked chronic granulomatous disease. *Hum. Genet.* 116, 72–82.
- Stasia, M.J., Cathebras, P., Lutz, M.-F., and Durieu, I. (2009). La granulomatose septique chronique. *Rev. Médecine Interne* 30, 221–232.
- Stasia, M.J., Mollin, M., Martel, C., Satre, V., Coutton, C., Amblard, F., Vieville, G., van Montfrans, J.M., Boelens, J.J., Veenstra-Knol, H.E., et al. (2013). Functional and genetic characterization of two extremely rare cases of Williams-Beuren syndrome associated with chronic granulomatous disease. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG.*
- Stein, S., Siler, U., Ott, M.G., Seger, R., and Grez, M. (2006). Gene therapy for chronic granulomatous disease. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 8, 415–422.
- Stein, S., Ott, M.G., Schultze-Strasser, S., Jauch, A., Burwinkel, B., Kinner, A., Schmidt, M., Krämer, A., Schwäble, J., Glimm, H., et al. (2010). Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat. Med.* 16, 198–204.
- Stein, S., Scholz, S., Schwäble, J., Sadat, M.A., Modlich, U., Schultze-Strasser, S., Diaz, M., Chen-Wichmann, L., Müller-Kuller, U., Brendel, C., et al. (2013). From Bench to Bedside: Preclinical Evaluation of a Self-Inactivating Gammaretroviral Vector for the Gene Therapy of X-linked Chronic Granulomatous Disease. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* 24, 86–98.

- Storms, R.W., Trujillo, A.P., Springer, J.B., Shah, L., Colvin, O.M., Ludeman, S.M., and Smith, C. (1999). Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 9118–9123.
- Stroncek, D.F., Leonard, K., Eiber, G., Malech, H.L., Gallin, J.I., and Leitman, S.F. (1996). Alloimmunization after granulocyte transfusions. *Transfusion (Paris)* *36*, 1009–1015.
- Sturgeon, C.M., Ditadi, A., Awong, G., Kennedy, M., and Keller, G. (2014). Wnt signaling controls the specification of definitive and primitive hematopoiesis from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* *32*, 554–561.
- Subramanian, A., Guo, B., Marsden, M.D., Galic, Z., Kitchen, S., Kacena, A., Brown, H.J., Cheng, G., Zack, J.A. (2009). Macrophage differentiation from embryoid bodies derived from human embryonic stem cells. *J Stem Cells.* *4*, 29–45.
- Suda, T., Takubo, K., and Semenza, G.L. (2011). Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell* *9*, 298–310.
- Sun, N., and Zhao, H. (2013). Seamless correction of the sickle cell disease mutation of the HBB gene in human induced pluripotent stem cells using TALENs. *Biotechnol. Bioeng.*
- Sutherland, H.J., Lansdorp, P.M., Henkelman, D.H., Eaves, A.C., and Eaves, C.J. (1990). Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 3584–3588.
- Suzuki, N., Yamazaki, S., Yamaguchi, T., Okabe, M., Masaki, H., Takaki, S., Otsu, M., and Nakauchi, H. (2013). Generation of engraftable hematopoietic stem cells from induced pluripotent stem cells by way of teratoma formation. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *21*, 1424–1431.
- Swartz, J.R., Jewett, M.C., and Woodrow, K.A. (2004). Cell-free protein synthesis with prokaryotic combined transcription-translation. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *267*, 169–182.
- Szabolcs, P., Cavazzana-Calvo, M., Fischer, A., and Veys, P. (2010). Bone marrow transplantation for primary immunodeficiency diseases. *Pediatr. Clin. North Am.* *57*, 207–237.

T

- Taapken, S.M., Nisler, B.S., Newton, M.A., Sampsel-Barron, T.L., Leonhard, K.A., McIntire, E.M., and Montgomery, K.D. (2011). Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* *29*, 313–314.
- Takagi, S., Saito, Y., Hijikata, A., Tanaka, S., Watanabe, T., Hasegawa, T., Mochizuki, S., Kunisawa, J., Kiyono, H., Koseki, H., et al. (2012). Membrane-bound human SCF/KL promotes in vivo human hematopoietic engraftment and myeloid differentiation. *Blood* *119*, 2768–2777.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* *126*, 663–676.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* *131*, 861–872.
- Takai, K., and Endo, Y. (2010). The cell-free protein synthesis system from wheat germ. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *607*, 23–30.
- Takeda, H., Ogasawara, T., Ozawa, T., Muraguchi, A., Jih, P.-J., Morishita, R., Uchigashima, M., Watanabe, M., Fujimoto, T., Iwasaki, T., et al. (2015). Production of monoclonal antibodies against GPCR using cell-free synthesized GPCR antigen and biotinylated liposome-based interaction assay. *Sci. Rep.* *5*, 11333.

