

**PACES - 2011/2012**

***Faculté de Médecine  
Lyon-Est***

**U.E. 2**

**Epreuve de**

**BIOLOGIE CELLULAIRE  
(Prof. Bernard Rousset)**

**Jeudi 15 Décembre 2011**

**Durée : 1 heure**

**RECOMMANDATIONS**

Vous vérifiez que a) votre nom figure sur la grille de réponses et  
b) votre livret contient les questions numérotées  
de 1 à 12 et comporte 13 Figures.

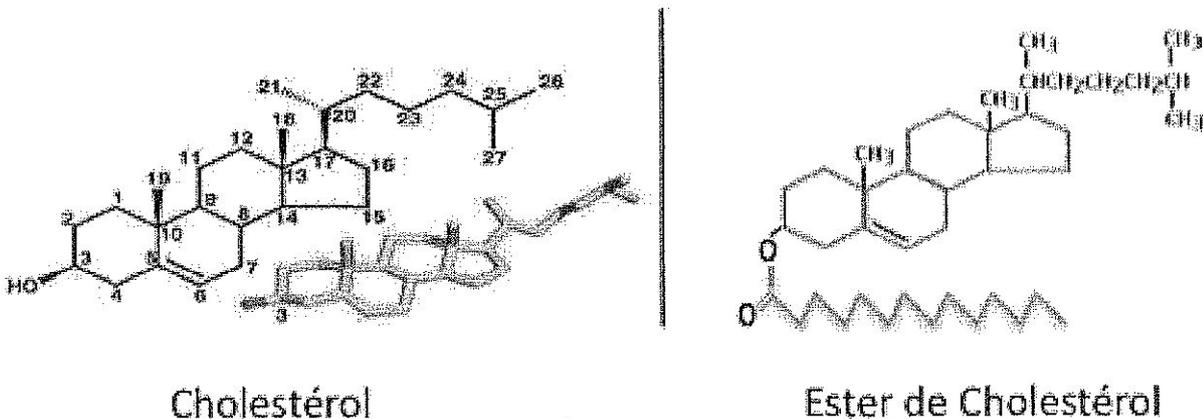
**RAPPELS**

- 1- Vous répondez aux questions en cochant de 0 à 5 cases sur la grille de réponse.
- 2- L'usage de machine à calculer ou autre instrument électronique est formellement interdit.



La maladie de Niemann-Pick type C (NPC) est une maladie de surcharge lysosomale caractérisée par l'accumulation de cholestérol dans les compartiments lysosomaux dans l'ensemble de l'organisme et spécialement dans les hépatocytes et les neurones du système nerveux central ; ceci conduit à la dégénérescence de ces organes et au décès prématuré à un âge compris entre 10 et 20 ans.

L'accumulation lysosomale du cholestérol est aisément démontrable avec des cultures de fibroblastes de patient présentant la maladie NPC. Dans ces cellules, le cholestérol entre par endocytose de lipoprotéines par l'intermédiaire de récepteurs. Les esters de cholestérol sont normalement hydrolysés, mais le cholestérol libre ne peut pas sortir des lysosomes. Ce déficit se traduit par une absence de transfert du cholestérol vers le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique et par voie de conséquence par une absence d'inhibition de la voie de biosynthèse endogène du cholestérol ; les cellules continuent à produire du cholestérol et à en importer en dépit de l'accumulation massive dans les lysosomes.



Des études extensives associant des équipes de différents pays (parmi lesquelles une équipe Lyonnaise) ont abouti, en 1997, à l'identification d'un gène défectueux chez les patients NPC ; ce gène a été appelé *NPC1*. Les mutations identifiées chez les patients *NPC1* sont réparties sur l'ensemble de la partie codante du gène.

Vous arrivez dans un service de l'*Hôpital Femme - Mère - Enfant de Lyon*, on vous charge de conduire le développement des outils nécessaires pour diagnostiquer la maladie NPC et mener ensuite des analyses phénotypiques de patient porteur ou potentiellement porteur de NPC.

Avant d'envisager des approches expérimentales, vous faites le point sur les connaissances dans ce domaine et de façon plus large sur tout ce qui concerne le cholestérol et son métabolisme. Vous testez d'abord votre savoir sur les mécanismes mis en jeu dans l'approvisionnement des cellules en cholestérol.

**QUESTION 1 :** Avec laquelle ou lesquelles des propositions suivantes, êtes-vous d'accord ?

- A - La source du cholestérol internalisé est le cholestérol contenu dans les lipoprotéines de haute densité.**
- B - L'internalisation du cholestérol met en jeu la formation de vésicules recouvertes de protéines COP.**
- C - Le cholestérol importé par les cellules est principalement sous forme estérifiée avec un acide gras.**
- D - Les récepteurs mis en jeu dans l'endocytose des lipoprotéines contenant du cholestérol sont recyclés vers la membrane plasmique.**
- E - Les lipoprotéines contenant du cholestérol et d'autres lipides sont constituées de chaînes polypeptidiques présentant des domaines structurés en hélice  $\alpha$  amphipatique.**

*Vous consultez des banques de données pour extraire les informations concernant le gène NPC1.*

Vous apprenez que ce gène via un transcrit de près de 4700 nucléotides code pour une chaîne polypeptidique dont la séquence est rapportée sur la **Figure 1**. La protéine mature est une protéine membranaire lysosomale dont l'extrémité C-terminale est cytoplasmique ; les acides aminés correspondant aux domaines transmembranaires sont indiqués en gras et apparaissent sur un fond gris. La protéine NPC1 possède un grand domaine de liaison des stérols dans sa partie N-terminale. Vous analysez ces données de structure et vous déduisez la topologie membranaire de NPC1.

**QUESTION 2 :** Parmi les propositions suivantes, identifiez celle(s) qui est (sont) fausse(s) ?

- A - La protéine mature est composée de 1256 acides aminés.**
- B - Le transcrit présente un cadre ouvert de lecture de 3768 nucléotides.**
- C - NPC1 possède 11 domaines transmembranaires.**
- D - La taille de chacune des boucles localisées du côté de la face exoplasmique de la membrane est supérieure à celle des boucles cytoplasmiques.**
- E - NPC1 doit être une glycoprotéine.**

Les notions acquises vous permettent d'envisager maintenant le développement de modèles cellulaires pour des analyses des déficits fonctionnels des patients NPC. Les travaux

réalisés par d'autres équipes indiquent que les fibroblastes constituent un système expérimental de tout premier ordre pour les études des maladies de surcharge lysosomale.

### **EXPERIENCE 1**

Après rédaction d'un programme de travail que vous avez fait valider par un comité d'éthique, vous mettez en place les procédures pour la culture de fibroblastes à partir de biopsies cutanées.

Dés fibroblastes provenant d'un sujet normal (N) et de 4 patients (P1, P2, P3 et P4) avec NPC sont cultivés dans un milieu complet dans des boîtes de Pétri jusqu'à environ 80% de la confluence. Les cellules sont soumises aux étapes nécessaires : 1) pour réaliser des doubles immunomarquages avec des anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine NPC1 et un anticorps monoclonal dirigé contre une protéine membranaire lysosomale, Lamp-1, 2) pour visualiser le cholestérol par incubation avec la filipine (composé qui devient fluorescent en présence de cholestérol libre) et 3) pour analyser le contenu cellulaire en NPC1 par western blot avec les anticorps polyclonaux anti-NPC1.

