



**HAL**  
open science

**MODELISATION PATHOLOGIQUE DES MALADIES  
MONOGENIQUES PAR L'UTILISATION DES  
CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES  
HUMAINES. PREUVE DE CONCEPT APPLIQUEE A  
LA DYSTROPHIE MYOTONIQUE DE TYPE 1**

Jérôme Alexandre Denis

► **To cite this version:**

Jérôme Alexandre Denis. MODELISATION PATHOLOGIQUE DES MALADIES MONOGENIQUES PAR L'UTILISATION DES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES HUMAINES. PREUVE DE CONCEPT APPLIQUEE A LA DYSTROPHIE MYOTONIQUE DE TYPE 1. Biologie cellulaire. Université d'Evry-Val d'Essonne, 2010. Français. NNT: . tel-00545797

**HAL Id: tel-00545797**

**<https://theses.hal.science/tel-00545797>**

Submitted on 12 Dec 2010

**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.

**UNIVERSITE D'EVRY VAL D'ESSONNE**  
**Ecole doctorale « Des génomes aux organismes »**



**THESE**

Présentée pour l'obtention du titre de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'EVRY VAL D'ESSONNE**

Mention « **Biologie Cellulaire et Moléculaire** »

par

**Jérôme Alexandre DENIS**

**Modélisation pathologique des maladies monogéniques par l'utilisation  
des cellules souches embryonnaires humaines  
Preuve de concept appliquée à la Dystrophie Myotonique de type 1**

**Soutenue le 13 Octobre 2010 au Génopole d'Evry, devant le jury composé de :**

Pr Philippe Manivet, Président du jury.  
Dr Geneviève Gourdon, Rapporteur.  
Dr Marie-Claude Potier, Rapporteur.  
Dr Nicolas Sergeant, Examineur.  
Dr John De Vos, Examineur.  
Dr Geneviève Pietu, Directeur de thèse.



Instituts  
thématiques



**Inserm**

Institut national  
de la santé et de la recherche médicale



## Liste des abréviations

AAV : *adeno-associated virus*

ADN=DNA : Acide désoxyribonucléique

AFM : Association française contre les myopathies

Ago: Argonaute

AMP: Assistance médicale à la procréation

AMPC: *Cyclic adenosine mono- phosphate*

APP : amyloid precursor protein

ARNm=mRNA: *Acide ribonucléique messenger*

ATM: *artificial trans-splicing molecules*

ATP: *Adénosin triphosphate*

bFGF: *Fibroblast growth factor basique*

BMP4: *Bone morphogenetic protein 4*

BMPs: *Bone morphogenetic proteins*

BrdU: Bromodeoxyuridine

CELF : CUGBP, ETR-like family

CLCN-1 : canal chlore

CMH: complexe majeur d'histocompatibilité

Co-Smads: Common mediator Smads

c-TNT : cardiac Troponin

CYP : Cytochrom P540

DMEM: Dubecco's modification of Eagle's medium

DM1 : Dystrophie Myotonique de type I

DM2 : Dystrophie myotonique de type II

DMPK : *Dystrophia myotonica protein kinase*

DPI : Diagnostic pré-implantatoire

EB: *Embryoid body*

EGF: *Epidermal growth factor*

EGFR: Recepteur à l'EGF



ES: *Embryonic stem cells*

FACS: *Fluorescent-activated cell sorting*

FDA: *Food and Drug Administration*

FGFs: *Fibroblast growth factors*

FISH : *Fluorescent In Situ Hybridization*

FIV : *Fécondation In Vitro*

FMN1 : *Survival Motor Neuron-1*

GFAP : *Glial fibrillary acidic protein*

GFP : *Green Fluorescent Protein*

GMP: *Good manufacturing practice*

hES: *Human embryonic stem cells*

HSA<sup>LR</sup>: *Human skeletal actine long repeat*

HTS: *High-throughput screening*

Id: *Inhibitor of differentiation*

IGF2: *Insulin-like growth factor 2*

IGFBP3: *Insulin-like growth factor binding protein 3*

INSR : *Insulin Receptor*

iPS: *Induced pluripotent stem cells cellules*

JAK : *Janus actived kinase*

KLF4 : *Krüppel-like factor 4*

KO: *Knock out*

KSR: *Knock-out serum replacement*

LIF : *Leukemia inhibitor factor*

MAPT : *Microtubule associated protein Tau*

MCI: *Masse cellulaire interne*

MDR: *Multidrug resistance*

MEFs: *Mouse Embryo Fibroblasts*

mES: *mouse embryonic stem cells*

MSC: *Mesenchymal stem cells*



NCSC: *Neural crest stem cells*

NCAM: *Neural cell adhesion molecule*

NEPs: Cellules neuro-épithéliales

NO: Monoxyde d'Azote

NPC: *Neuroepithelial progenitors*

NSC : *Neural stem cells*

OCT-3/4: *Octamer-3/4*

PAX: *Paired box*

PcG: *Polycomb group*

PCR: *Polymerase Chain reaction*

PGD : *Pre-implantation Genetic Diagnosis*

POU: (*Pit-oct-unc-domain*)- *transcription factor*

POU5F1: *POU class 5 homeobox 1*

qPCR: *PCR quantitative*

RISC: *RNA induced silencing complex*

RPE: *Retinal pigmentary epithelium*

R-Smads: Receptor regulated Smads

SDIA: *Stromal cell-Derived Inducing Activity*

Shh: *sonic hedgehog*

siARNs: Petits ARNs interférent.

Smads: *Mothers against decapentaplegic homolog*

SNC: système nerveux central

Sox2: *SRY-related HMG-box gene 2*

SRF: *serum response factor*

SRY: *Sex determining factor*

SSEA: *Stage Specific Embryonic Antigen*

SVF: Sérum de veau foetal

TERT: *Telomerase reverse transcriptase*

TGFβ: *Transforming growth factor β*



TRA-1-60/1-81: *Teratocarcinoma recognition rejection antigens 1-60/ 1-81*

TrxG: Trithorax group

UE: Union Européenne

UTR: UnTranslated Region

UV: Ultraviolets

Wnt: *Wingless integration site*



# Table des matières

---

Revue bibliographique .....	25
<b>1<sup>ère</sup> partie : Les cellules souches et applications</b> .....	<b>27</b>
<b>I. Les cellules souches</b> .....	<b>29</b>
1. Définitions .....	29
2. Les cellules souches pluripotentes .....	33
2.1. Les différents types de cellules souches pluripotentes .....	33
2.2. Origine et dérivation des cellules souches pluripotentes .....	33
2.3. Aspects éthiques et cadre légal .....	39
2.4. Bases moléculaires de l'identité des cellules hES .....	41
2.5. Manipulation in vitro des cellules hES .....	59
2.6. Différenciation des cellules ES .....	67
2.7. Induction de la pluripotence <i>ex vivo</i> .....	85
<b>II. Les applications à visées thérapeutiques des cellules souches pluripotentes</b> .....	<b>93</b>
1. Thérapie cellulaire .....	93
1.1. Principe et état d'avancement des applications des cellules souches en thérapie cellulaire .....	93
1.2. Thérapie cellulaire basée sur l'utilisation des cellules pluripotentes .....	95
1.3. Place des cellules iPS en thérapie cellulaire .....	99
1.3.1. Preuve de concept .....	99
1.3.2. Problèmes spécifiques liés à l'utilisation des cellules iPS .....	101
2. Recherche pharmaceutique .....	104
2.1. Modèles de pharmacologie et de toxicologie prédictive .....	105
2.1.1. Applications des hépatocytes dérivés des hES : .....	107
2.1.2. Applications des cardiomyocytes dérivés des hES : .....	107
3. Applications en recherche fondamentale .....	109
4. Modélisation pathologique .....	111



4.1 Les cellules hES normales modifiées par génie génétique	113
4.2 Les lignées de cellules ES mutantes porteuses d'anomalies génétiques	113
4.3 Les cellules induites à la pluripotence spécifiques de patients	115

## 2<sup>ème</sup> partie : la dystrophie myotonique de type I.

<b>I. Aspects génétiques</b>	<b>121</b>
<b>II. Epidémiologie</b>	<b>123</b>
<b>III. Aspects cliniques</b>	<b>125</b>
3.1 formes bénignes :	125
3.2 formes classiques :	125
3.3 Formes juvéniles	131
3.4 Formes congénitales	131
<b>IV. Pronostic</b>	<b>133</b>
<b>V. Diagnostic</b>	<b>133</b>
<b>VI. Mécanismes physiopathologiques proposés dans DM1</b>	<b>135</b>
6.1 Haploinsuffisance de la DMPK	135
6.2 Altération de l'expression des gènes proches de la DMPK et modifications épigénétiques	138
6.3 Gain de fonction de l'ARNm mutant	141
6.3.1 <i>Rétention nucléaire et toxicité de l'ARN messenger mutant</i>	141
6.3.2 <i>Implications des protéines CUGBP1 et MBNL1 dans DM1</i>	143
6.4 Relation génotype-phénotype :	159
6.4.1. <i>Canal chlore et myotonie</i>	159
6.4.2 <i>Insuline récepteur et résistance à l'insuline/diabète</i> :	159
6.4.3. <i>Tau, APP et NMDAR1 et anomalies neurales</i> :	161
6.5. Autres modèles de mécanismes physiopathologiques	162
<b>VII Stratégies thérapeutiques</b>	<b>165</b>
7.1. Prise en charge médicale des patients DM1	165
7.2. Stratégies de recherche pour le développement de nouvelles thérapeutiques	170
7.2.1. <i>Cibler la mutation au niveau de l'ADN en modulant la taille des expansions</i>	171