- Takenaka, K., Prasolava, T.K., Wang, J.C.Y., Mortin-Toth, S.M., Khalouei, S., Gan, O.I., Dick, J.E., and Danska, J.S. (2007). Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells. *Nat. Immunol.* **8**, 1313–1323.
- Tavian, M., and Péault, B. (2005). Embryonic development of the human hematopoietic system. *Int. J. Dev. Biol.* **49**, 243–250.
- Tavian, M., Robin, C., Coulombel, L., and Péault, B. (2001). The human embryo, but not its yolk sac, generates lympho-myeloid stem cells: mapping multipotent hematopoietic cell fate in intraembryonic mesoderm. *Immunity* **15**, 487–495.
- Taylor, W.R., Jones, D.T., and Segal, A.W. (1993). A structural model for the nucleotide binding domains of the flavocytochrome b-245 beta-chain. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **2**, 1675–1685.
- Tewari, P., Martin, P.L., Mendizabal, A., Parikh, S.H., Page, K.M., Driscoll, T.A., Malech, H.L., Kurtzberg, J., and Prasad, V.K. (2012). Myeloablative transplantation using either cord blood or bone marrow leads to immune recovery, high long-term donor chimerism and excellent survival in chronic granulomatous disease. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **18**, 1368–1377.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* **282**, 1145–1147.
- Thrasher, A., Chetty, M., Casimir, C., and Segal, A.W. (1992). Restoration of superoxide generation to a chronic granulomatous disease-derived B-cell line by retrovirus mediated gene transfer. *Blood* **80**, 1125–1129.
- Tian, X., Morris, J.K., Linehan, J.L., and Kaufman, D.S. (2004). Cytokine requirements differ for stroma and embryoid body-mediated hematopoiesis from human embryonic stem cells. *Exp. Hematol.* **32**, 1000–1009.
- Tian, X., Woll, P.S., Morris, J.K., Linehan, J.L., and Kaufman, D.S. (2006). Hematopoietic engraftment of human embryonic stem cell-derived cells is regulated by recipient innate immunity. *Stem Cells Dayt. Ohio* **24**, 1370–1380.
- Tila, D., Ghasemi, S., Yazdani-Arazi, S.N., and Ghanbarzadeh, S. (2015). Functional liposomes in the cancer-targeted drug delivery. *J. Biomater. Appl.* **30**, 3–16.
- Tirado, Y., Puig, A., Alvarez, N., Borrero, R., Aguilar, A., Camacho, F., Reyes, F., Fernández, S., Pérez, J.L., Espinoza, D.M., et al. (2015). Protective capacity of proteoliposomes from *Mycobacterium bovis* BCG in a mouse model of tuberculosis. *Hum. Vaccines Immunother.* **11**, 657–661.
- Traggiai, E., Chicha, L., Mazzucchelli, L., Bronz, L., Piffaretti, J.-C., Lanzavecchia, A., and Manz, M.G. (2004). Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* **304**, 104–107.
- Tucker, K.A., Lilly, M.B., Heck, L., Jr, and Rado, T.A. (1987). Characterization of a new human diploid myeloid leukemia cell line (PLB-985) with granulocytic and monocytic differentiating capacity. *Blood* **70**, 372–378.

U

- Ueda, T., Yoshino, H., Kobayashi, K., Kawahata, M., Ebihara, Y., Ito, M., Asano, S., Nakahata, T., and Tsuji, K. (2000). Hematopoietic repopulating ability of cord blood CD34(+) cells in NOD/Shi-scid mice. *Stem Cells Dayt. Ohio* **18**, 204–213.
- Ulvestad, M., Nordell, P., Asplund, A., Rehnström, M., Jacobsson, S., Holmgren, G., Davidson, L., Brolén, G., Edsbacke, J., Björquist, P., et al. (2013). Drug metabolizing enzyme and transporter

protein profiles of hepatocytes derived from human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Biochem. Pharmacol.* *86*, 691–702.

Umakoshi, H., Suga, K., Bui, H.T., Nishida, M., Shimanouchi, T., and Kuboi, R. (2009). Charged liposome affects the translation and folding steps of in vitro expression of green fluorescent protein. *J. Biosci. Bioeng.* *108*, 450–454.

Unger, C., Gao, S., Cohen, M., Jaconi, M., Bergstrom, R., Holm, F., Galan, A., Sanchez, E., Irion, O., Dubuisson, J.B., et al. (2009). Immortalized human skin fibroblast feeder cells support growth and maintenance of both human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *24*, 2567–2581.

V

Vanhee, S., and Vandekerckhove, B. (2015). Pluripotent stem cell based gene therapy for hematological diseases. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*

Vemuri, S., and Rhodes, C.T. (1995). Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharm. Acta Helv.* *70*, 95–111.

Verstegen, M.M., van Hennik, P.B., Terpstra, W., van den Bos, C., Wielenga, J.J., van Rooijen, N., Ploemacher, R.E., Wagemaker, G., and Wognum, A.W. (1998). Transplantation of human umbilical cord blood cells in macrophage-depleted SCID mice: evidence for accessory cell involvement in expansion of immature CD34+CD38- cells. *Blood* *91*, 1966–1976.

Vignais, P.V. (2002). The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *59*, 1428–1459.

Violi, F., Sanguigni, V., Carnevale, R., Plebani, A., Rossi, P., Finocchi, A., Pignata, C., De Mattia, D., Martire, B., Pietrogrande, M.C., et al. (2009). Hereditary deficiency of gp91(phox) is associated with enhanced arterial dilatation: results of a multicenter study. *Circulation* *120*, 1616–1622.