Les résultats sont rapportés sur la **Figure 2** et sur la **Figure 3**. (A) : Immunodétection de NPC1; (B) : Immunodétection de Lamp-1 ; (C) Détection du cholestérol libre.

**QUESTION 3** : Vous analysez les données des **Figures 2** et **3**, vous déduisez que :

- A - Dans les cellules normales, NPC1 et Lamp-1 devraient avoir une distribution cellulaire distincte.**
- B - Les fibroblastes du patient P1 ne contiennent pas de protéine NPC1.**
- C - Dans les fibroblastes du patient P1, les lysosomes sont plus gros ou en plus grand nombre.**
- D - Les fibroblastes normaux accumulent plus de cholestérol que les fibroblastes de patient porteur de NPC.**
- E - Chez les patients porteurs de NPC, les altérations du gène NPC1 sont probablement très diverses.**

*Vous vous demandez s'il est possible de corriger le déficit des fibroblastes du patient P1 par des approches de type « thérapie génique ».*

### **EXPERIENCE 2**

Vous vous procurez un vecteur plasmidique contenant l'ADNc codant la GFP et un vecteur contenant l'ADNc codant NPC1. Vous transfectez des fibroblastes du patient P1 avec le vecteur GFP seul ou avec le vecteur GFP et le vecteur NPC1. Après 48 h de culture, les

fibroblastes sont fixés au para-formaldéhyde et incubés avec la filipine. Les images obtenues en microscopie à fluorescence sont rapportées sur la **Figure 4**. Les flèches identifient les cellules transfectées.

**QUESTION 4 :** Vous analysez les résultats de la **Figure 4** ; ils vous indiquent que :

**A - Tous les fibroblastes expriment la GFP.**

**B - Dans les cellules doublement transfectées, on visualise l'expression de NPC1 grâce à la GFP.**

**C - L'utilisation de la GFP permet d'identifier les cellules susceptibles d'exprimer NPC1.**

**D - Les fibroblastes qui expriment la GFP contiennent plus de cholestérol que les cellules non-transfectées.**

**E - On peut réduire et normaliser l'accumulation de cholestérol dans les fibroblastes du patient P1 par néo-expression de NPC1.**

*En utilisant le modèle que vous venez de valider, vous voulez compléter des travaux récemment publiés qui montrent que NPC1 dépourvue de sa partie C- terminale cytoplasmique reste localisée dans l'appareil de Golgi suggérant que ce segment peptidique pourrait contenir un signal d'adressage de NPC1 aux lysosomes.*

### **EXPERIENCE 3**

A partir de l'ADNc NPC1 que vous possédez et en vous appuyant sur le savoir faire de certains collègues, vous générez une série d'ADNc variants qui codent pour les formes raccourcies de NPC1 rapportées sur la **Figure 5** (de NPC1-AA à NPC1-TM).

Des fibroblastes du patient P1 sont transfectés avec le vecteur vide (Témoin), le vecteur NPC1-wt ou l'un des vecteurs contenant un mutant expérimental (de NPC1-AA à NPC1-TM). Après 48 h, les cellules sont soumises aux traitements adaptés pour 1) l'immunodétection de NPC1 (entière ou raccourcie) avec des anticorps polyclonaux anti-NPC1 et 2) la visualisation du contenu lysosomal en cholestérol avec la filipine, afin de déterminer si le déficit est corrigé (+) ou non (-) par la néo-expression de telle ou telle forme de NPC1 (voir **Figure 5**).

Les images obtenues pour 3 des 8 conditions testées sont présentées sur la **Figure 6**.

**(A):** Témoin ; **(B) :** NPC1-wt ; **(C) :** NPC1-TM. Les flèches identifient les cellules transfectées.

**QUESTION 5 :** Vous analysez les données de cette expérience en examinant les

**Figures 5 et 6**, vous en déduisez que :

- A- Les images d'immuno-marquage NPC1 présentées ne permettent pas de préciser la localisation subcellulaire de la protéine recombinante.**
- B- Le marquage des fibroblastes avec la filipine permet de déterminer si NPC1 a été convoyée dans les lysosomes.**
- C- En remplaçant le motif di-Leucine par deux A en antépénultième position sur NPC1, on ne permet pas à cette forme de protéine de réduire la charge cellulaire en cholestérol.**
- D- Le segment C-terminal (27a.a.) de NPC1 est constitué de plus de 50% d'acides aminés chargés.**
- E- Le motif ERE est requis pour un adressage correct de NPC1 aux lysosomes.**

Vous avez réalisé l'expérience 2 avec des fibroblastes provenant des 4 patients porteurs de la maladie NPC ; vous avez eu la surprise de constater que la néo-expression de NPC1 ne corrigeait pas l'anomalie de stockage de cholestérol dans les fibroblastes du patient P3.

Après une longue réflexion, vous formulez l'hypothèse selon laquelle un autre gène pourrait être mis en cause dans la maladie NPC. Vous êtes confortés dans cette démarche par de récentes données cliniques suggérant une liaison entre certaines formes de NPC et des altérations génétiques dans un autre locus que celui du gène NPC1. Recherchant les gènes candidats dans ce locus, vous découvrez un gène, le gène *HE1* codant une protéine qui est sécrétée dans le liquide épидидymal et qui a la capacité de lier le cholestérol.

*Vous voulez tester votre hypothèse. Dans un premier temps, vous cherchez à savoir si HE1 est une protéine lysosomale des fibroblastes. Dans un deuxième temps, vous comparez le contenu en HE1 des fibroblastes de différents patients porteurs de NPC.*

#### **EXPERIENCE 4**

Vous faites du sous-fractionnement cellulaire à partir de fibroblastes de sujet normal en culture. Vous utilisez les approches classiques pour lyser les cellules (homogénéiseur de Potter) et préparer les différentes sous-fractions : Endosomes tardifs (ET), Lysosomes (L), Noyaux (N), Mitochondries (Mt), Microsomes (Mi) et Cytosol (S) par centrifugation différentielle et centrifugation zonale. Vous faites le choix de mesurer l'activité  $\beta$ -galactosidase pour identifier et caractériser les compartiments lysosomaux. Les résultats sont rapportés sur la **Figure 7**.

**QUESTION 6 :** Vous examinez les résultats de la **Figure 7** avec l'un de vos collaborateurs, il fait plusieurs remarques, avec laquelle ou avec lesquelles êtes vous d'accord ?

- A - L'activité spécifique de la  $\beta$ -galactosidase est environ 10 fois plus élevée dans les lysosomes que dans les microsomes.**
- B - La lyse des fibroblastes a été vraisemblablement trop drastique.**
- C - L'anhydrase carbonique aurait pu être utilisée comme marqueur pour identifier la fraction microsomale.**
- D - La fraction mitochondriale est certainement contaminée par d'autres sous-fractions cellulaires.**
- E - Lysosomes et endosomes ont un marqueur commun, le Récepteur Man-6P.**

### **EXPERIENCE 5**

Vous recherchez la protéine HE1 dans les lysosomes purifiés à partir de fibroblastes d'un sujet normal (A et C) et du patient P3 (B et D) par électrophorèse bidimensionnelle (**Figure 8**). En A et B, les protéines séparées sont colorées au bleu de Coomassie ; en C et D, après électrotransfert des protéines sur membrane de nylon, la protéine HE1 est révélée à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-HE1 et un second anticorps couplé à la phosphate acide dont on révèle l'activité.