7.2.2 Cibler l'ARNm mutant en induisant sa dégradation, sa réparation ou son expulsion hors du noyau 173

7.2.3 Cibler les facteurs d'épissage MBNL1 et CUGBP1 .....177

7.2.4 Corriger les anomalies d'épissage .....183

**Résultats** .....

**1<sup>ère</sup> partie : Obtention et caractérisation de progéniteurs homogènes de progéniteurs.....**

**I. Obtention et caractérisation d'une population homogène de progéniteurs mésenchymateux ..191**

**II. Obtention et caractérisation d'une population homogène de progéniteurs neuraux.....193**

2.1 Obtention de progéniteurs neuraux.....193

2.2 Caractérisation de la population NCAM+ .....197

2.2.1 Caractérisation phénotypique .....197

2.2.2 Capacité de différenciation .....199

**III. Comparaison par transcriptome du profil d'expression des populations de progéniteurs neuraux et mésenchymateux .....201**

**IV. Obtention et caractérisation d'une population homogène de cellules souches neurale à partir des cellules hES.....202**

4.1 Obtention des cellules NSC .....203

4.2 Caractérisation phénotypique des NSC .....205

**V. Comparaison des propriétés des cellules NPC et NSC.....207**

**VI. Discussion et perspectives .....207**

**2<sup>ème</sup> partie : Modélisation pathologique de la DM1..... 99**

**I. Stratégie générale .....219**

**II. Validation du modèle.....221**

2.1. Obtention des ressources biologiques.....221

2.2. Recherche des anomalies pathognomiques dans les cellules hES et leurs progénies mésenchymateuses et neurales. ....221

2.3. Recherche de nouveaux médicaments .....227

2.4. Recherche de nouveaux biomarqueurs pour la DM1 .....231



III. Modélisation pathologique des anomalies neurales dans la DM1	235
3.1. Étude d'une anomalie de prolifération dans les précurseurs neuraux DM1	237
3.1.1 <i>Contexte de l'étude et principaux résultats</i>	237
3.1.2 <i>Conséquence de l'inhibition de la voie mTOR et autophagie</i>	241
3.2 Étude de l'implication de la protéine Tau	253
3.2.1 <i>Contexte scientifique</i>	253
3.2.2 <i>Principaux résultats</i>	255
3.2.3 <i>Discussion et perspectives</i>	263
<b>Discussion et Conclusion générale</b>	<b>275</b>



## **Avant-propos**



Les cellules souches pluripotentes, cellules souches embryonnaires (ES) ou induites à la pluripotence (iPS), ouvrent des perspectives thérapeutiques majeures. De part leur propriété d'auto-renouvellement, elles permettent de disposer d'une quantité illimitée de matériel biologique et par leur propriété de pluripotence elles ont la capacité de se différencier vers n'importe quels types cellulaires de l'organisme.

Elles intéressent autant les biologistes cellulaires qui voient en elles un moyen de décrypter les mécanismes de la régénération cellulaire et du développement embryonnaire que les cliniciens qui les considèrent comme une approche thérapeutique qui permettra de traiter de nombreuses pathologies. Plus récemment, l'industrie pharmaceutique s'est intéressée à ces cellules comme outil pour des tests de toxicologie prédictive.

Parmi leurs applications prometteuses, une approche originale est basée sur l'utilisation de cellules souches pluripotentes porteuses de mutation pour effectuer une modélisation pathologique permettant de reproduire dans un modèle cellulaire, non transformé, des anomalies moléculaires représentatives d'une maladie génétique. Cette source de cellules représente une alternative aux méthodes existantes pour l'étude de pathologies humaines souvent limitées par la difficulté d'accès à des ressources biologiques pertinentes du fait de la rareté des malades et parfois par l'impossibilité d'accéder à des biopsies de tissus affectés. Ce modèle cellulaire présente un potentiel inestimable pour améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement de maladies monogéniques mais aussi pour la recherche de nouveaux médicaments.

C'est dans le cadre de cette dernière application que se placent les résultats présentés dans cette thèse qui a été effectuée dans le laboratoire I-STEM (Institut des Cellules Souches pour le Traitement et l'étude des Maladies Monogéniques).

Le principe de la modélisation pathologique est très récent puisqu'au début de ce projet en 2005, seules trois équipes avaient rapporté la dérivation de lignées de cellules souches embryonnaires humaines (hES) mutantes. L'équipe dirigée par le Dr. Geneviève Piétu dans laquelle j'ai effectué ma thèse avait pour objectif de faire la démonstration de l'intérêt de ce nouveau concept.

Pour mener ce projet, l'équipe a eu l'opportunité, dès la création d'I-STEM en 2005, d'importer de Belgique une lignée de cellules hES dérivée à partir d'un embryon écarté lors d'un diagnostic pré-implantatoire et porteuse de la mutation responsable d'une maladie neuromusculaire, la Dystrophie Myotonique de type 1 (DM1) ou maladie de Steinert.



Ma contribution à ce projet de modélisation pathologique a été d'utiliser les progénies neurales des cellules hES afin d'explorer les anomalies neurologiques de cette pathologie qui restent encore peu connues.

Ayant rejoint, l'équipe au début de l'année 2007 dans le cadre de mon master recherche, la première partie de mes travaux a porté sur la mise au point des conditions de culture permettant de différencier les cellules hES vers le lignage neural pour obtenir une population homogène de progéniteurs neuraux et de cellules souches neurales qui peuvent se différencier en neurones, puis de les caractériser sur le plan phénotypique et fonctionnel.

J'ai ensuite, par une étude transcriptomique, comparé le profil d'expression des progéniteurs neuraux à celui d'une autre population homogène de précurseurs engagés dans la voie mésodermique, les précurseurs mésenchymateux. J'ai ainsi pu identifier les gènes spécifiquement exprimés dans chacune de ces populations ce qui m'a permis de comparer les voies de signalisation mises en jeu (Article I).

Dans la seconde partie de mon travail de thèse, j'ai caractérisé dans les cellules neurales porteuses de la mutation pour DM1 : (1) une anomalie de prolifération que nous avons associée à un défaut d'activation d'une voie de signalisation cellulaire, la voie mTOR (Article II); (2) l'expression de la protéine Tau, un marqueur pouvant être impliqué dans un mécanisme de neurodégénérescence, en collaboration avec les Drs. Marie-Laure Caillet-Boudin et Nicolas Sergeant de l'INSERM « Neurodégénérescence et Mort Neuronale » à Lille.

Mes travaux ainsi que ceux des autres membres de l'équipe visent à élargir les applications des cellules hES utilisées à des fins thérapeutiques en définissant leur capacité à modéliser une maladie génétique de façon suffisamment précise pour permettre d'élaborer des nouvelles thérapies.



## **Revue bibliographique**



**Première Partie :**  
**Cellules souches pluripotentes**  
**et applications**

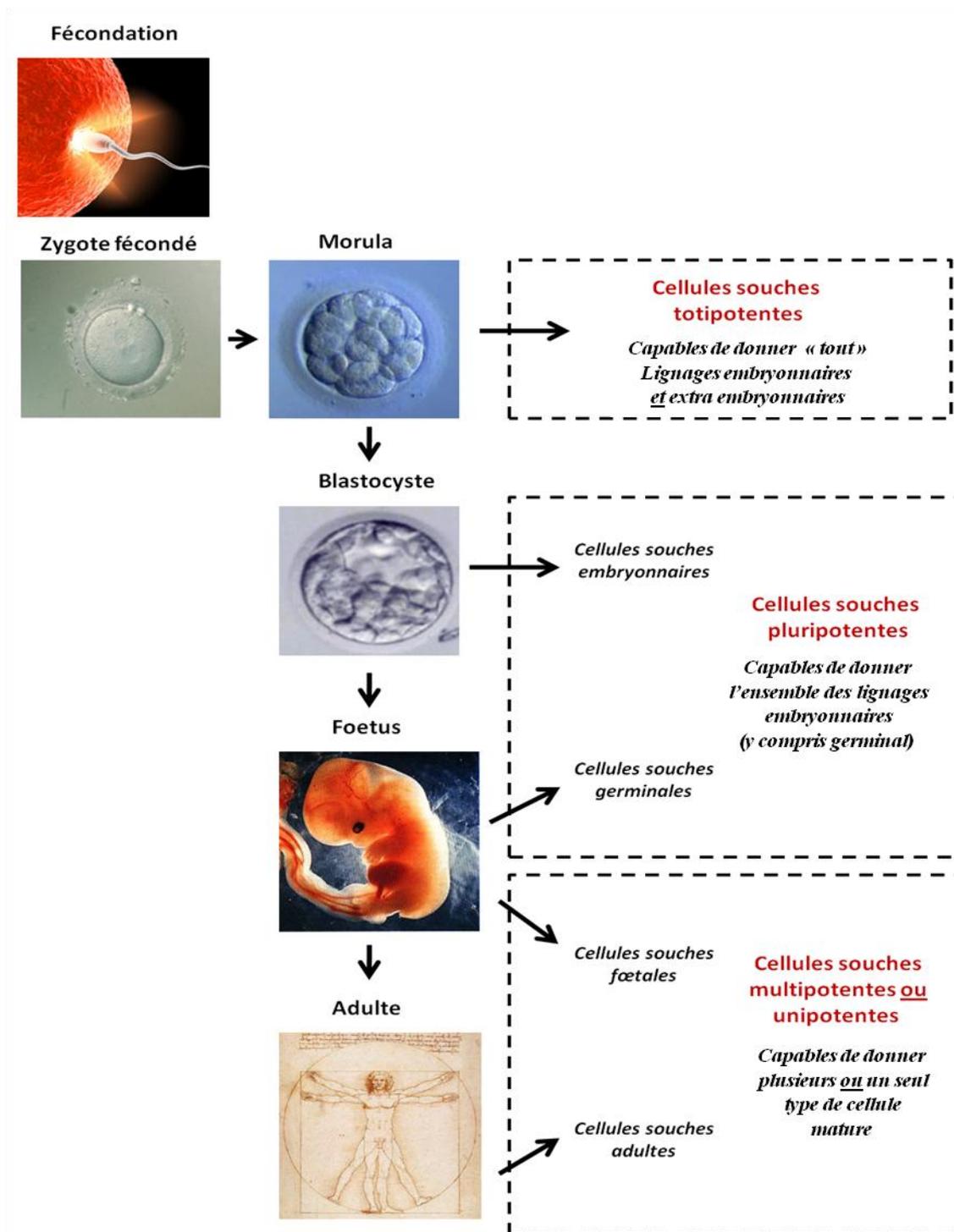


Figure 1 : Potentialités de différenciation des cellules souches au cours de la vie.