Vodyanik, M.A., Bork, J.A., Thomson, J.A., and Slukvin, I.I. (2005). Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood* *105*, 617–626.

Vodyanik, M.A., Thomson, J.A., and Slukvin, I.I. (2006). Leukosialin (CD43) defines hematopoietic progenitors in human embryonic stem cell differentiation cultures. *Blood* *108*, 2095–2105.

Volkman, D.J., Buescher, E.S., Gallin, J.I., and Fauci, A.S. (1984). B cell lines as models for inherited phagocytic diseases: abnormal superoxide generation in chronic granulomatous disease and giant granules in Chediak-Higashi syndrome. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *133*, 3006–3009.

Volpp, B.D., Nauseef, W.M., and Clark, R.A. (1988). Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease. *Science* *242*, 1295–1297.

Volpp, B.D., Nauseef, W.M., Donelson, J.E., Moser, D.R., and Clark, R.A. (1989). Cloning of the cDNA and functional expression of the 47-kilodalton cytosolic component of human neutrophil respiratory burst oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 7195–7199.

Vowells, S.J., Sekhsaria, S., Malech, H.L., Shalit, M., and Fleisher, T.A. (1995). Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *J. Immunol. Methods* *178*, 89–97.

W

Wada, T., Muraoka, M., Toma, T., Imai, T., Shigemura, T., Agematsu, K., Haraguchi, K., Moriuchi, H., Oh-Ishi, T., Kitoh, T., et al. (2013). Rapid detection of intracellular p47phox and p67phox by flow cytometry; useful screening tests for chronic granulomatous disease. *J. Clin. Immunol.* *33*, 857–864.

- Wallach, T.M., and Segal, A.W. (1997). Analysis of glycosylation sites on gp91phox, the flavocytochrome of the NADPH oxidase, by site-directed mutagenesis and translation in vitro. *Biochem. J.* *321* (Pt 3), 583–585.
- Walsh, T.J., Lutsar, I., Driscoll, T., Dupont, B., Roden, M., Ghahramani, P., Hodges, M., Groll, A.H., and Perfect, J.R. (2002). Voriconazole in the treatment of aspergillosis, scedosporiosis and other invasive fungal infections in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* *21*, 240–248.
- Wang, Y., and Nakayama, N. (2009). WNT and BMP signaling are both required for hematopoietic cell development from human ES cells. *Stem Cell Res.* *3*, 113–125.
- Wang, J., Zhao, H.-P., Lin, G., Xie, C.-Q., Nie, D.-S., Wang, Q.-R., and Lu, G.-X. (2005a). In vitro hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells induced by co-culture with human bone marrow stromal cells and low dose cytokines. *Cell Biol. Int.* *29*, 654–661.
- Wang, L., Menendez, P., Shojaei, F., Li, L., Mazurier, F., Dick, J.E., Cerdan, C., Levac, K., and Bhatia, M. (2005b). Generation of hematopoietic repopulating cells from human embryonic stem cells independent of ectopic HOXB4 expression. *J. Exp. Med.* *201*, 1603–1614.
- Wang, L., Menendez, P., Cerdan, C., and Bhatia, M. (2005c). Hematopoietic development from human embryonic stem cell lines. *Exp. Hematol.* *33*, 987–996.
- Wang, X., Ishida, T., and Kiwada, H. (2007). Anti-PEG IgM elicited by injection of liposomes is involved in the enhanced blood clearance of a subsequent dose of PEGylated liposomes. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *119*, 236–244.
- Wang, Y., Zheng, C.-G., Jiang, Y., Zhang, J., Chen, J., Yao, C., Zhao, Q., Liu, S., Chen, K., Du, J., et al. (2012). Genetic correction of β -thalassemia patient-specific iPS cells and its use in improving hemoglobin production in irradiated SCID mice. *Cell Res.* *22*, 637–648.
- Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., et al. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* *7*, 618–630.
- Washburn, M.L., Bility, M.T., Zhang, L., Kovalev, G.I., Buntzman, A., Frelinger, J.A., Barry, W., Ploss, A., Rice, C.M., and Su, L. (2011). A humanized mouse model to study hepatitis C virus infection, immune response, and liver disease. *Gastroenterology* *140*, 1334–1344.
- Weil, W.M., Linton, G.F., Whiting-Theobald, N., Vowells, S.J., Rafferty, S.P., Li, F., and Malech, H.L. (1997). Genetic correction of p67phox deficient chronic granulomatous disease using peripheral blood progenitor cells as a target for retrovirus mediated gene transfer. *Blood* *89*, 1754–1761.
- Weisel, K.C., Gao, Y., Shieh, J.-H., and Moore, M.A.S. (2006). Stromal cell lines from the aorta-gonadomesonephros region are potent supporters of murine and human hematopoiesis. *Exp. Hematol.* *34*, 1505–1516.
- Wientjes, F.B., Hsuan, J.J., Totty, N.F., and Segal, A.W. (1993). p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *Biochem. J.* *296* (Pt 3), 557–561.
- Wijayalath, W., Majji, S., Villasante, E.F., Brumeanu, T.D., Richie, T.L., and Casares, S. (2014). Humanized HLA-DR4.RagKO.IL2R γ KO.NOD (DRAG) mice sustain the complex vertebrate life cycle of *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar. J.* *13*, 386.
- Wildt, S., and Gerngross, T.U. (2005). The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. *Nat. Rev. Microbiol.* *3*, 119–128.
- Wilgenburg, B. van, Browne, C., Vowles, J., and Cowley, S.A. (2013). Efficient, Long Term Production of Monocyte-Derived Macrophages from Human Pluripotent Stem Cells under Partly-Defined and Fully-Defined Conditions. *PLoS ONE* *8*, e71098.