Au vu du résultat de la **Figure 8**, vous décidez de réaliser la même recherche sur des lysosomes provenant de 11 nouveaux patients porteurs de NPC. Le contenu des lysosomes en HE1 et Cathepsine D est analysé par western blot conventionnel en utilisant l'anticorps monoclonal anti-HE1, des anticorps polyclonaux anti-cathD. et les anticorps secondaires appropriés. Les résultats sont rapportés sur la **Figure 9**.

**QUESTION 7 :** Vous analysez les résultats de l'expérience 5; ils montrent que :

- A - Les fibroblastes contiennent des protéines de masse moléculaire voisine qui possèdent un épitope commun avec HE1.**
- B - La principale différence visible dans la composition protéique des lysosomes de sujet sain et du patient P3 porte sur des chaînes polypeptidiques de 17 à 22 kDa de différents pHi.**
- C - Parmi les patients avec NPC, 20 à 30% d'entre eux semblent avoir un déficit partiel ou complet en protéine de type HE1.**
- D - Le gène *HE1* ou un gène apparenté s'exprime dans les fibroblastes.**
- E - La Cathepsine D est présente en quantité variable dans les lysosomes.**

Votre superviseur veut que ces données soient confirmées par des approches complémentaires ; il demande à un autre membre de l'équipe de tenter de purifier une petite quantité de protéine HE1 lysosomale afin d'obtenir des données de structure primaire par microséquençage de fragments peptidiques issus de coupure protéolytique par la trypsine.

Deux mois passent et vos résultats sont confirmés ; la protéine HE1 épидидymale déjà bien connue, qui est constituée de 132 acides aminés, et la protéine HE1 lysosomale sont identiques. Vous interrogez des banques de données, vous tirez les informations de la **Figure 10** : organisation du gène *HE1*, séquence de l'ADNc, structure primaire de la protéine HE1. Vous décidez de nommer la protéine HE1, absente ou anormale chez des patients avec NPC, la protéine NPC2. Le deuxième gène altéré dans la maladie NPC sera donc le gène *NPC2*.

**QUESTION 8** : Vous examinez les caractéristiques du gène *NPC2* et du transcrit et de la protéine NPC2. Parmi les propositions suivantes, identifiez celle qui est ou celles qui sont fondée(s) ?

- A- Le gène *NPC2* s'étend sur plus de 10kb.**
- B- NPC2 possède trois sites potentiels de N-glycosylation.**
- C- Tous les résidus Cys sont impliqués dans la formation de ponts di-sulfures.**
- D- La région 3' non-traduite du transcrit NPC2 est plus de 10 fois plus étendue que la région 5' non-traduite.**
- E- L'acide aminé N- terminal de la protéine NPC2 mature est une proline.**

*Vous êtes maintenant très soucieux de savoir si la présence de NPC2 dans les fibroblastes du patient P3 peut corriger le phénotype pathologique de ces cellules.*

En consultant les travaux réalisés sur HE1, vous apprenez qu'il existe des cellules de la lignée CHO transfectées avec l'ADNc HE1 (placé sous le contrôle d'un promoteur très fort), qui produisent (sécrètent) des quantités importantes de protéine HE1 (NPC2) dans le milieu de culture. En conséquence, vous décidez d'employer une autre approche que la « thérapie génique » pour tenter de corriger le déficit fonctionnel des fibroblastes du patient P3.

### **EXPERIENCE 6**

Des fibroblastes du patient P3 sont cultivés en présence du milieu de culture habituel non supplémenté (Condition A =Témoin) ou supplémenté par : 1% de milieu de culture de cellules CHO produisant HE1 (Condition B), 1% de milieu de culture de cellules CHO sauvages (Condition C) ou 1% de milieu de culture de cellules CHO produisant HE1 + 1mM Mannose-6P

(Condition D). Après 48 h de culture, les fibroblastes sont fixés au para-formaldéhyde et incubés avec la filipine. Les images obtenues en microscopie à fluorescence et les mesures de l'intensité de fluorescence sont rapportées sur la **Figure 11**.

**QUESTION 9 :** Vous tirez des conclusions de l'expérience 6. Identifiez parmi les affirmations suivantes, celle qui est ou celles qui sont juste(s) ?

- A - Dans la condition expérimentale B, le déficit des fibroblastes du patient P3 est presque totalement corrigé.**
- B - La protéine HE1 produite par les cellules CHO doit rentrer dans les fibroblastes par endocytose par l'intermédiaire de récepteurs.**
- C - L'apport de HE1 exogène augmente l'accumulation pathologique du cholestérol chez le patient P3.**
- D - La protéine HE1 sécrétée par les cellules CHO porte le signal Man-6P.**
- E - Cette expérience pourrait être à la base de la mise au point d'un traitement de certains patients porteurs de NPC.**

Des mutations du gène *NPC2* viennent d'être décrites ; deux d'entre elles sont présentées dans la **Figure 10** au niveau nucléotidique et au niveau acide aminé (voir schéma). Dans le cas n°1, la mutation 58G→T (Glu20Stop) était présente à l'état homozygote ; dans le cas n°2, le patient présentait deux altérations : la mutation ci-dessus et la délétion 331delA (N111Frameshift) entraînant un changement du cadre de lecture.

**QUESTION 10 :** Vous faites une analyse globale de vos données, vous déduisez que :

- A - NPC1 et NPC2 semblent avoir des fonctions semblables fondées sur des tailles et des structures assez similaires.**
- B - Les altérations génétiques (à l'état homozygote ou hétérozygote composite) des gènes *NPC1* ou *NPC2* produisent des anomalies biochimiques et phénotypiques différentes.**
- C - La mutation 58G→T du gène *NPC2* est singulière car elle ne permet pas la coupure du peptide signal.**
- D - Les deux protéines NPC1 et NPC2 sont requises pour que le cholestérol, qui dérive de l'endocytose de lipoprotéines, sorte des lysosomes.**
- E - L'absence de l'une ou l'autre de ces protéines interrompt le processus cité ci-dessus.**

On vient de découvrir des molécules de structure complexe, les  $\beta$ -cyclodextrines (CD) qui ont la capacité de lier le cholestérol. Ces molécules pouvant pénétrer dans les cellules par endocytose en phase fluide, vous voulez tester leur capacité à corriger le phénotype d'accumulation de cholestérol des fibroblastes de patients NPC.

### **EXPERIENCE 7**

Des fibroblastes provenant du patient P1 (déficients en NPC1) ou du patient P3 (déficients en NPC2) sont cultivés dans le milieu de culture habituel seul ou en présence de concentrations croissantes de 0,3 à 300  $\mu$ M de M- $\beta$ -cyclodextrine (M-CD) ou HP- $\beta$ -cyclodextrine (HP-CD). Après 48 h de culture, les fibroblastes sont fixés au para-formaldéhyde et incubés avec la filipine. Les mesures d'intensité de fluorescence de la filipine sont rapportées sur la **Figure 12**.