## **I. Les cellules souches**

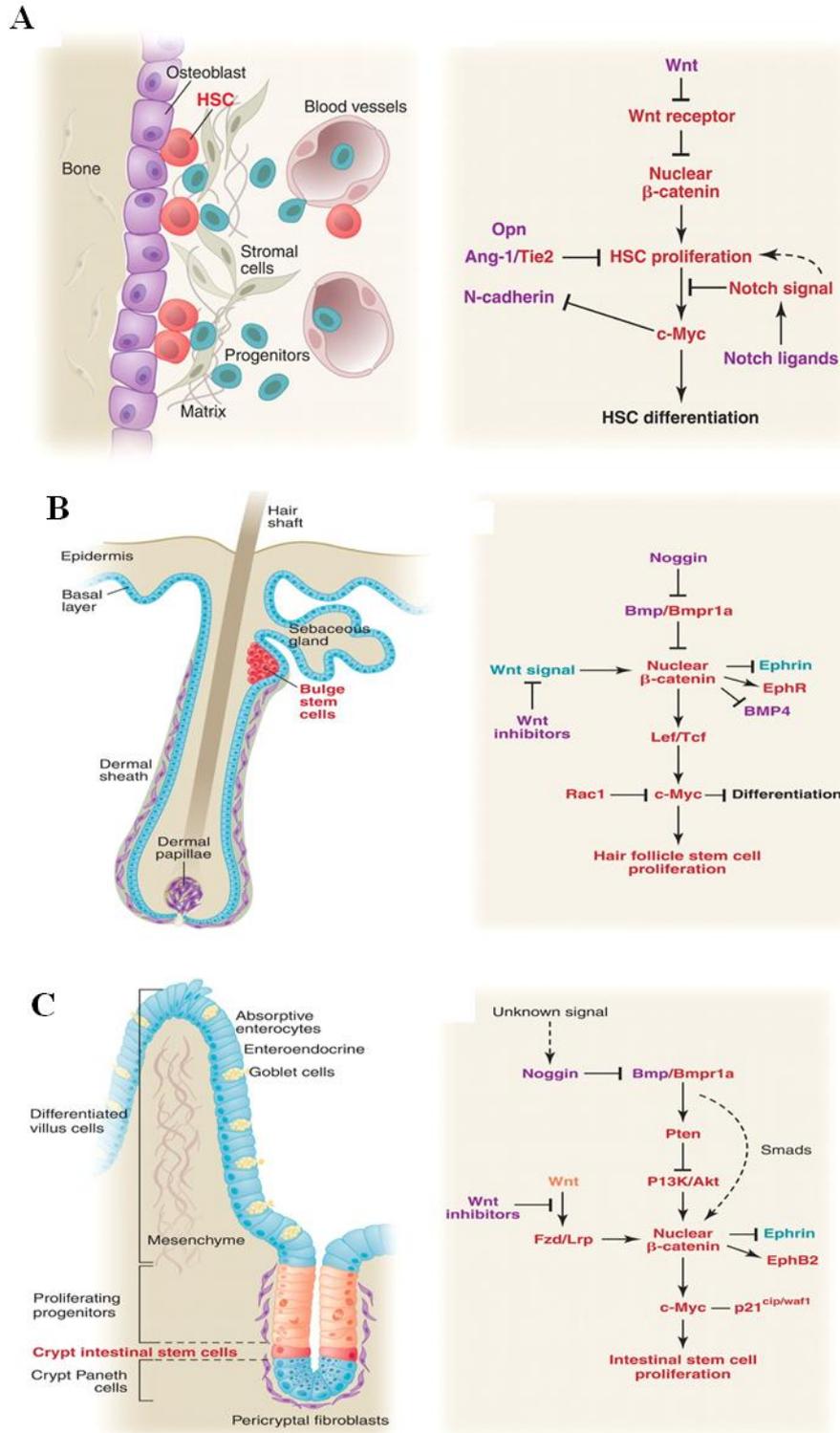
### **1. Définitions**

Les cellules souches du terme anglo-saxon « stem cells » sont des cellules qui ont la propriété de se diviser théoriquement de manière illimitée -ou du moins un très grand nombre de fois- de manière physiologique, par opposition aux cellules cancéreuses qui acquièrent cette propriété au cours d'un processus pathologique. Ce phénomène est appelé auto-renouvellement (« *self-renewal* » en anglais). Il signifie que les cellules se divisent de façon à donner au moins une cellule fille identique à la cellule d'origine en conservant toutes ses propriétés génétiques et épigénétiques. Il y a alors maintien ou amplification du réservoir cellulaire.

Sur les bases de cette première définition, il existe différents types de cellules souches se définissant par leurs potentialités de différenciation qui se restreignent au cours de la vie d'un individu (**Figure 1**).

Après la fécondation, le zygote et la morula sont constitués de cellules dites totipotentes, c'est-à-dire capables de donner l'ensemble des lignages embryonnaires et extra-embryonnaires.

Les cellules souches embryonnaires isolées de l'embryon au stade blastocyste sont dites pluripotentes, c'est-à-dire qu'elles sont capables de donner tous les lignages embryonnaires, y compris germinales, mais pas les annexes extra-embryonnaires. Les autres types de cellules souches présentes dans les tissus embryonnaires, fœtaux ou adultes sont appelées cellules souches adultes ou tissulaires. Certaines d'entre elles gardent des capacités de différenciation importantes et on parle de multipotence si elles sont capables de générer au moins quatre progénies différentes. Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) et les cellules souches hématopoïétiques (CSH) représentent les deux exemples les mieux décrits. Les premières sont capables de générer des chondrocytes, des ostéocytes, des adipocytes et des cellules du muscle lisse (Delorme et al., 2009). Les secondes sont capables de générer entièrement le lignage hématopoïétique (érythroblastique, mégacaryocytaire et lymphoïde), ce qui a été démontré par leur capacité à reconstituer les propriétés hématogènes de la moelle osseuse après aplasie médullaire (Peters et al.2010). D'autres cellules souches ont des capacités de différenciation encore plus restreintes, c'est-à-dire capables de donner deux ou trois progénies. C'est par exemple le cas des cellules souches chondro-ostéogéniques de la moelle osseuse (Beresford, 1989; Caplan, 1997; Owen, 1988; Owen, 1988; Prockop, 1997) ou des cellules souches du bulbe folliculaire du cheveu qui sont capables de générer des cellules épidermiques mais aussi les glandes sébacées (Jaks et al.; Ohyama, 2007). Enfin, certaines cellules souches sont dites unipotentes. Elles sont capables de se différencier uniquement dans un seul type de cellules



**Figure 2 : Cellules souches adultes dans leur microenvironnement naturel (niche) et principales voies de signalisation impliquées dans le maintien de leur identité *in vivo*.**

(A) Niche dans la moelle osseuse. (B) Niche dans le follicule pileux. (C) Niche cryptique de l'intestin.

(Adapté de Moore et Lemishka, 2006).

spécialisées. C'est le cas par exemple des cellules satellites du muscle squelettique qui permettent la régénération partielle du muscle après un traumatisme (Collins et al., 2005; Relaix and Marcelle, 2009) ou encore des cellules de l'épithélium basal de la muqueuse intestinale responsables de l'auto-renouvellement rapide du tissu tapissant le tube digestif (Barker et al., 2008).

Dans l'organisme adulte, les cellules souches sont rares -de l'ordre de une pour un million- et sont localisées dans des régions précises que l'on appelle « niches » présentent dans des tissus à régénération rapide. Celles-ci représentent un microenvironnement physique et chimique qui permet le maintien de leurs identités et la prolifération de ces cellules (Moore and Lemischka, 2006). Par exemple, on connaît une niche dans la moelle osseuse, dans le follicule pileux et à la base des villosités cryptiques de l'intestin (**Figure 2**). La complexité de ce microenvironnement explique au moins en partie pourquoi il est aussi difficile de maintenir ces cellules souches en culture *in vitro*.

Ces cellules possèdent un certain nombre de propriétés qui sont nécessaires mais pas suffisantes pour les définir. Elles sont quiescentes, ont un cycle cellulaire long, elles peuvent exclure des colorants par des protéines ABC qui les relarguent activement hors de la cellule et peuvent éventuellement exprimer certains marqueurs de surface comme CD34, CD133 ou c-kit mais il n'y a pas de signature moléculaire précise. En effet, les tentatives de comparaison des différents types de cellules souches par des approches de transcriptome n'ont pas permis d'identifier des marqueurs de « souchitude » communs (Stemness) (Rochon et al., 2006). En réalité, la seule façon de caractériser des cellules souches adultes est d'étudier leurs propriétés d'auto-renouvellement et leurs capacités de différenciation, à la fois *in vitro* par dilution limite, mais aussi par leur capacité à régénérer un tissu hôte.

Dans la suite de cette thèse, nous discuterons principalement des cellules souches pluripotentes.