- Williams, D.A., Tao, W., Yang, F., Kim, C., Gu, Y., Mansfield, P., Levine, J.E., Petryniak, B., Darrow, C.W., Harris, C., et al. (2000). Dominant negative mutation of the hematopoietic-specific Rho GTPase, Rac2, is associated with a human phagocyte immunodeficiency. *Blood* 96, 1646–1654.
- Willinger, T., Rongvaux, A., Takizawa, H., Yancopoulos, G.D., Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Auerbach, W., Eynon, E.E., Stevens, S., Manz, M.G., et al. (2011). Human IL-3/GM-CSF knock-in mice support human alveolar macrophage development and human immune responses in the lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 2390–2395.
- Winkelstein, J.A., Marino, M.C., Johnston, R.B., Jr, Boyle, J., Curnutte, J., Gallin, J.I., Malech, H.L., Holland, S.M., Ochs, H., Quie, P., et al. (2000). Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *Medicine (Baltimore)* 79, 155–169.
- Wognum, A.W., Eaves, A.C., and Thomas, T.E. (2003). Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch. Med. Res.* 34, 461–475.
- Wolach, B., Scharf, Y., Gavrieli, R., de Boer, M., and Roos, D. (2005). Unusual late presentation of X-linked chronic granulomatous disease in an adult female with a somatic mosaic for a novel mutation in CYBB. *Blood* 105, 61–66.
- Woll, P.S., Morris, J.K., Painschab, M.S., Marcus, R.K., Kohn, A.D., Biechele, T.L., Moon, R.T., and Kaufman, D.S. (2008). Wnt signaling promotes hematoendothelial cell development from human embryonic stem cells. *Blood* 111, 122–131.
- Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämäläinen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., et al. (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458, 766–770.
- Woodle, null (1998). Controlling liposome blood clearance by surface-grafted polymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32, 139–152.
- Woodman, R.C., Erickson, R.W., Rae, J., Jaffe, H.S., and Curnutte, J.T. (1992). Prolonged recombinant interferon-gamma therapy in chronic granulomatous disease: evidence against enhanced neutrophil oxidase activity. *Blood* 79, 1558–1562.
- Woods, N.-B., Parker, A.S., Moraghebi, R., Lutz, M.K., Firth, A.L., Brennand, K.J., Berggren, W.T., Raya, A., Izpisua Belmonte, J.C., Gage, F.H., et al. (2011). Brief report: efficient generation of hematopoietic precursors and progenitors from human pluripotent stem cell lines. *Stem Cells Dayt. Ohio* 29, 1158–1164.

X

- Xu, Y., Liu, L., Zhang, L., Fu, S., Hu, Y., Wang, Y., Fu, H., Wu, K., Xiao, H., Liu, S., et al. (2012). Efficient commitment to functional CD34+ progenitor cells from human bone marrow mesenchymal stem-cell-derived induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 7, e34321.

Y

- Yamauchi, A., Yu, L., Pötgens, A.J., Kuribayashi, F., Nuno, H., Kanegasaki, S., Roos, D., Malech, H.L., Dinauer, M.C., and Nakamura, M. (2001). Location of the epitope for 7D5, a monoclonal antibody raised against human flavocytochrome b558, to the extracellular peptide portion of primate gp91phox. *Microbiol. Immunol.* 45, 249–257.
- Yanagimachi, M.D., Niwa, A., Tanaka, T., Honda-Ozaki, F., Nishimoto, S., Murata, Y., Yasumi, T., Ito, J., Tomida, S., Oshima, K., et al. (2013). Robust and highly-efficient differentiation of functional monocytic cells from human pluripotent stem cells under serum- and feeder cell-free conditions. *PLoS One* 8, e59243.