**QUESTION 11** : Vous analysez les résultats de la **Figure 12** ; ils vous indiquent que :

- A - Les CD induisent une réduction concentration-dépendante de l'accumulation lysosomale de cholestérol par les fibroblastes de patients avec NPC.**
- B - La concentration de M-CD qui inhibe de 50% l'accumulation de cholestérol dans les fibroblastes du patient 1 est comprise entre 1 et 3  $\mu$ M.**
- C - Les fibroblastes déficients en NPC2 répondent à des concentrations de CD plus faibles que les fibroblastes déficients en NPC1.**
- D - Les CD pourraient agir en interagissant avec NPC1 ou NPC2.**
- E - Quelque soit l'origine des fibroblastes, la M-CD est plus efficace que la HP-CD pour corriger le phénotype NPC.**

*Vous êtes très satisfaits de vos travaux mais vous ne pouvez pas interrompre ici cette étude de la maladie de Niemann-Pick type C sans avoir répondu à la **question 12** !*

**QUESTION 12** : Vous interprétez les éléments schématisés sur la **Figure 13**, vous reconnaissez que :

- A - 1 pourrait correspondre à NPC2.**
- B - 2 pourrait être la Cathepsine D.**
- C - 3 pourrait correspondre à NPC1.**
- D - 4 est une vésicule recouverte.**
- E - 5 pourrait identifier le réticulum endoplasmique.**

# Le code génétique

## Acides aminés et Codons

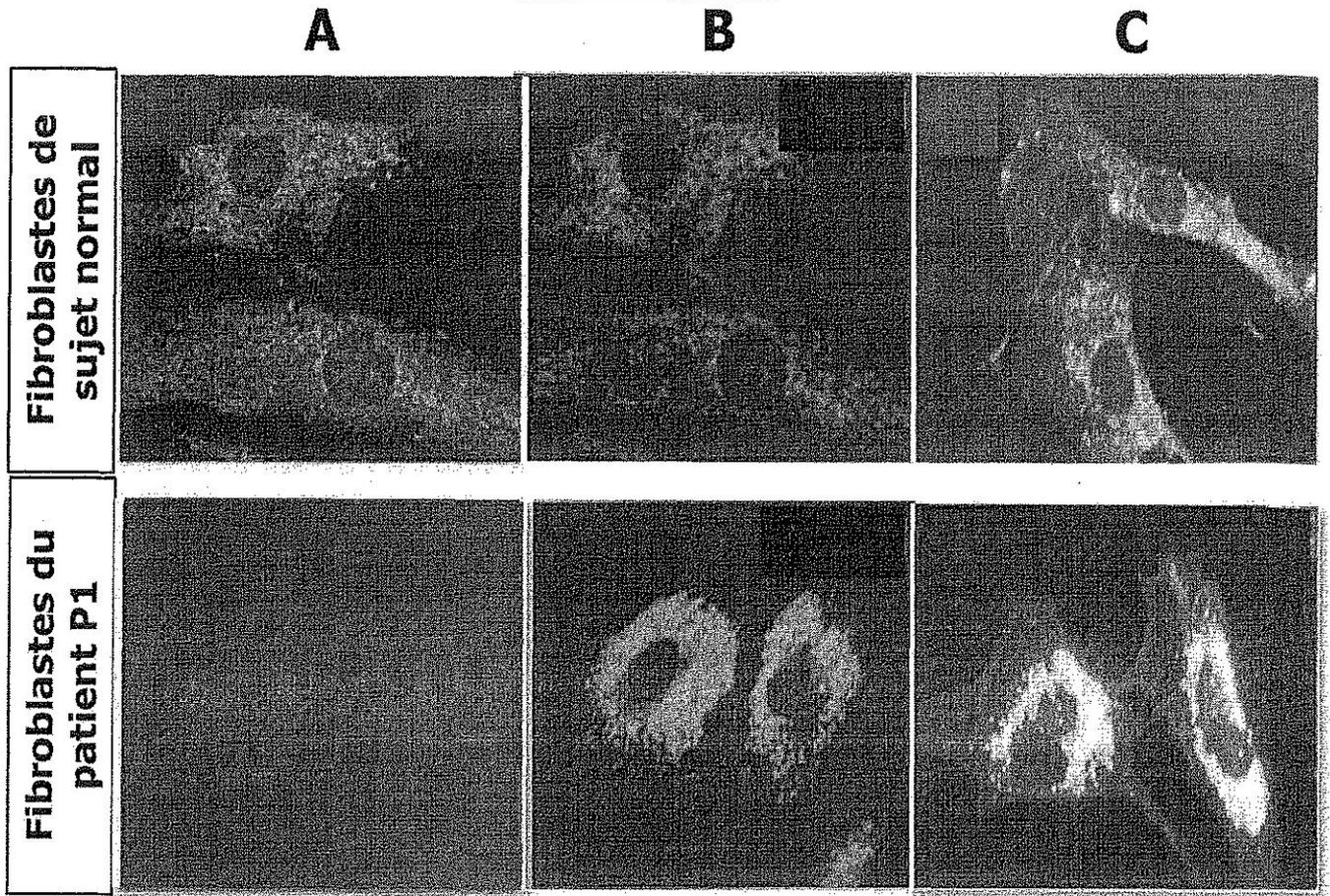
Alanine	Ala	A	GCU GCC GCA GCG
Cystéine	Cys	C	UGU UGC
Aspartate	Asp	D	GAU GAC
Glutamate	Glu	E	GAA GAG
Phénylalanine	Phe	F	UUU UUC
Glycine	Gly	G	GGU GGC GGA GGG
Histidine	His	H	CAU CAC
Isoleucine	Ile	I	AUU AUC AUA
Lysine	Lys	K	AAA AAG
Leucine	Leu	L	UUA UUG CUU CUC CUA CUG
Méthionine	Met	M	AUG
Asparagine	Asn	N	AAU AAC
Proline	Pro	P	CCU CCC CCA CCG
Glutamine	Gln	Q	CAA CAG
Arginine	Arg	R	CGU CGC CGA CGG AGA AGG
Sérine	Ser	S	AGU AGC
Thréonine	Thr	T	ACU ACC ACA ACG
Valine	Val	V	GUU GUC GUA GUG
Tryptophane	Trp	W	UGG
Tyrosine	Tyr	Y	UAU UAC
Stop	-	-	UAA UAG UGA