## **2. Les cellules souches pluripotentes**

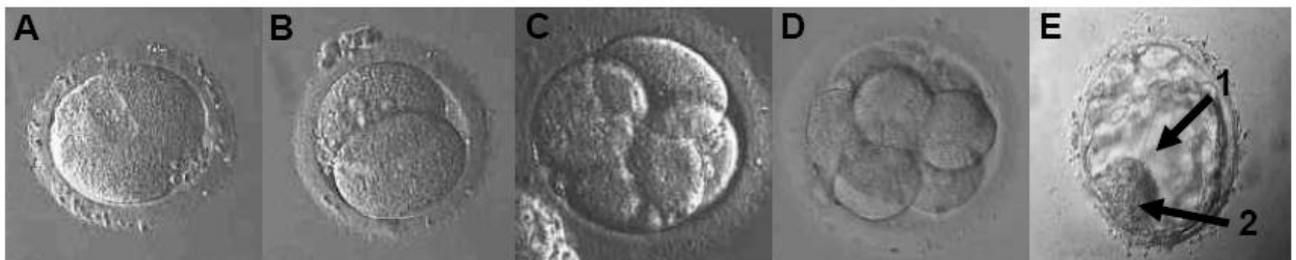
### **2.1. Les différents types de cellules souches pluripotentes**

Historiquement, le concept de pluripotence est relativement ancien et provient des travaux réalisés sur les tératocarcinomes de souris. Ces tumeurs se développent dans les gonades et sont constituées d'un agglomérat désorganisé de cellules ectopiques d'origines diverses comprenant par exemple du muscle, du cartilage ou du tissu neural. Dès 1964, ces cellules indifférenciées ont été identifiées comme à l'origine des multiples types tissulaires observés. Elles furent appelées cellules carcinomales embryonnaires et firent l'objet de nombreuses recherches dans les années 1970 (Martin, 1980). Pendant longtemps, ces cellules ont été considérées comme pluripotentes mais cette propriété n'a pas été confirmée. En effet, lorsqu'elles sont injectées dans un blastocyste, elles participent au développement de l'embryon mais leurs progénies ne sont retrouvées que dans certains des tissus du souriceau - dit chimériques - mais pas dans les gamètes. Ces cellules que certains utilisent encore, comme la lignée N-tera2, peuvent néanmoins participer à la compréhension des mécanismes qui dirigent la différenciation cellulaire (Andrews, 1998). Aujourd'hui, la source principale de cellules souches pluripotentes reste l'embryon au tout début de son développement permettant l'établissement de lignées de cellules souches embryonnaires (ES). Ces cellules constituent la ressource biologique principale de ce travail de thèse. Cependant, la possibilité récente de reprogrammation de cellules somatiques en cellules induites à la pluripotence (iPS) par réexpression forcée de certains facteurs de transcription a ouvert de nouvelles perspectives que l'on discutera dans le chapitre 2.7.

### **2.2. Origine et dérivation des cellules souches pluripotentes**

#### **2.2.1. Les cellules souches embryonnaires (ES)**

Chez l'Homme, au cours du développement précoce de l'embryon, la segmentation ou clivage fait directement suite à la fécondation. Elle dure quatre jours et donne naissance à une petite masse de même taille que le zygote, que l'on appelle morula, composée de quelques dizaines de cellules, les blastomères. A ce stade, tous les blastomères ont un aspect identique mais il y a déjà une détermination : les blastomères périphériques sont destinés à devenir le trophoblaste (annexe extra-embryonnaire placentaire), alors que les blastomères centraux constituent la masse cellulaire interne (MCI) à partir de laquelle se formera l'embryon lui-même. Le 5<sup>ème</sup> et le 6<sup>ème</sup> jour, la blastulation fait suite au clivage pour former le blastocyste



**Figure 3 : Description du développement précoce de l'embryon humain au cours de la première semaine.**

(A) Zygote après fécondation. (B) Première mitose de segmentation, l'embryon est au stade de 2 cellules. (C) Deuxième mitose de segmentation conduisant à la formation du stade 4 cellules. (D) Embryon au stade Morula. Au 3ème jour, les limites cellulaires sont parfaitement visibles et les blastomères peuvent être séparés mécaniquement les uns des autres. (E) Blastocyste (4ème jour) présentant une cavité centrale, le blastocèle (1) et à un de ses pôles, la masse cellulaire interne (2).

**(Figure 3).** A ce stade, une cavité se forme à l'intérieur de l'embryon, c'est le blastocèle. Il sépare le trophoblaste de la MCI, excepté à l'un des pôles de l'embryon qui devient le pôle embryonnaire. C'est dans cette MCI que l'on trouve les cellules ES mais seulement pendant une très courte période de temps, en moyenne entre 5 jours  $\frac{1}{2}$  et 7 jours  $\frac{1}{2}$  après la fécondation. Ce sont ces cellules qui sont capables de générer l'ensemble des lignages somatiques et germinales de l'embryon.

Le procédé qui consiste à isoler les cellules ES à partir de la MCI afin d'établir une lignée cellulaire stable est appelé dérivation. Ce processus a été décrit simultanément pour la première fois chez la souris en 1981 par deux équipes indépendantes, l'une britannique dirigée par Sir Martin John Evans (Prix Nobel de Médecine et de Physiologie en 2007) et Matthew H. Kaufman à l'Université de Cambridge et l'autre américaine dirigée par Gail R. Martin à l'Université de Californie à San Francisco. Les cellules ES sont isolées à partir de la MCI à l'aide d'une réaction immunitaire qui sera détaillée plus loin. Pendant les 15 années qui suivirent, ce procédé a été utilisé avec succès dans de nombreuses espèces mais toujours pas chez l'Homme. Un premier papier publié en 1994 faisait l'état de la possibilité d'isoler les cellules de la MCI de blastocystes humains et de les maintenir en culture (Bongos et al, 1994). C'est en 1995 que la première lignée de cellules ES de primate (la lignée R278.5) fut établie par le groupe de James A. Thomson du Genome Center of Wisconsin, à Madison aux Etats-Unis à partir d'un blastocyste male de singe rhésus (Thomson et al., 1995). Dans cet article, les auteurs constataient que les ES de primates différaient significativement des ES de souris mais ressemblaient aux cellules souches de carcinomes embryonnaires humaines, ce qui permettait de penser qu'il serait possible de maintenir en culture des cellules souches embryonnaires humaines (hES). La démonstration fut faite 3 ans plus tard par le même groupe américain et publié dans la revue Science en 1998 (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998). Dans cet article, quatorze MCI ont été isolées à partir de blastocystes humains et cinq lignées de cellules hES, (3 males et 2 femelles) ont été dérivées et caractérisées dont la lignée H9 que j'ai utilisé comme lignée contrôle dans mes travaux. La méthode de dérivation pratiquée par ces premières équipes et appliquée depuis dans la majorité des laboratoires de recherche est l'isolement immunochirurgical de la MCI. Elle implique une lyse trophectodermique par réaction anticorps-complément. Dans cette technique, le blastocyste est tout d'abord traité par de la pronase, une enzyme qui permet de dissoudre la zone pellucide. Le trophectoderme est ensuite lysé par traitement avec les anticorps d'un sérum total anti-humain et du complément



provenant de cochon d'Inde. Après rinçage, la MCI est isolée et mise en culture sur une couche de cellules nourricières, préalablement inactivée de manière à ce qu'elles ne prolifèrent plus.

En raison de l'utilisation de complément d'origine animale, cette méthode présente un risque de contamination de la lignée par des pathogènes animaux et est associée à un rendement assez faible de l'ordre de 1/8. Deux méthodes alternatives ont alors été développées (Kim et al., 2005b). Elles permettent de s'adapter à la qualité du blastocyste et présentent l'avantage de diminuer le risque de contamination par des pathogènes animaux :

- **la culture d'embryon entier** : lors de ce procédé, bien que la MCI soit présente, le risque de perte des cellules ES suite à la prolifération plus rapide des cellules trophoblastiques n'est pas négligeable. Une variante consiste à utiliser un laser pour détruire le trophoblaste après la mise en culture de l'embryon entier (Cortes et al., 2008).
- **la culture d'embryon partiel** : cette technique consiste à isoler mécaniquement la MCI à l'aide d'une pipette de verre ultrafine ou plus récemment par l'assistance d'un laser. Elle permet notamment de diminuer le problème d'envahissement par les cellules trophoblastiques tout en préservant une efficacité similaire à la lyse immunochirurgicale.

Le diagnostic pré-implantatoire offre également la possibilité d'identifier à partir des blastomères, au stade morula, les embryons porteurs d'une maladie génétique et de dériver en utilisant la technique décrite précédemment des lignées de hES porteuses de mutations génétiques (voir plus loin dans le chapitre II.4.2).

#### 2.2.2. Les cellules souches germinales (EG)

En novembre 1998, soit en même temps que la publication de la dérivation des premières lignées hES par l'équipe de Thomson, un autre groupe américain dirigé par John D. Gearhart à l'Université de Baltimore a réussi à dériver plusieurs lignées de cellules souches dites germinales (hEGC) à partir des cellules primordiales germinales qui sont des précurseurs des ovocytes et des spermatozoïdes prélevées sur les crêtes génitales de fœtus humains avortés entre la 5<sup>ème</sup> et la 9<sup>ème</sup> semaine de développement (Shamblott et al., 1998). Ces hEGC partagent plusieurs propriétés avec les cellules hES. Elles ont notamment des capacités de différenciation étendues. Ces cellules sont considérées comme pluripotentes mais sont distinctes des cellules ES dérivées de la MCI (Kerr et al., 2006a; Kerr et al., 2006b).