- Yin, J., Li, G., Ren, X., and Herrler, G. (2007). Select what you need: a comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J. Biotechnol.* *127*, 335–347.
- Yokoyama, Y., Suzuki, T., Sakata-Yanagimoto, M., Kumano, K., Higashi, K., Takato, T., Kurokawa, M., Ogawa, S., and Chiba, S. (2009). Derivation of functional mature neutrophils from human embryonic stem cells. *Blood* *113*, 6584–6592.
- Yoshida, H., Hayashi, S., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H., Sudo, T., Shultz, L.D., and Nishikawa, S. (1990). The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* *345*, 442–444.
- Yoshino, H., Ueda, T., Kawahata, M., Kobayashi, K., Ebihara, Y., Manabe, A., Tanaka, R., Ito, M., Asano, S., Nakahata, T., et al. (2000). Natural killer cell depletion by anti-asialo GM1 antiserum treatment enhances human hematopoietic stem cell engraftment in NOD/Shi-scid mice. *Bone Marrow Transplant.* *26*, 1211–1216.
- Yoshioka, N., Gros, E., Li, H.-R., Kumar, S., Deacon, D.C., Maron, C., Muotri, A.R., Chi, N.C., Fu, X.-D., Yu, B.D., et al. (2013). Efficient Generation of Human iPSCs by a Synthetic Self-Replicative RNA. *Cell Stem Cell* *13*, 246–254.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* *318*, 1917–1920.
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I.I., and Thomson, J.A. (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* *324*, 797–801.

Z

- Zambidis, E.T., Peault, B., Park, T.S., Bunz, F., and Civin, C.I. (2005). Hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells progresses through sequential hematoendothelial, primitive, and definitive stages resembling human yolk sac development. *Blood* *106*, 860–870.
- Zanditenas, D., Hagège, H., Rosa, I., Cattan, P., Ratel-Saby, S., Lons, T., and Chousterman, M. (2004). [Inflammatory colitis and chronic granulomatous disease, a steroid-dependent case report]. *Gastroentérologie Clin. Biol.* *28*, 398–401.
- Zanjani, E.D., Almeida-Porada, G., Livingston, A.G., Flake, A.W., and Ogawa, M. (1998). Human bone marrow CD34⁻ cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34⁺ cells. *Exp. Hematol.* *26*, 353–360.
- Zelazny, A.M., Ding, L., Elloumi, H.Z., Brinster, L.R., Benedetti, F., Czapiga, M., Ulrich, R.L., Ballentine, S.J., Goldberg, J.B., Sampaio, E.P., et al. (2009). Virulence and cellular interactions of *Burkholderia multivorans* in chronic granulomatous disease. *Infect. Immun.* *77*, 4337–4344.
- Zhan, S., Vazquez, N., Zhan, S., Wientjes, F.B., Budarf, M.L., Schrock, E., Ried, T., Green, E.D., and Chanock, S.J. (1996). Genomic structure, chromosomal localization, start of transcription, and tissue expression of the human p40-phox, a new component of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase complex. *Blood* *88*, 2714–2721.
- Zhang, H., Ma, Y., Gu, J., Liao, B., Li, J., Wong, J., and Jin, Y. (2012). Reprogramming of somatic cells via TAT-mediated protein transduction of recombinant factors. *Biomaterials* *33*, 5047–5055.
- Zhang, P., Li, J., Tan, Z., Wang, C., Liu, T., Chen, L., Yong, J., Jiang, W., Sun, X., Du, L., et al. (2008). Short-term BMP-4 treatment initiates mesoderm induction in human embryonic stem cells. *Blood* *111*, 1933–1941.

- Zhao, Y., Yin, X., Qin, H., Zhu, F., Liu, H., Yang, W., Zhang, Q., Xiang, C., Hou, P., Song, Z., et al. (2008). Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell Stem Cell* 3, 475–479.
- Zhen, L., King, A.A., Xiao, Y., Chanock, S.J., Orkin, S.H., and Dinauer, M.C. (1993). Gene targeting of X chromosome-linked chronic granulomatous disease locus in a human myeloid leukemia cell line and rescue by expression of recombinant gp91phox. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 9832–9836.
- Zhou, W., and Freed, C.R. (2009). Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 27, 2667–2674.
- Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., et al. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4, 381–384.
- Zhou, Q., Facciponte, J., Jin, M., Shen, Q., and Lin, Q. (2014). Humanized NOD-SCID IL2rg^{-/-} mice as a preclinical model for cancer research and its potential use for individualized cancer therapies. *Cancer Lett.* 344, 13–19.
- Ziegler, B.L., Valtieri, M., Porada, G.A., De Maria, R., Müller, R., Masella, B., Gabbianelli, M., Casella, I., Pelosi, E., Bock, T., et al. (1999). KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science* 285, 1553–1558.
- Zou, J., Maeder, M.L., Mali, P., Pruett-Miller, S.M., Thibodeau-Beganny, S., Chou, B.-K., Chen, G., Ye, Z., Park, I.-H., Daley, G.Q., et al. (2009). Gene targeting of a disease-related gene in human induced pluripotent stem and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 5, 97–110.
- Zou, J., Mali, P., Huang, X., Dowey, S.N., and Cheng, L. (2011a). Site-specific gene correction of a point mutation in human iPS cells derived from an adult patient with sickle cell disease. *Blood* 118, 4599–4608.
- Zou, J., Sweeney, C.L., Chou, B.-K., Choi, U., Pan, J., Wang, H., Dowey, S.N., Cheng, L., and Malech, H.L. (2011b). Oxidase-deficient neutrophils from X-linked chronic granulomatous disease iPS cells: functional correction by zinc finger nuclease-mediated safe harbor targeting. *Blood* 117, 5561–5572.
- (2015). Gene Therapy for X-Linked Chronic Granulomatous Disease (Net4CGD). *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* 26, 88–90.