# Figure 1

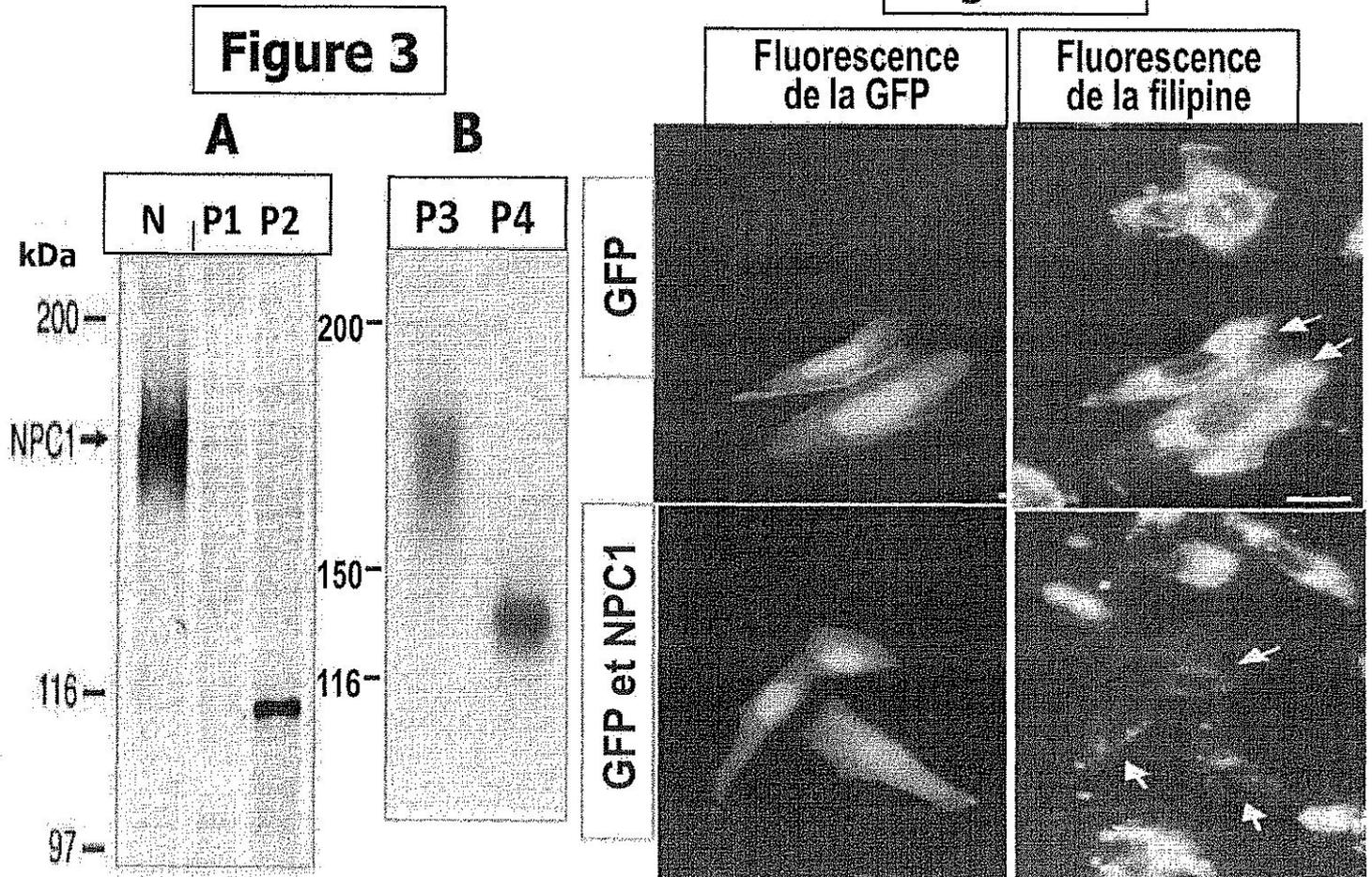
## Structure primaire de NPC1

10	20	30	40	50	60
<u>MTARGLALGL</u>	<u>LLLLLCPAQV</u>	<u>FSQSCVWYGE</u>	<u>CGIAYGDKRY</u>	<u>NCEYSGPPKP</u>	<u>LPKDGVDLVQ</u>
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
<u>ELCPGFFFCN</u>	<u>VSLCCDVRQL</u>	<u>QTLKDNLQLP</u>	<u>LQFLSRCPSC</u>	<u>FYNLLNLFCE</u>	<u>LTCSPRQSQF</u>
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
<u>LNVTATEDYV</u>	<u>DPVTNQTKTN</u>	<u>VKELQYYVGO</u>	<u>SFANAMYNAC</u>	<u>RDVEAPSSND</u>	<u>KALGLLCGKD</u>
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
<u>ADACNATNWI</u>	<u>EYMFNKDNGQ</u>	<u>APFTITPVFS</u>	<u>DFPVHGMPEM</u>	<u>NNATKGCDES</u>	<u>VDEVTA PCSC</u>
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
<u>QDCSIVCGPK</u>	<u>PQPPPPAPW</u>	<u>TILGLDAMYV</u>	<u>IMWITYMAFL</u>	<u>LVFFGAPFAV</u>	<u>WCYRKRYFVS</u>
<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
<u>EYTPIDSNIA</u>	<u>FSVNASDKGE</u>	<u>ASCCDPVSAA</u>	<u>FEGLRRLFT</u>	<u>RWGSFCVRNP</u>	<u>GCVIFSLVF</u>
<u>370</u>	<u>380</u>	<u>390</u>	<u>400</u>	<u>410</u>	<u>420</u>
<u>ITACSSGLVF</u>	<u>VRVTNPNVDL</u>	<u>WSAPSSQARL</u>	<u>EKEYFDQHFG</u>	<u>PFFRTEQLII</u>	<u>KAPLTDKHIY</u>
<u>430</u>	<u>440</u>	<u>450</u>	<u>460</u>	<u>470</u>	<u>480</u>
<u>QPYPGADVP</u>	<u>FGPPLDIQIL</u>	<u>HQVLDLQIAI</u>	<u>ENITASYDNE</u>	<u>TVTLDQICLA</u>	<u>PLSPYNTNCT</u>
<u>490</u>	<u>500</u>	<u>510</u>	<u>520</u>	<u>530</u>	<u>540</u>
<u>ILSVLNYPQN</u>	<u>SHSVLDHKKG</u>	<u>DDFFVYADYH</u>	<u>THFLYCVRAP</u>	<u>ASLNDTSLH</u>	<u>DPCLGTFGGP</u>
<u>550</u>	<u>560</u>	<u>570</u>	<u>580</u>	<u>590</u>	<u>600</u>
<u>VFPWLVLGGY</u>	<u>DDQNYNNATA</u>	<u>LVITFPVNNY</u>	<u>YNDTEKLQRA</u>	<u>QAWKEKFINF</u>	<u>VKNYKNPNLT</u>
<u>610</u>	<u>620</u>	<u>630</u>	<u>640</u>	<u>650</u>	<u>660</u>
<u>ISFTAERSIE</u>	<u>DELNRESDS</u>	<u>VFTVVISYAI</u>	<u>MFLYISLALG</u>	<u>HMKSCRLLV</u>	<u>DSKVS LGIAG</u>
<u>670</u>	<u>680</u>	<u>690</u>	<u>700</u>	<u>710</u>	<u>720</u>
<u>ILIVLSSVAC</u>	<u>SLGVPSYIGL</u>	<u>PLTLIVIEVI</u>	<u>PFLVLAVGVD</u>	<u>NIFILVQAYQ</u>	<u>RDERLQGETL</u>
<u>730</u>	<u>740</u>	<u>750</u>	<u>760</u>	<u>770</u>	<u>780</u>
<u>DQQLGRVLGE</u>	<u>VAPSMFLSSF</u>	<u>SETVAFFLGA</u>	<u>LSVMPAVHTE</u>	<u>SLFAGLAVFI</u>	<u>DFLLQITCFV</u>
<u>790</u>	<u>800</u>	<u>810</u>	<u>820</u>	<u>830</u>	<u>840</u>
<u>SLGLDIKRQ</u>	<u>EKNRLDIFCC</u>	<u>VRGAEDGTSV</u>	<u>QASESCLFRF</u>	<u>FKNSYSPLLL</u>	<u>KDWMRPIVIA</u>
<u>850</u>	<u>860</u>	<u>870</u>	<u>880</u>	<u>890</u>	<u>900</u>
<u>IFVGVLSFSI</u>	<u>AVLNKVDIGL</u>	<u>DQSLSMPDDS</u>	<u>YMVDFKSI</u>	<u>QYLHAGPPVY</u>	<u>FVLEEGHDYT</u>
<u>910</u>	<u>920</u>	<u>930</u>	<u>940</u>	<u>950</u>	<u>960</u>
<u>SSKGQNMVCG</u>	<u>GMGCNNDLV</u>	<u>QQIFNAAQLD</u>	<u>NYTRIGFAPS</u>	<u>SWIDDYFDNV</u>	<u>KPQSSCCRVD</u>
<u>970</u>	<u>980</u>	<u>990</u>	<u>1000</u>	<u>1010</u>	<u>1020</u>
<u>NITDQFCNAS</u>	<u>VDPACVRCR</u>	<u>PLTPEGKQRP</u>	<u>QGGDFMRFLP</u>	<u>MFLSDNPNPK</u>	<u>CGKGGHAAYS</u>
<u>1030</u>	<u>1040</u>	<u>1050</u>	<u>1060</u>	<u>1070</u>	<u>1080</u>
<u>SAVNILLGHG</u>	<u>TRVGATYFMT</u>	<u>YHTVLQTSAD</u>	<u>FIDALKKARL</u>	<u>IASNVTETMG</u>	<u>INGSAYRVFP</u>
<u>1090</u>	<u>1100</u>	<u>1110</u>	<u>1120</u>	<u>1130</u>	<u>1140</u>
<u>YSVFYVPYEQ</u>	<u>YLTIIDDTIF</u>	<u>NLGVSLGATF</u>	<u>LVTMVLGCE</u>	<u>LNSAVIMCAT</u>	<u>IAMVLVNMFG</u>
<u>1150</u>	<u>1160</u>	<u>1170</u>	<u>1180</u>	<u>1190</u>	<u>1200</u>
<u>VMNLNGISLN</u>	<u>AVSLVNLVMS</u>	<u>CGISVEFCSH</u>	<u>ITRAFTVSMK</u>	<u>GSRVERAEEA</u>	<u>LAHMGSSVFS</u>
<u>1210</u>	<u>1220</u>	<u>1230</u>	<u>1240</u>	<u>1250</u>	<u>1260</u>
<u>GITLTKFGGI</u>	<u>VVLAPAKSQI</u>	<u>FQIFYFRMYL</u>	<u>AMVLLGATHG</u>	<u>LIFLPVLLSY</u>	<u>IGPSVNKAKS</u>
<u>1270</u>					
<u>CATEERYKGT</u>	<u>ERERLLNF</u>				