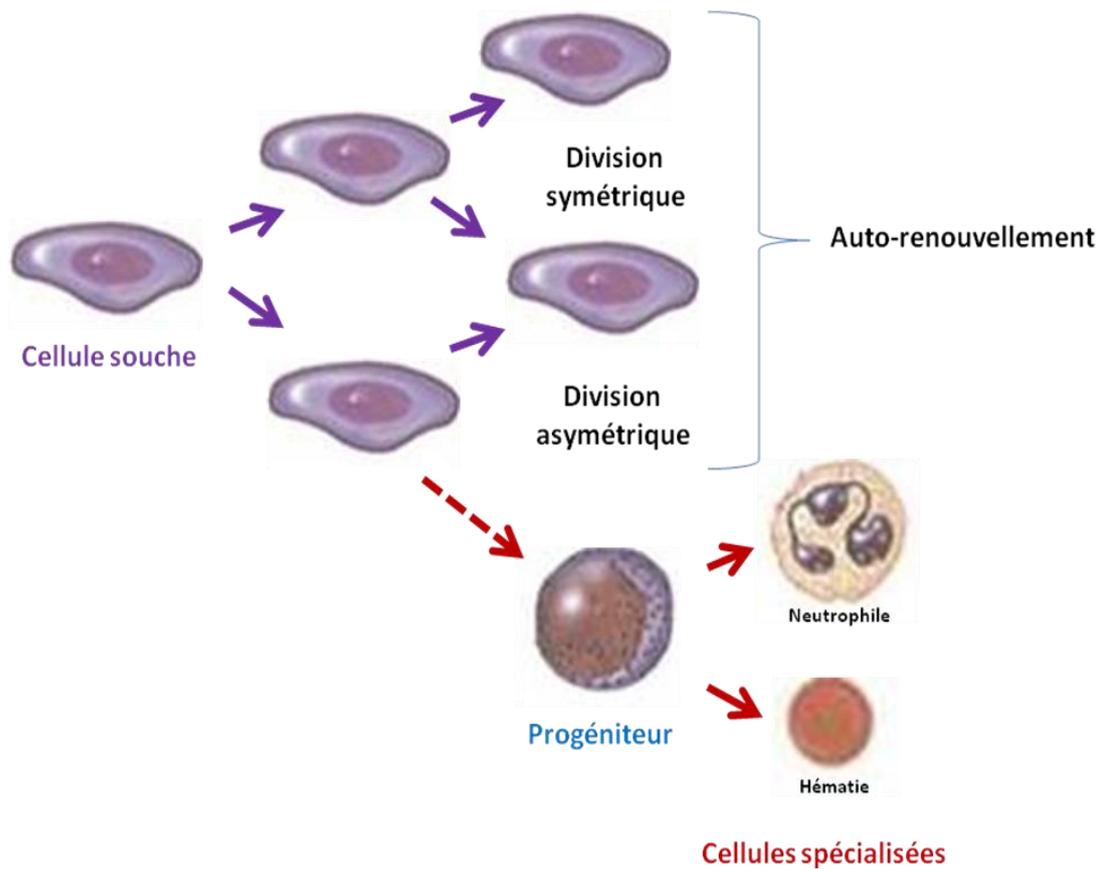
### 2.3 Aspects éthiques et cadre légal

Comme nous venons de le décrire, l'origine naturelle des cellules souches pluripotentes est l'embryon au tout début de son développement. C'est cette origine et la nécessité de devoir détruire l'embryon qui posent des problèmes éthiques sur son statut et sur la notion de protection et de respect de la dignité humaine.

En France, ce n'est que très récemment que les chercheurs ont pu envisager d'utiliser ces cellules. Il aura en effet fallu attendre la loi de bioéthique n° 2004-800 du 6 août 2004, pour qu'un cadre spécifique à la recherche sur l'embryon humain et les cellules hES soit défini. Cette loi interdit explicitement le clonage (article 21), qu'il soit dit « reproductif » ou « thérapeutique », et la recherche sur l'embryon (article 25). Cependant, à titre dérogatoire et pour une période probatoire de cinq ans, le texte précise que « les recherches peuvent être autorisées sur l'embryon et les cellules embryonnaires lorsqu'elles sont susceptibles de permettre des progrès thérapeutiques majeurs et à la condition de ne pouvoir être poursuivies par une méthode alternative d'efficacité comparable, en l'état des connaissances scientifiques ». C'est l'Agence de Biomédecine, une autorité gouvernementale créée par la loi de bioéthique de 2004 et opérationnelle depuis le 5 mai 2005, compétente pour les questions relatives aux greffes d'organes, la reproduction, l'embryologie et la génétique humaine, qui encadre ces recherches sur les cellules hES. Elle est notamment chargée d'évaluer la pertinence et la finalité thérapeutique des projets de recherche. La décision finale d'autorisation appartient aux ministres de la santé et de la recherche.

Cette loi permet aux chercheurs autorisés de travailler sur des lignées de cellules hES issues d'embryons conçus *in vitro* mais uniquement dans le cadre d'une assistance médicale à la procréation effectuée sur le territoire français ou sur des lignées de cellules importées de pays étrangers et créées dans les mêmes conditions. La loi rappelle qu'il est interdit de concevoir des embryons uniquement dans un but de recherche et distingue trois types d'embryons :

- les embryons surnuméraires ne faisant plus l'objet d'un projet parental.
- les embryons dont l'état ne permet pas la réimplantation ou la conservation à des fins de grossesse.
- les embryons porteurs d'une anomalie recherchée dans le cadre d'un diagnostic préimplantatoire (DPI).



**Figure 4 : Notion d'auto-renouvellement des cellules souches.**

On distingue généralement les cellules souches qui se divisent de manière symétrique en générant deux cellules filles identiques, ce qui conduit à une prolifération exponentielle du nombre de cellules en culture et les cellules souches qui se divisent de manière asymétrique en générant une seule cellule fille identique, tandis que l'autre rentre dans un programme de différenciation. Dans ce cas, il y a maintien d'un réservoir constant de cellules souches mais pas d'amplification.

Dans ces trois cas, les embryons peuvent être utilisés, à titre gracieux, à des fins de recherche seulement après consentement éclairé et écrit des 2 parents. Cette autorisation peut par ailleurs être suspendue, avec ou sans préavis, à tout moment en cas de non-respect de la loi.

Les premières autorisations d'importation de lignées de cellules hES porteuses de mutations à l'origine de maladies monogéniques ont été attribuées par l'Agence de Biomédecine en 2005 et les premières autorisations de dérivation et d'amplification ont été attribuée le 19 juin 2006, au Dr M. Peschanski et au Pr S. Viville. Dans le document le plus récent publié en 2009 par le conseil d'état, 43 programmes de recherche ont été autorisés sur 52 demandes et concernent 28 laboratoires : 3 équipes travaillent sur l'embryon entier, 4 ont pour objectifs de développer de nouvelles lignées de cellules hES et 21 travaillent sur des lignées déjà établies qui ont été dérivées en France ou importées de l'étranger.

Comme prévu par la Loi de Bioéthique de 2004, la période de dérogation probatoire des 5 ans s'est achevée et le bilan des résultats des recherches a été évalué conjointement par l'Agence de Biomédecine et l'office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques. Un projet de Loi a été rédigé en décembre 2009 mais n'a toujours pas été examiné par le parlement. Cependant, l'attitude politique se dirige vers le maintien du dispositif législatif actuel.

#### **2.4 Bases moléculaires de l'identité des cellules hES**

Ces dernières années, des progrès importants ont été accomplis dans la compréhension des bases moléculaires de l'identité des cellules ES. Ces mécanismes tendent à maintenir ces cellules dans un état d'équilibre en s'opposant :

- **à la sénescence naturelle** : ce processus leur permet de se renouveler à l'identique, théoriquement de manière illimitée (Zeng and Rao, 2007). C'est cette propriété d'auto-renouvellement qui permet de générer une ou deux cellules souches filles en fonction de la nature symétrique ou asymétrique des divisions (**Figure 4**).
- **à la propension de ces cellules à se différencier** : ce mécanisme est appelé maintien de l'état d'indifférenciation ou maintien de la pluripotence.

Ces deux mécanismes sont très étroitement interconnectés et participent de manière indissociable au maintien de l'identité des cellules ES.



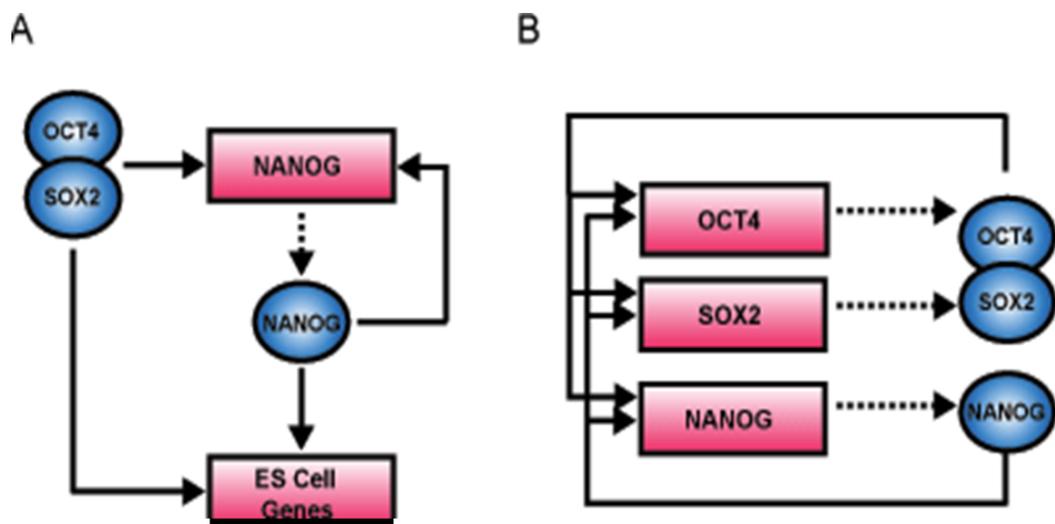
On distingue schématiquement trois niveaux d'intégration de ces mécanismes :

- **la régulation génique** : elle est médiée par l'expression de gènes spécifiques.
- **la régulation épigénétique** : elle concerne un niveau d'intégration supérieur au cours duquel plusieurs dizaines voire centaines de gènes peuvent être réprimés ou au contraire pré-activés ensemble par contrôle de l'architecture chromatinienne de la molécule d'ADN.
- **la régulation par des facteurs extrinsèques** : elle est médiée par des voies de signalisation intracellulaire qui permettent à la cellule de répondre et de s'adapter à un moment donné à des signaux morphogéniques paracrines de leurs microenvironnements influant leur comportement et leur identité.

#### 2.4.1. Réseaux de régulation génique

Trois gènes codant des facteurs de transcription sont au cœur de la régulation de l'identité des cellules ES. Il s'agit de *NANOG*, *SOX2* et *OCT4/POU5F1* qui sont des gènes également fortement exprimés dans la MCI des blastulas murines et humaines. Les premières études indiquaient que les embryons déficients pour le facteur *OCT4* mourraient au stade blastocyste et que les cellules ES présentant un niveau d'expression d'*OCT4* perturbé perdaient leur propriété d'auto-renouvellement en induisant leur différenciation (Nichols et al., 1998; Niwa et al., 2000). Concernant le facteur de transcription à homéodomaine *NANOG*, il fut montré que celui-ci soutenait l'auto-renouvellement des cellules ES de souris en l'absence de LIF, une cytokine essentielle pour leur maintien à l'état indifférencié. (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). Enfin, le facteur de transcription *SOX2* a été identifié par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine dans les cellules ES et le produit de ce gène forme avec *OCT4* un complexe protéique.