LISTE DES COMMUNICATIONS

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

♦ *Publications internationales :*

- Roy JJ, **Brault J**, Joram J, Metrop J, Hildeggen P. Study of microbiological safety of 25 oncology drugs after multiple uses in aseptic conditions. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*. 2011, 15(5):428-434
- **Brault J**, Goutagny E, Shao K, Gupta MK, Grunwald D, Brion JP, Plantaz D, Krause KH, Šarić T, Stasia MJ. Optimization of X-linked Chronic Granulomatous Disease Modelization by Using Patient-specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Experimental Hematology*. August 2013, 41(8) Suppl. 1 page S28.
- Franko B, **Brault J**, Jouve T, Beaumel S, Benhamou PY, Zaoui P, Stasia MJ. Differential impact of glucose levels and advanced glycation end-products on tubular cell viability and pro-inflammatory/profibrotic functions. *Biochem Biophys Res Commun*. September 2014, 451(4):627-31.
- **Brault J**, Goutagny E, Telugu N, Shao K, Baquié M, Satre V, Coutton C, Grunwald D, Brion JP, Barlogis V, Stephan JL, Plantaz D, Hescheler J, Krause KH, Šarić T, Stasia MJ. Optimized Generation of Functional Neutrophils and Macrophages from Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells: Ex Vivo Models of X⁰-Linked, AR22⁰- and AR47⁰- Chronic Granulomatous Diseases. *BioResearch Open Access*. December 2014, 3(6): 311-326.
- O'Neill S, **Brault J**, Stasia MJ, Knaus UG. Genetic disorders coupled to ROS deficiency. *Redox Biol*. Juillet 2015, 6:135-156.
- **Brault J**, Vaganay G, Cortes S, Baquié M, Krause KH, Šarić T, Stasia MJ. Successful proteoliposome-based therapy for Chronic Granulomatous Disease using human macrophages differentiated from patient-specific induced pluripotent stem cells. (Article en preparation)

♦ *Publication de vulgarisation :*

- Participation à la rédaction du livre « Généralités sur les biotechnologies en santé humaine » : chapitre 3 « De la transgénése au clonage » et chapitre 5 « La cellule en biotechnologies », éditions LAVOISIER (in press).

♦ *Communications orales :**Nationales*

- **Brault J**, Goutagny E, Beaumel S, Krause KH, Šarić T, Stasia MJ. Modélisation cellulaire de la granulomatose septique chronique liée à l'X grâce à l'utilisation de cellules souches pluripotentes induites. 8ème Club oxydase: Les NADPH oxydases NOX et DUOX: du fondamental à la physiopathologie. 30-31 Mai 2013, Paris, France.
- Brion JP et **Brault J**. Les cellules pluripotentes induites (iPS) comme modèle d'étude physiopathologique des maladies rares – Applications au développement de nouvelles thérapeutiques de la granulomatose septique chronique. Colloque Médical du Jeudi, 6 Novembre 2014. CHU de Grenoble, France.
- **Brault J**, Goutagny E, Telugu NS, Shao K, Baquie M, Satre V, Grunwald D, Brion JP, Barlogis V, Plantaz D, Krause KH, Šarić T, Stasia MJ. Optimized generation of neutrophils and macrophages from iPSC to model Chronic Granulomatous Disease. Workshop "Programmed stem cells: from basic to clinical science" (Aviesan). ITMO Immunologie, hématologie, pneumologie. 24-25 Novembre 2014. Paris, France.
- **Brault J**, Vaganay G, Cortes S, Baquié M, Krause KH, Šarić T, Stasia MJ. Successful proteoliposome-based therapy for Chronic Granulomatous Disease using human macrophages differentiated from patient-specific induced pluripotent stem cells. 9ème Club oxydase, 21-22 Mai 2015. Genève, Suisse.

Internationales

- **Brault J**, Goutagny E, Telugu NS, Shao K, Baquie M, Satre V, Grunwald D, Brion JP, Barlogis V, Plantaz D, Krause KH, Šarić T, Stasia MJ. Optimized generation of functional neutrophils and macrophages from patient specific induced pluripotent stem cells – Ex vivo models of X-linked, AR22 and AR47- Chronic Granulomatous Diseases. Gordon Research Conference - NOX Family NADPH Oxidases. 18-23 May 2014, Renaissance Tuscany Il Ciocco Resort in Lucca (Barga), Italy.

♦ *Communications affichées :**Nationales*

- **Brault J**, Plantaz D, Brion JP, Grunwald D, Šarić T, Krause KH, Stasia MJ (2012). Induced pluripotent stem cells (iPSCs): a new physiopathological model of the chronic granulomatous disease (CGD). Journée de la Recherche Médicale, 4 Mai 2012, Grenoble, France.

- **Brault J**, Goutagny, Šarić T, Krause KH, Stasia MJ. Optimization of X-linked chronic granulomatous disease by using patient-specific induced pluripotent stem cells. Symposium “Epigenetic mechanisms and genetic diseases”, Collège de France. 21-22 Mai 2013. Paris, France.