**Figure 2**

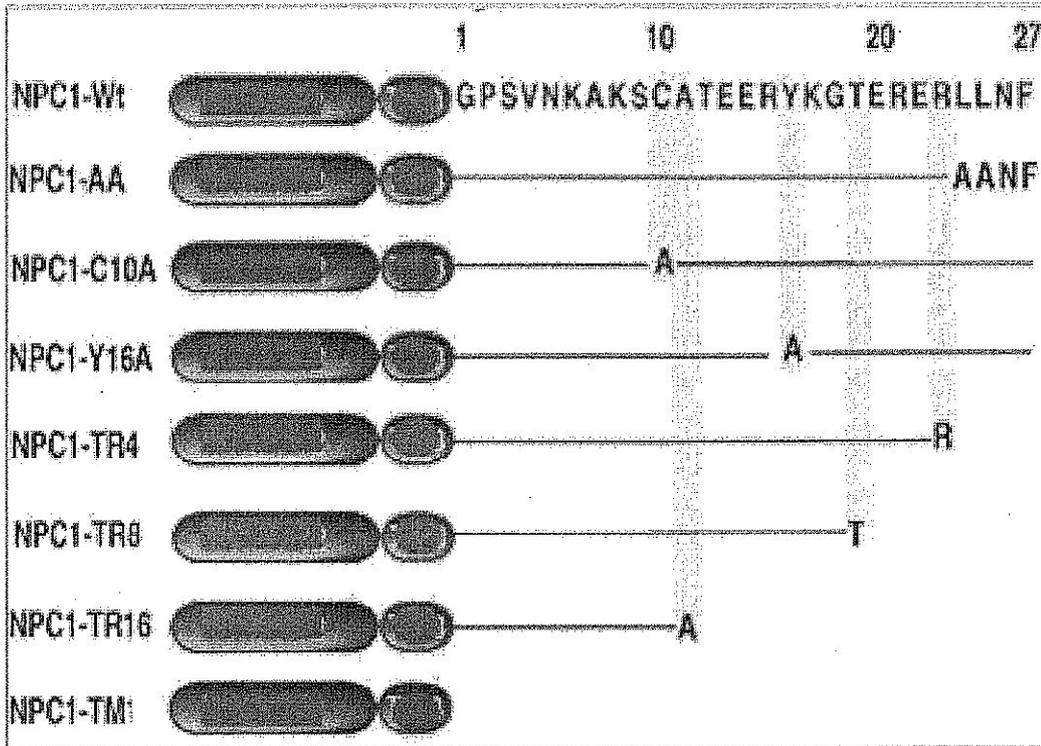


**Figure 4**



**Figure 5**

Correction du  
déficit des  
fibroblastes  
du patient P1