L'identification des acteurs impliqués dans les processus moléculaires qui dirigent l'identité des cellules ES a également fortement bénéficié de la mise au point de technologies exploratoires exhaustives de l'expression des gènes par une approche utilisant le transcriptome (Calhoun et al., 2004). Ces études ont montré d'une part des différences de profils d'expression entre les différents types de cellules pluripotentes, par exemple entre les cellules de carcinomes embryonnaires et les cellules ES (Liu et al., 2006), mais aussi entre espèces entre les cellules ES humaines et murines (Sato et al., 2003). En revanche, les profils d'expression de différentes lignées ES d'une même espèce restent très proches sans être identiques (Li et al., 2006).



**Figure 5 : Motifs de régulation transcriptionnelle dans les cellules souches embryonnaires humaines.**

(A) Exemple de relations auto-régulatrices entre les 3 facteurs « clés » de pluripotence. Les régulateurs sont représentés par des cercles bleus ; les promoteurs des gènes par des rectangles roses. La liaison d'un régulateur à un promoteur est indiquée par une flèche pleine, les gènes codant pour les régulateurs sont liés à leur régulateur respectif par des flèches pointillées. (B) Boucle auto-régulatrice interconnectée formée par *Oct4*, *Sox2* et *Nanog*.

(D'après Boyer, 2005)

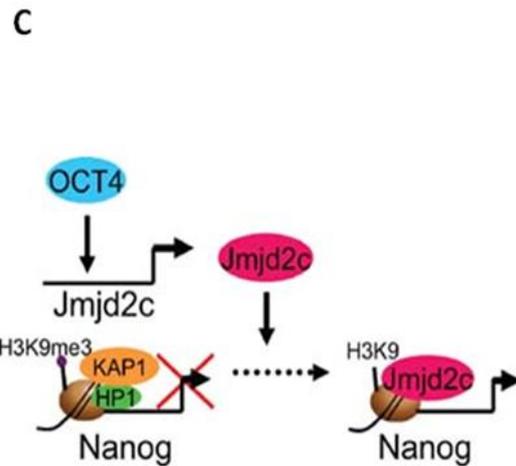
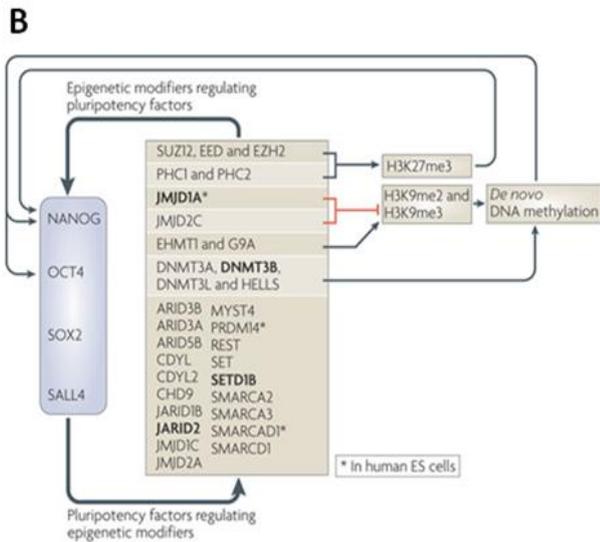
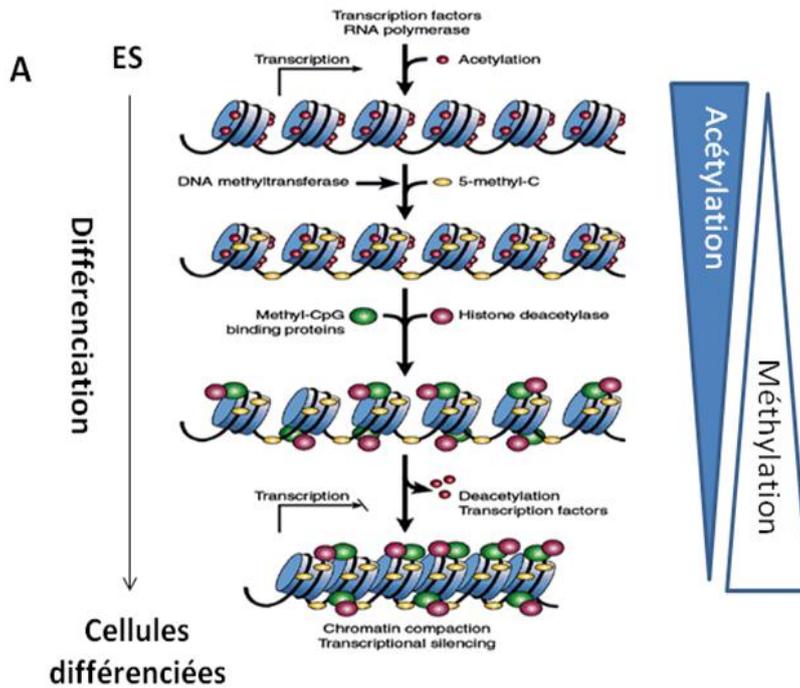
Par la suite, plusieurs études, dont celle menée par le groupe américain de l'Institut de Technologie de Cambridge dirigé par Rudolf Jaenisch, ont posé les bases du mécanisme de pluripotence en découvrant que les protéines codées par ces trois gènes clés étaient capables de se fixer mutuellement dans leurs propres séquences promotrices établissant ainsi une boucle d'auto-régulation (Boyer et al., 2005). Par exemple, les protéines OCT4 et SOX2 reconnaissent le promoteurs du gène *NANOG* (Rodda et al., 2005) (**Figure 5**).

Ces études démontrèrent également que ces protéines co-occupaient les promoteurs de plus de 300 gènes dont certains étaient déjà identifiés comme jouant un rôle fondamental soit dans l'identité cellulaire, soit dans la différenciation spécifique de lignage.

De plus, ce réseau génique semble être régulé de manière précise par des modulations de la balance d'expression de ces 3 gènes pouvant induire un signal de différenciation vers l'un des lignages spécifiques. En effet, le maintien de l'expression de *SOX2* est nécessaire à l'induction et au maintien de l'identité neurale (Graham et al., 2003) alors que les variations du niveau d'expression d'*OCT4* semble réguler la différenciation précoce (Rodriguez et al., 2007) notamment celle du mésoderme cardiaque en agissant comme un compétiteur avec d'autres facteurs comme *SOX17* (Stefanovic et al., 2009).

Les travaux de recherche actuels s'orientent vers une meilleure compréhension des relations géniques existant entre ces 3 gènes clés de pluripotence et ceux identifiés comme fortement exprimés dans les cellules hES ou intervenant dans la différenciation précoce.

Afin de mieux caractériser ces listes de gènes, plusieurs méta-analyses concernant des résultats de transcriptome ont été récemment publiées. Parmi elles, le travail réalisé par le groupe de John De Vos à Montpellier a regroupé les données provenant de 38 études transcriptomiques dans un outil informatique Amazonia! disponible sur internet à l'adresse suivante <http://amazonia.transcriptome.eu>. Cette étude montre qu'un peu plus de 1000 gènes sont retrouvés modulés en commun dans au moins 3 études et 48 gènes dans au moins 10 études établissant ainsi une liste consensus de gènes exprimés dans les cellules hES (Assou et al., 2007). D'autres études ont également cherché à établir de nouvelles listes consensus de gènes de pluripotence dont celle du groupe de travail de la société savante américaine des cellules souches (ISSCR) qui a réalisé les profils d'expression génique de 59 lignées de hES dérivées à travers le monde (Adewumi et al., 2007).



**Figure 6 : Régulation de la pluripotence par des facteurs épigénétiques.**

(A) Les cellules hES sont caractérisées par un état de condensation de la chromatine globalement relâchée. Les histones qui contrôlent l'architecture de la chromatine sont dans un état d'hyperacétylation et les promoteurs sont hypométhylés. Au cours de la différenciation des déacétylases (HDACs) interviennent et il y a méthylation des promoteurs médiés par des méthyltransférases. Ces événements contribuent à éteindre l'expression de gènes non requis au cours d'une différenciation spécifique de lignage (Modifié d'après [www.med.ulf.edu](http://www.med.ulf.edu)). (B) Les gènes de pluripotences sont impliqués dans une boucle d'auto-régulation avec les facteurs épigénétiques (D'après Hemberger, 2009). (C) Oct4 se fixe sur le promoteur du gène *Jmjd2c* codant une déméthylase qui se fixe à son tour sur le promoteur et prévient la méthylation de la lysine K9 de l'histone 3 au niveau du promoteur du gène *Nanog*. Ceci empêche la reconnaissance de complexes répresseurs tels que KAP1 ou HP1.

#### 2.4.2 Régulation épigénétiques

Les modifications épigénétiques sont définies par des changements stables dans l'expression des gènes. Ce processus est très important pour le maintien de l'état de pluripotence car il permet de réprimer des gènes cibles spécifiques de lignage. Il existe principalement deux types de régulation: la méthylation répressive des promoteurs (ilots CpG) et des modifications post-traductionnelles des histones, qui sont des protéines structurales de la chromatine constituant le nucléosome et régulant le degré de compaction de la chromatine.