- **Brault J**, Goutagny, Šarić T, Krause KH, Stasia MJ. Modélisation cellulaire de la granulomatose septique chronique liée à l’X grâce à l’utilisation de cellules souches pluripotentes induites. Journée de la Recherche médicale. 7 Juin 2013. Grenoble, France.

- **Brault J**, Goutagny E, Telugu N, Shao K, Baquié M, Satre V, Coutton C, Grunwald D, Brion JP, Barlogis V, Stephan JL, Plantaz D, Hescheler J, Krause KH, Šarić T, Stasia MJ. Optimized Generation of Functional Neutrophils and Macrophages from Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells: Ex Vivo Models of X⁰-Linked, AR22⁰- and AR47⁰- Chronic Granulomatous Diseases. Journée de la Recherche médicale. 13 Juin 2014. Grenoble, France.

- **Brault J**, Vaganay G, Cortes S, Baquié M, Krause KH, Šarić T, Stasia MJ. Successful proteoliposome-based therapy for Chronic Granulomatous Disease using human macrophages differentiated from patient-specific induced pluripotent stem cells. Journée de la Recherche médicale. 5 Juin 2015. Grenoble, France.

Internationales

- **Brault J**, Goutagny E, Grunwald D, Shao K, Gupta MK, Šarić T, Brion JP, Plantaz D, Krause KH, Stasia MJ. Comparison of three methods for neutrophil generation from human induced pluripotent stem cells. 3rd Annual “Induced Pluripotent Stem Cells: Production and Utility in Regenerative Medicine”. 2 October 2012, Stevenage, United Kingdom.

- **Brault J**, Goutagny E, Shao K, Gupta MK, Grunwald D, Brion JP, Plantaz D, Krause KH, Šarić T, Stasia MJ. Optimization of X-linked Chronic Granulomatous Disease Modelization by Using Patient-specific Induced Pluripotent Stem Cells, ISEH - Society for Hematology and Stem Cells, 42nd Annual Scientific Meeting, 22-25 August 2013, Vienna, Austria.

- **Brault J**, Goutagny E, Telugu NS, Shao K, Baquie M, Satre V, Grunwald D, Brion JP, Barlogis V, Plantaz D, Krause KH, Šarić T, Stasia MJ. Optimized generation of functional neutrophils and macrophages from patient specific induced pluripotent stem cells – Ex vivo models of X-linked, AR22 and AR47- Chronic Granulomatous Diseases. Gordon Research Conference - NOX Family NADPH Oxidases. 18-23 May 2014, Renaissance Tuscany Il Ciocco Resort in Lucca (Barga), Italy.

- **Brault J**, Vaganay G, Cortes S, Baquié M, Krause KH, Šarić T, Stasia MJ. Successful proteoliposome-based therapy for Chronic Granulomatous Disease using human macrophages differentiated from patient-specific induced pluripotent stem cells. International Society for Stem Cell Research 2015 Annual Meeting. 24-27 Juin 2015. Stockholm, Suède.

Chronic Granulomatous Disease (CGD) is a rare inherited pathology of the innate immune system that affects the phagocytic cells (neutrophils, macrophages). This disease is caused by mutations in the subunits of the NADPH oxidase complex composed of the membrane cytochrome b_{558} (NOX2 associated with $p22^{phox}$) and the cytosolic components ($p47^{phox}$, $p67^{phox}$ et $p40^{phox}$). Dysfunction in this enzymatic complex leads to the absence of microbicidal reactive oxygen species (ROS) and therefore to the development of recurrent and life-threatening infections in early childhood. Life-long prophylaxis is used to protect these patients but it may be responsible for side effects. Bone marrow transplantation is the only curative treatment but it can not be proposed to all the patients. In addition, gene therapy is not possible up to now. So there is a real lack of new therapies for this disease. However, to develop new therapeutic approaches, relevant physiopathological models must be available. Actually, existing models are imperfect or missing. **Thus, the goal of our work is to produce cellular and animal models of CGD to develop a new proteoliposome-based therapy.**

Induced pluripotent stem cells (iPSCs) are a powerful tool for physiopathologic modeling due to their pluripotency and self-renewal properties. Using CGD patient-specific iPSCs reprogrammed from fibroblasts, we developed an efficient protocol for *in vitro* hematopoietic differentiation into neutrophils and macrophages. We showed that the phagocytic cells produced are mature and reproduce the ROS-deficient phenotype found in CGD patients. Thus, we obtained relevant cellular models for three genetic forms of CGD: X-linked CGD and the two autosomal recessive forms AR22CGD and AR47CGD.

Then, we demonstrated the proof-of-concept of the efficacy of therapeutic proteoliposomes on X-CGD iPS-derived macrophages. Indeed, X-CGD is the main form of the disease (70% of cases) and is caused by the absence of the membrane cytochrome b_{558} (NOX2/ $p22^{phox}$). Thanks to a collaboration with the start-up Synthelis SAS, liposomes integrating the cytochrome b_{558} into lipid bilayers were produced in an *E. coli*-based cell-free protein expression system. These NOX2/ $p22^{phox}$ liposomes were able to reconstitute a functional NADPH oxidase enzyme *in vitro* and to deliver the cytochrome b_{558} at the plasma membrane of X-CGD macrophages, leading to restore the NADPH oxidase activity with a ROS production.