**Figure 6**

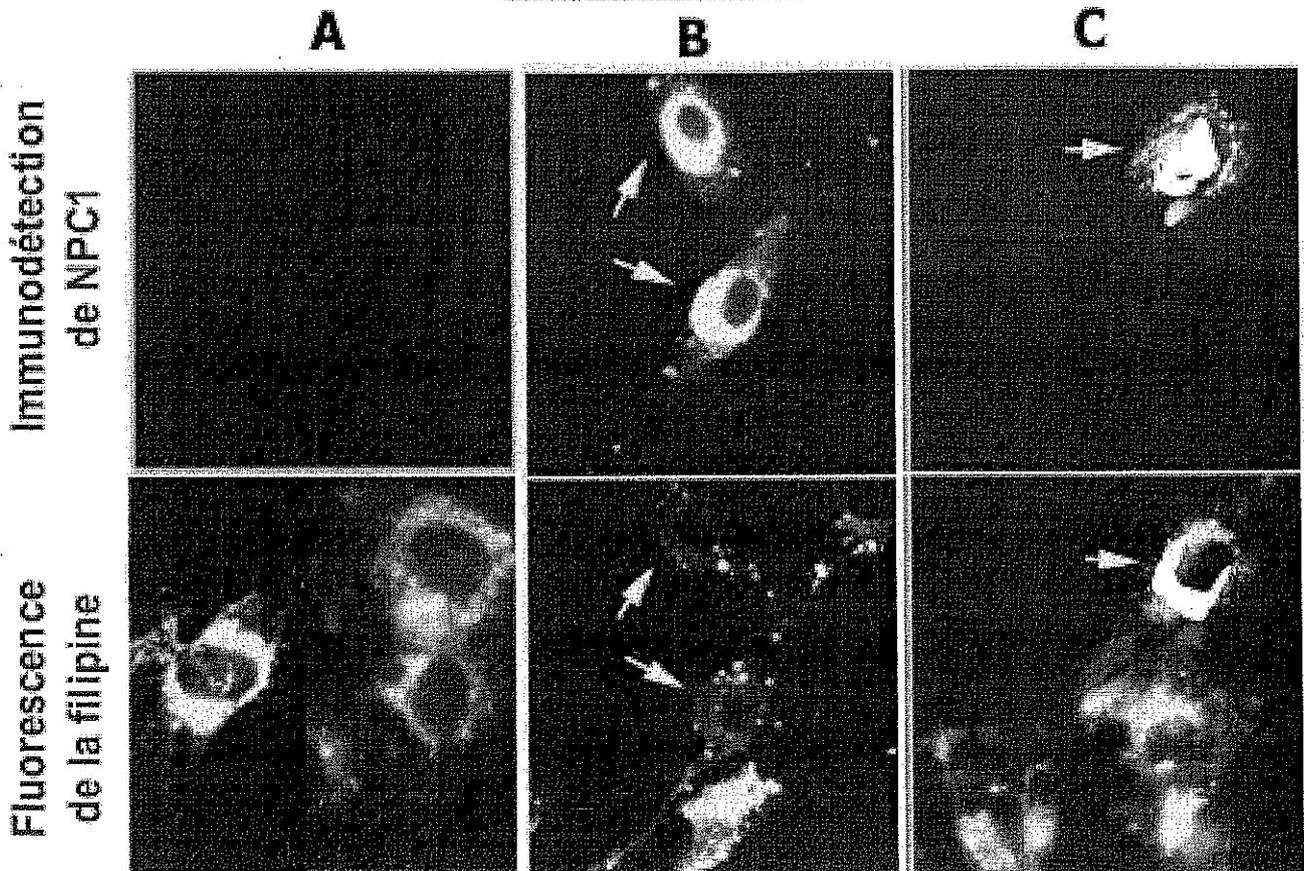


Figure 7

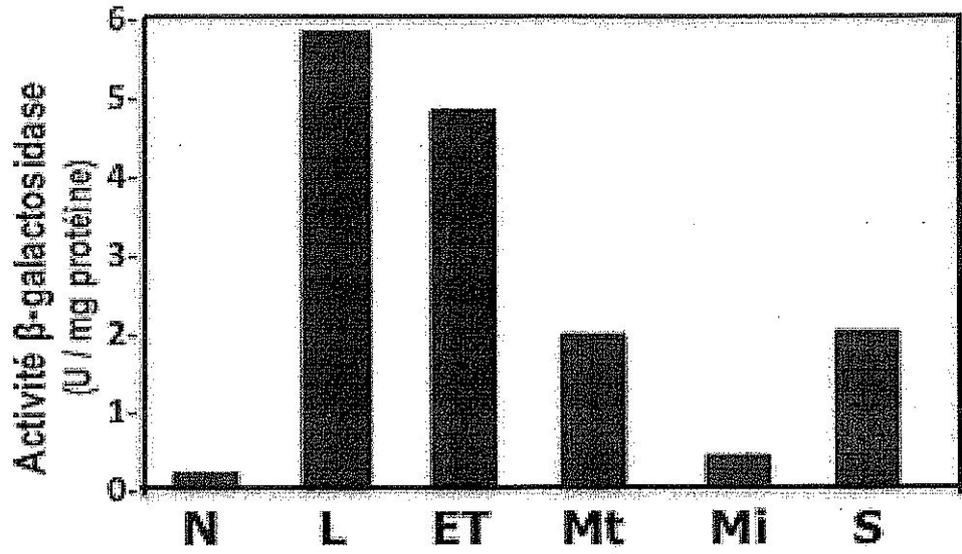


Figure 8

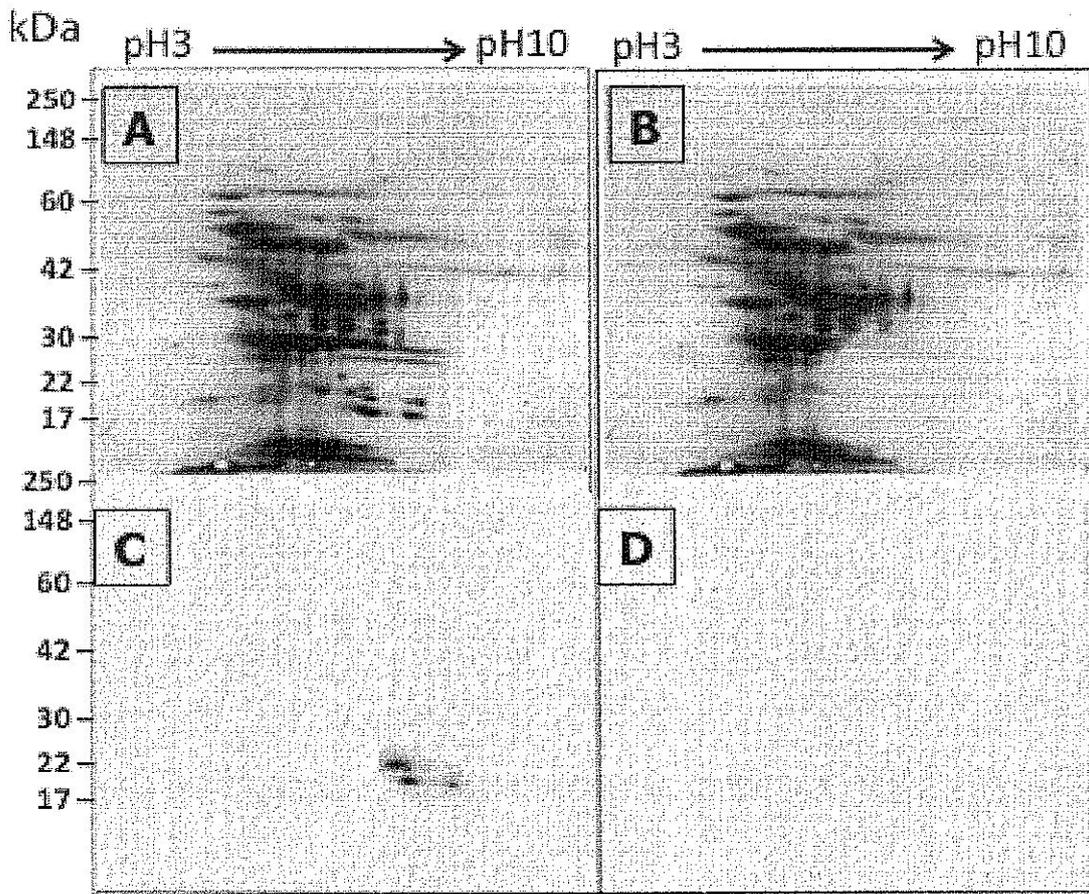