De manière générale, la chromatine relâchée, l'euchromatine, est permissive à la transcription c'est-à-dire qu'elle se présente dans une configuration stérique favorable à l'accès du complexe d'initiation transcriptionnelle. A l'inverse, la chromatine se condense au cours du processus de différenciation cellulaire pour former l'hétérochromatine conduisant à la répression des gènes non requis dans un lignage spécifique donné (**Figure 6**). Ces événements participent très clairement au contrôle en aval de certains gènes cibles de pluripotence ainsi qu'au processus de différenciation précoce. Parmi les modifications touchant les histones, l'acétylation de certaines lysines des histones H3 et H4 entraîne une neutralisation des charges positives qui contribuent à diminuer l'interaction entre deux nucléosomes adjacents. Ces modifications entraînent un dépliement de l'ADN favorisant l'activation de la transcription. Le processus est régulé à la fois par des acétylases et des déacétylases. Par ailleurs, la méthylation intervient également sur différentes lysines de l'histone H3 avec soit un effet activateur sur la transcription comme c'est le cas de la di-méthylation de la lysine 4 (H3K4me2) qui est médiée par les protéines homologues du groupe trithorax (Ruthenburg et al., 2007; Shilatifard, 2008), soit un effet répresseur comme les bi-méthylations de la lysine 9 (H3K9me2) et les tri-méthylations de la lysine 27 (H3K27me3) qui favorisent la compaction de la chromatine. La méthylation de la lysine 27 est assurée par des complexes protéiques homologues du groupe polycomb (**Figure 7**). Ils agissent en réprimant plusieurs centaines de gènes dont certains sont des gènes clés du développement. Ces complexes sont donc directement impliqués dans le maintien de l'état indifférencié des cellules ES aussi bien chez la souris (Boyer et al., 2006) que chez l'Homme (Ren, 2006).

Le mécanisme n'est pas parfaitement compris mais on sait que le complexe polycomb PRC2 est recruté au niveau des régions CpG méthylés dans les promoteurs des gènes cibles et que la spécificité de cette reconnaissance fait vraisemblablement intervenir les protéines SOX2, OCT4 et NANOG (Endoh et al., 2008; Squazzo et al., 2006). Une fois fixée sur sa cible, le complexe PRC2 qui contient la protéine EZH2 méthyle la lysine 27 sur l'histone H3.

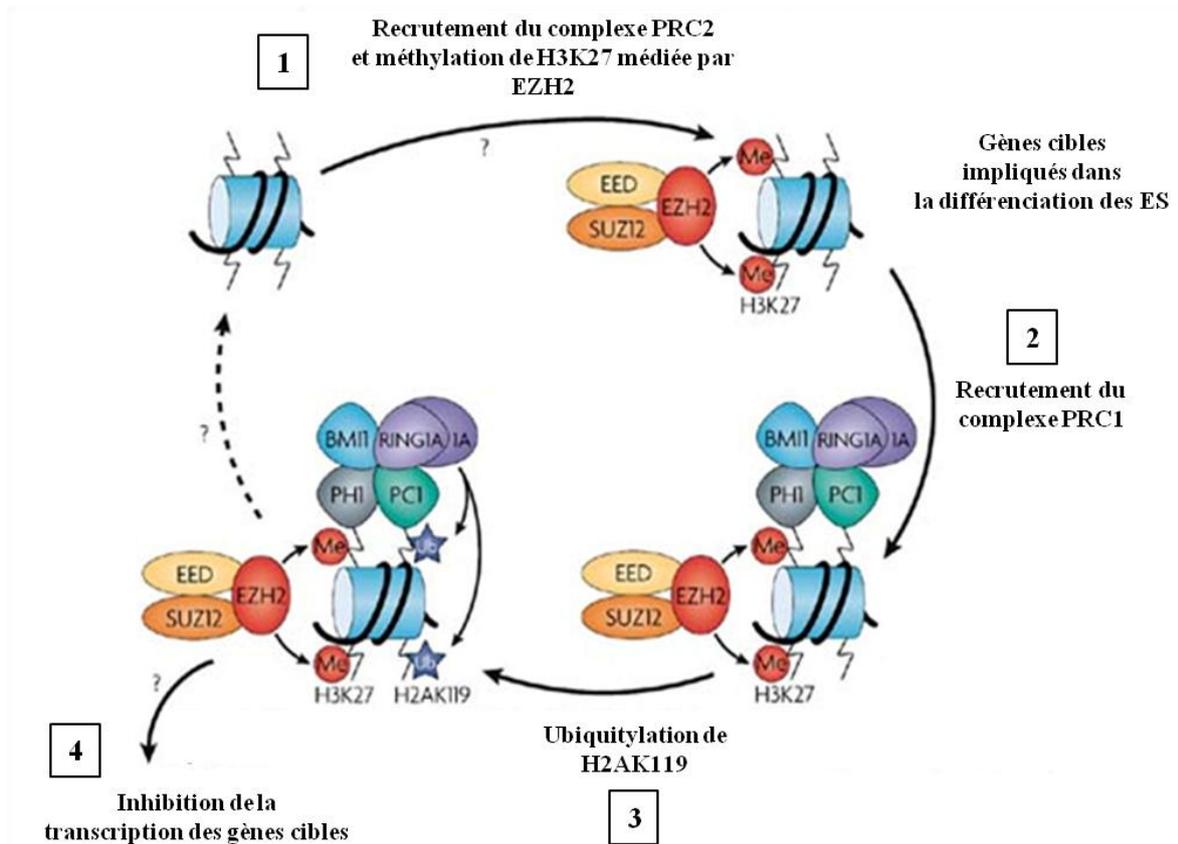


Figure 7 : Régulation de la transcription par les complexes Polycomb.

(D'après Spivakov, 2007).

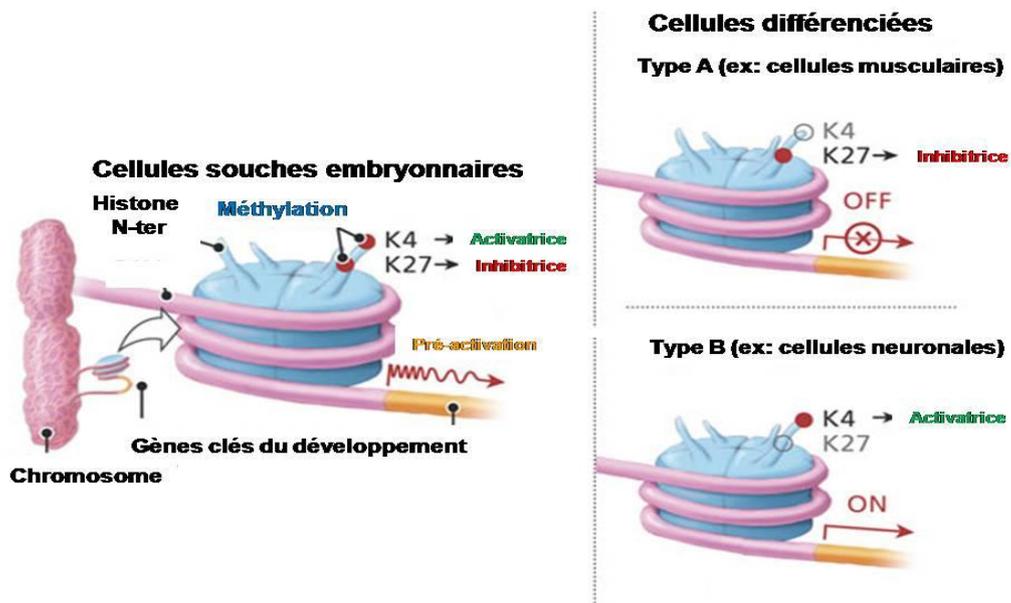


Figure 8 : Modifications bivalentes des lysines de l'histone H3 dans les cellules ES.

Le profil bivalent (activation et inhibition) évolue lors de la différenciation vers un état univalent (Activateur ou inhibiteur) selon le type cellulaire.

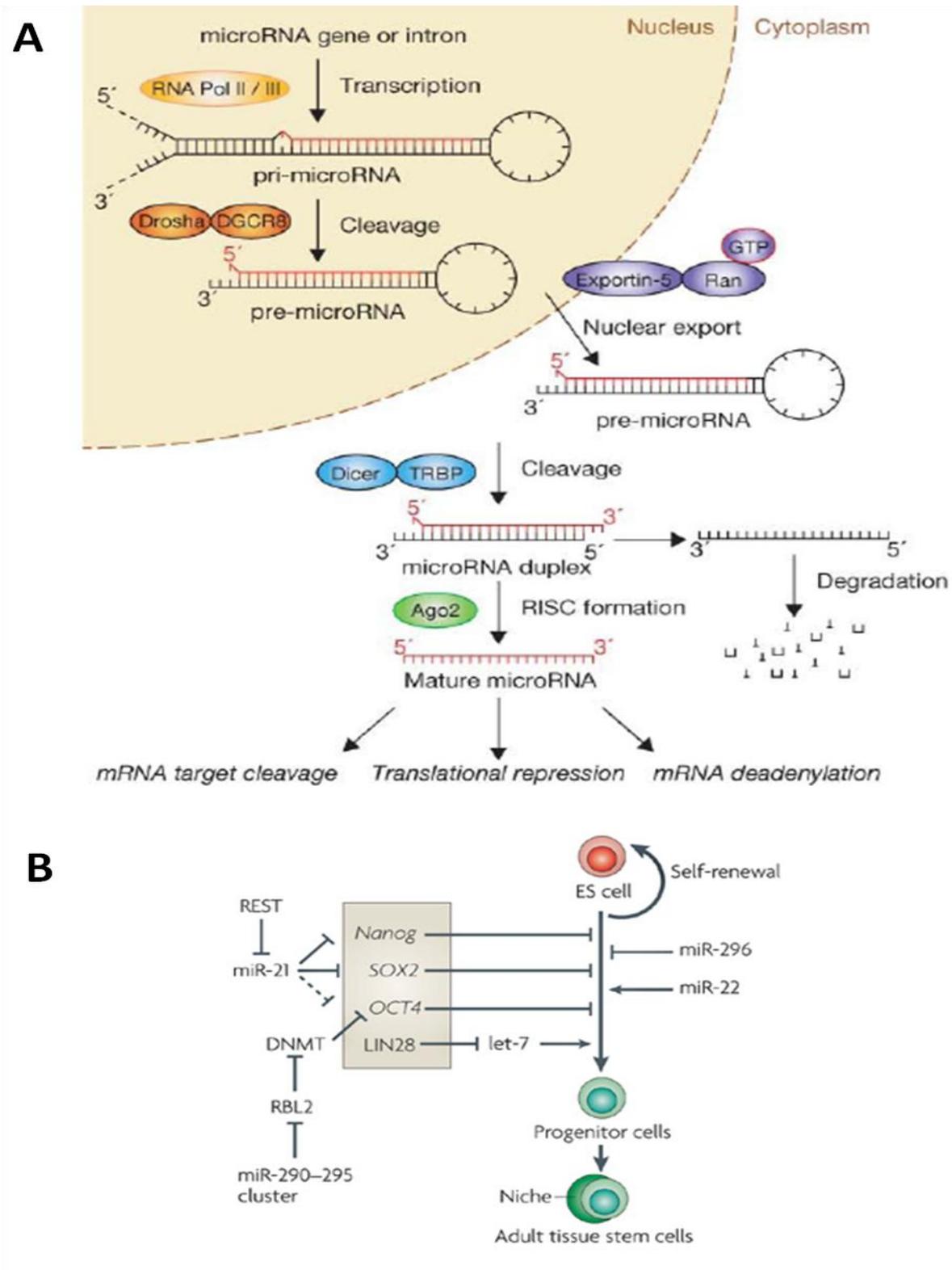
Dans un second temps, le complexe polycomb PRC1 est à son tour recruté. Il contient notamment la protéine BMI1 qui est également impliquée dans l'autorenouvellement des cellules souches adulte ainsi que les protéines RING1 et RING2 responsable de l'ubiquitilation de la lysine 119 de l'histone H2A. Ces deux complexes protéiques sont responsables de la répression transcriptionnelle mais on ignore encore quel est le mécanisme mis en jeu (Ku et al., 2008; Simon and Kingston 2009).