Finally, we proposed to generate « humanized » mice models with a human immune system after transplantation of CD34⁺ hematopoietic stem cells able to engraft and reconstitute long-term hematopoiesis in immunodeficient mice. Using healthy iPSCs, we successfully produced CD34⁺ hematopoietic cells with *in vitro* hematopoietic potential. However, no *in vivo* engraftment was really confirmed yet.

In conclusion, during this project, we produced cellular models of three genetic forms of CGD using patient-specific iPSCs. Then, X-CGD macrophages were used to demonstrate *in vitro* the efficacy of a new therapy. This « liposomal replacement enzymotherapy » could, in the future, represents a curative alternative against life-threatening lung infections refractory to conventional antibiotic and antifungal therapy.

Keywords: Chronic Granulomatous Disease – induced pluripotent stem cells – physiopathologic modelisation – proteoliposomes – « humanized » mouse

La Granulomatose Septique Chronique (CGD) est une maladie génétique rare de l'immunodéficience innée affectant les cellules phagocytaires (neutrophiles, macrophages). Elle est causée par des mutations dans les sous-unités du complexe NADPH oxydase formé du cytochrome b_{558} membranaire (NOX2 associé à $p22^{phox}$) et de facteurs cytosoliques ($p47^{phox}$, $p67^{phox}$ et $p40^{phox}$). La déficience de ce complexe enzymatique va conduire à l'absence de formation de formes réactives de l'oxygène (FRO) microbicides et donc à l'apparition d'infections graves et récurrentes très tôt dans l'enfance. La chimioprophylaxie à vie permet de protéger ces patients mais peut être responsable d'effets indésirables. La seule thérapie curative est la transplantation de moelle osseuse mais tous les patients ne peuvent en bénéficier, et la thérapie génique n'est pas encore envisageable. Il y a donc un manque réel de nouvelles thérapies pour cette maladie. Cependant pour développer de nouveaux traitements, il faut disposer de modèles physiopathologiques pertinents. Or, les modèles existants sont imparfaits ou manquants. **Le but de notre travail est donc de produire des modèles cellulaires et animaux de la CGD pour développer dans un second temps, une nouvelle approche thérapeutique basée sur l'utilisation de protéoliposomes.**

Grâce à leurs propriétés de pluripotence et d'auto-renouvellement à l'infini, les cellules souches pluripotentes induites (iPS) sont un outil puissant pour la modélisation physiopathologique. Ainsi, à partir de fibroblastes de patients atteints de CGD reprogrammés en cellules iPS, nous avons mis au point un protocole efficace de différenciation hématopoïétique *in vitro* en neutrophiles et macrophages. Nous avons montré que ces cellules phagocytaires sont matures et reproduisent parfaitement le phénotype déficient en FRO des patients CGD. Nous avons donc obtenu des modèles cellulaires pertinent modélisant trois formes génétiques de CGD, la CGD liée à l'X et deux formes autosomiques récessives, CGDAR22 et CGDAR47.

Nous avons ensuite réalisé la preuve du concept de l'efficacité de protéoliposomes thérapeutiques sur les macrophages modélisés de la forme CGDX, la forme génétique la plus fréquente (70 % des cas) due à l'absence du cytochrome b_{558} membranaire (NOX2/ $p22^{phox}$). Grâce à une collaboration avec la start-up Synthelis SAS, des liposomes contenant le cytochrome b_{558} au niveau de la membrane lipidique ont été produits dans un système d'expression acellulaire basé sur l'utilisation d'extraits d'*Escherichia coli*. Ces liposomes NOX2/ $p22^{phox}$ sont capables de reconstituer une enzyme NADPH oxydase fonctionnelle *in vitro* et de délivrer le cytochrome b_{558} à la membrane des macrophages CGDX qui présentent alors une restauration de l'activité NADPH oxydase avec la production de FRO.

Enfin, notre objectif secondaire était de générer des souris dites « humanisées » par transplantation de cellules souches hématopoïétiques $CD34^+$ capables de prise de greffe et de reconstitution hématopoïétique dans des souris immunodéficientes. A partir de cellules iPS saines, nous avons réussi à produire des cellules hématopoïétiques $CD34^+$ possédant un potentiel hématopoïétique *in vitro*. Cependant, malgré des résultats encourageants, aucune prise de greffe *in vivo* n'a pu être réellement confirmée à ce jour.

Pour conclure, nous avons donc montré au cours de ce projet, la production de modèles cellulaires de trois formes génétiques de CGD à partir de cellules iPS. Puis le modèle de macrophages CGDX nous a permis de faire la preuve de l'efficacité d'une nouvelle thérapie *in vitro*, une « enzymothérapie substitutive liposomale », qui pourrait à terme, offrir une alternative thérapeutique pour le traitement des infections aiguës pulmonaires des patients CGD réfractaires aux traitements antibiotiques et antifongiques conventionnels.

Mots clés : Granulomatose Septique Chronique – cellules souches pluripotentes induites – modélisation physiopathologique – protéoliposomes – souris humanisées