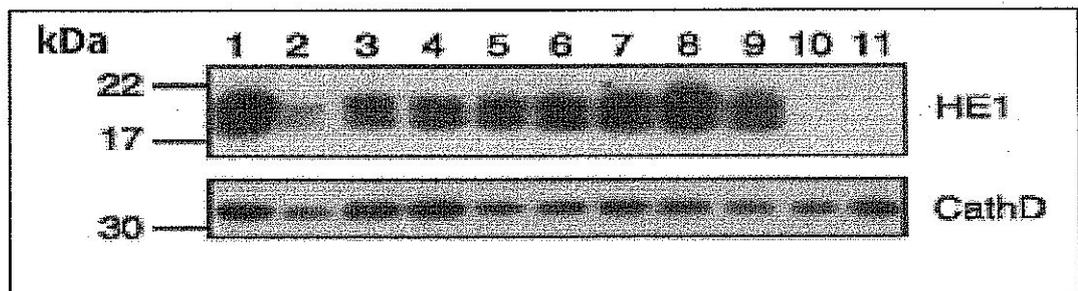
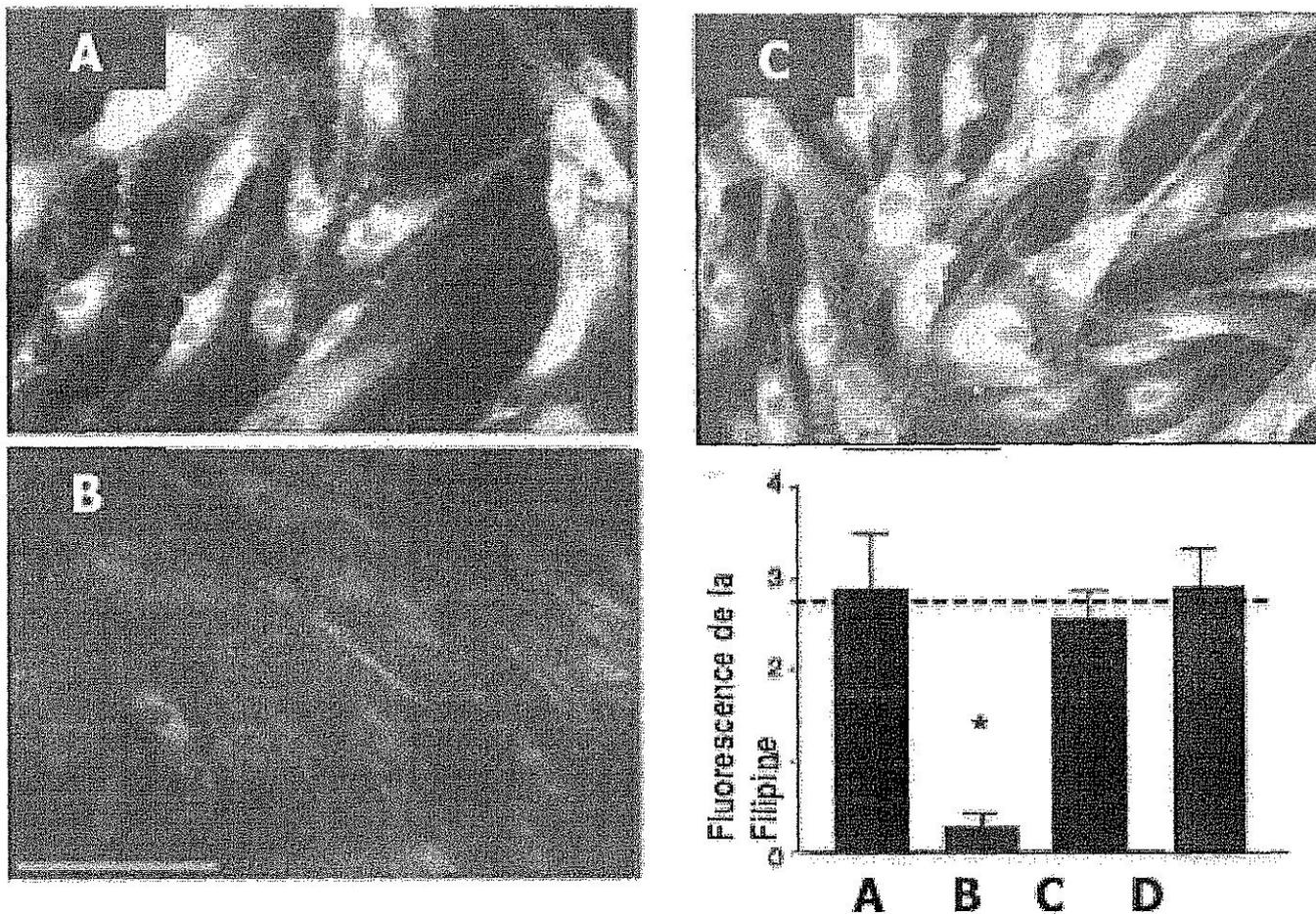


Figure 9





**Figure 11**



**Figure 12**

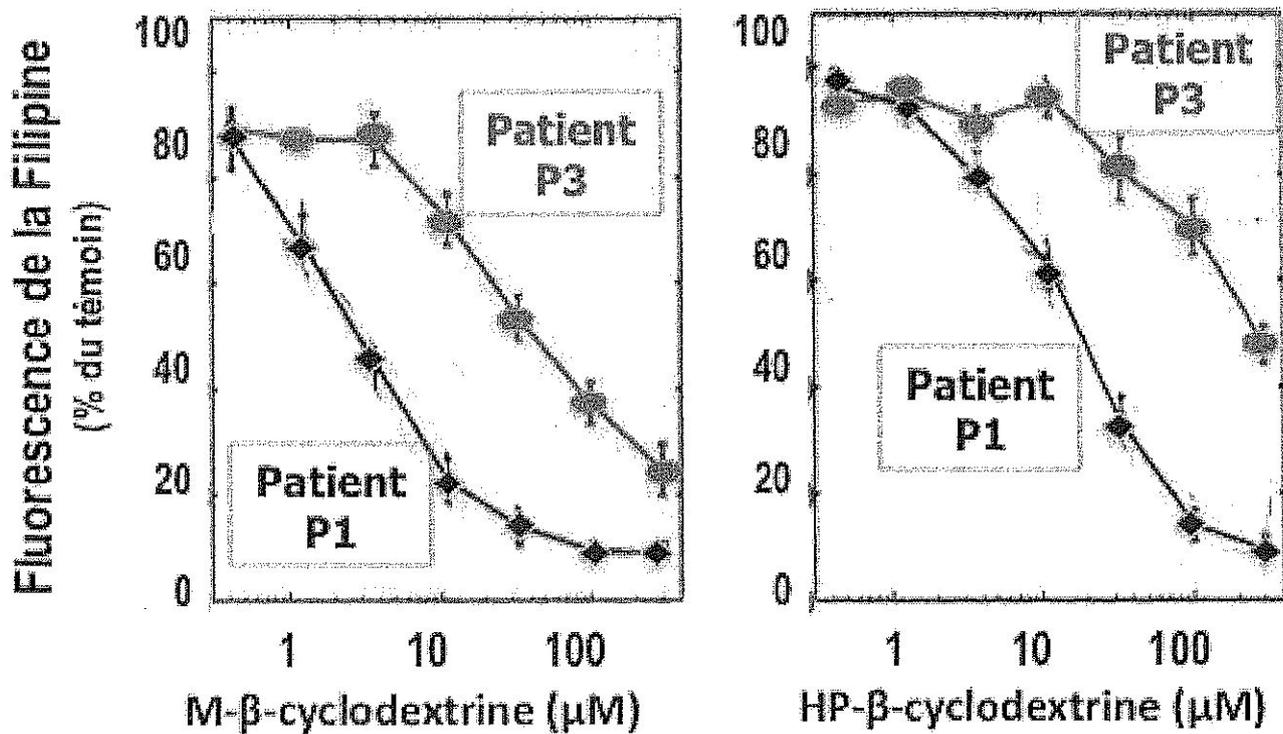


Figure 13