La régulation épigénétique des cellules ES par méthylation ou acétylation des histones présentent également une autre particularité. En effet, il a été récemment montré l'existence de modifications non conventionnelles des histones qui sont appelées modifications bivalentes (**Figure 8**). Elles sont caractérisées par l'association en même temps de marques activatrices (H3K9ac et H3K4me) et répressives (H3K27me) dans plusieurs gènes spécifiques de lignage (Bernstein et al., 2006). Ce procédé permet un état de « pré-activation » de ces gènes qui peuvent ainsi être rapidement induits dans un programme de différenciation. Celui-ci s'accompagne d'une transition d'un profil bivalent vers un profil univalent soit activateur soit répresseur en fonction des gènes et du type de cellules différenciées. Ce mécanisme de régulation épigénétique n'a été décrit que dans les cellules ES et semble ainsi spécifique de ce type de cellules.

#### 2.4.3. Régulations par les microARNs

Les microARNs apparaissent comme un nouveau groupe de régulateurs intervenant dans les cellules de mammifères pour réprimer l'expression génique au niveau post-traductionnel (Farh et al., 2005; Krek et al., 2005; Lewis et al., 2005; Lim et al., 2005; Siomi and Siomi) (**Figure 9A**).

Les microARNs sont produits à la suite d'une série d'étapes biochimiques. Tout d'abord, l'expression de certains gènes conduit à un transcrit primaire appelé pri-microARN. Puis, dans le compartiment nucléaire, ces transcrits primaires sont reconnus au niveau d'une structure de type « tige-boucle » par un complexe ribonucléique de clivage appelé Drosha. Le produit de ce clivage libère cette structure de ces séquences flanquantes pour former le pré-microARN. Ce dernier est exporté vers le cytoplasme par l'intermédiaire de la voie de l'exportine 5. Par la suite, ces précurseurs sont clivés par le complexe DICER afin de générer des duplex contenant généralement 22 nucléotides. Chacun des brins de ce duplex (le microARN mature) est ensuite incorporé dans un complexe appelé argonaute (Ago2) afin de former un complexe répresseur (RISC) lui conférant sa spécificité de reconnaissance pour des séquences d'ARN cibles.



**Figure 9 : Régulation de la pluripotence par les miRNAs.**

(A) Biogénèse et mécanisme d'action des microARNs. (D'après Winter J et al 2009). (B) Régulation des gènes de pluripotence par des miRNAs.

(D'après Gangaraju, 2005).

Lorsque le degré de complémentarité entre le microARN et sa cible est parfait, le complexe RISC aura pour fonction de dégrader l'ARNm. En revanche, lorsque la complémentarité n'est que partielle, ce complexe entraîne une déstabilisation de l'ARN, soit en agissant au niveau de la coiffe de l'ARNm en 5', soit par déadénylation de la queue polyA en 3' (Eulalio et al., 2009). Enfin, le complexe peut également inhiber la traduction en réprimant directement le ribosome (Eulalio et al., 2008; Eulalio et al., 2009). Les étapes de la biogénèse de ces microARNs sont encore peu connues mais semble fortement régulées. Leurs modulations impliqueraient des hélicases, la voie du TGFβ/BMP, la voie médiée par la protéine p53 et la voie des récepteurs aux œstrogènes (Newman and Hammond 2010).

Les microARNs participent à la régulation de nombreux processus cellulaires normaux ou pathologiques incluant la prolifération, la différenciation, la mort cellulaire et la formation de tumeur (Bushati and Cohen, 2007; Schickel et al., 2008). Leur implication dans le développement est maintenant acquis par différentes preuves : les souris déficientes pour DICER, une enzyme clé du processus médiée par les micro-ARNs ne se développent pas (Bernstein et al., 2003) et les lignées de ES correspondantes présentent des anomalies de prolifération et de différenciation (Kanellopoulou et al., 2005; Murchison et al., 2005)

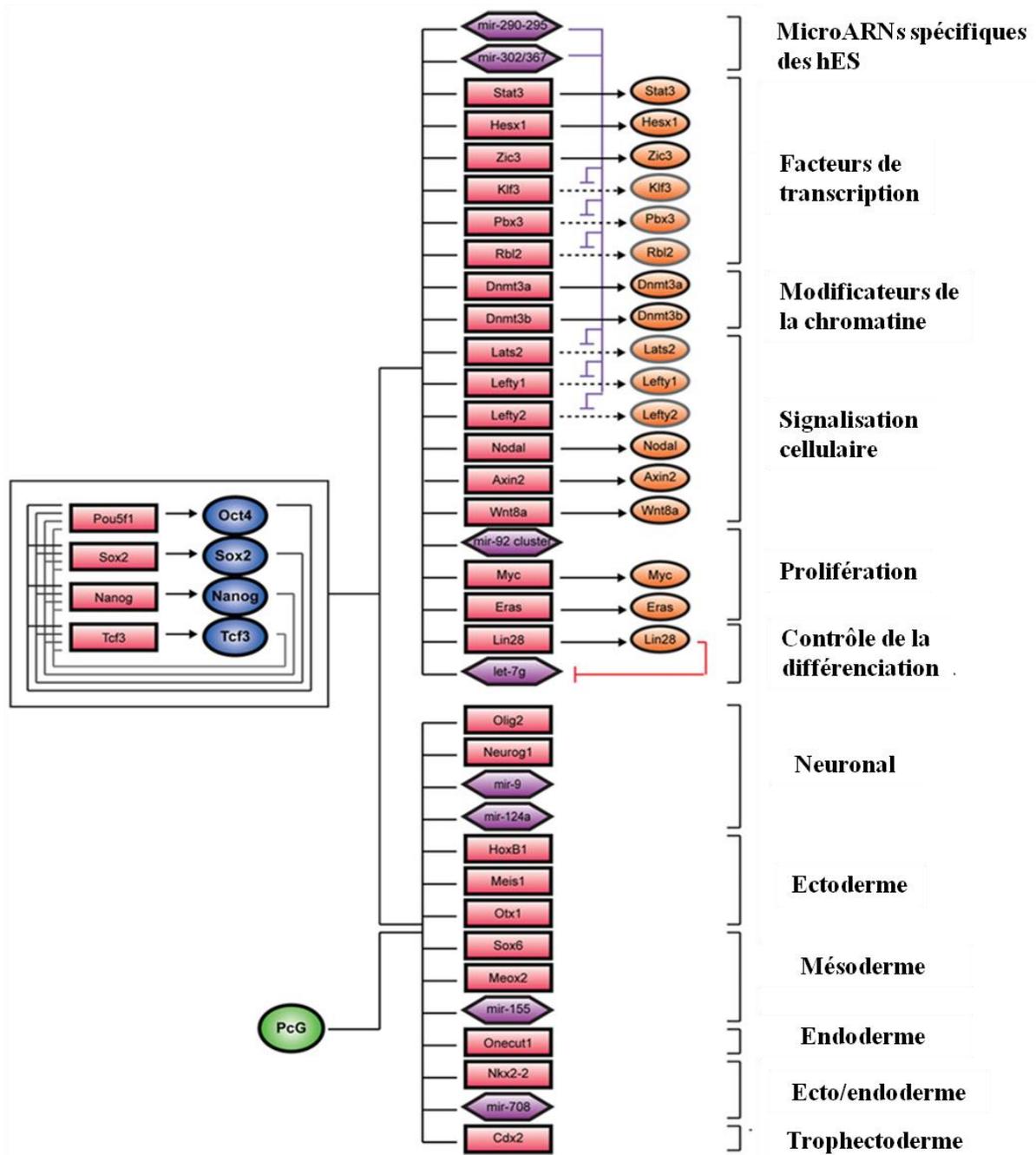
Certains microARNs (mir-290-295 et mir-302/367) ont été identifiés comme préférentiellement exprimés dans les cellules ES de souris (Houbaviy et al., 2003) et humaines (Houbaviy et al., 2005; Suh et al., 2004) suggérant leur implication dans le contrôle de leur identité (**Figure 9B**). En 2008, le groupe de Rudolf Jaenish a publié dans le journal Cell une mise à jour du circuit de régulation génique des cellules ES de souris en intégrant les microARNs (Marson et al., 2008) (**Figure 10**).

Les 3 protéines clés de la pluripotence, OCT4, NANOG et SOX2 ainsi que TCF3 sont retrouvées dans les promoteurs de microARNs spécifiques des cellules ES ainsi que dans des promoteurs de microARNs contrôlant la prolifération (miR92 et let7g) ou la différenciation spécifique de lignage (par exemple mir-9 ou mir-124a pour le lignage neural) (Krichevsky et al., 2006).

#### 2.4.4 Intervention des facteurs extrinsèques

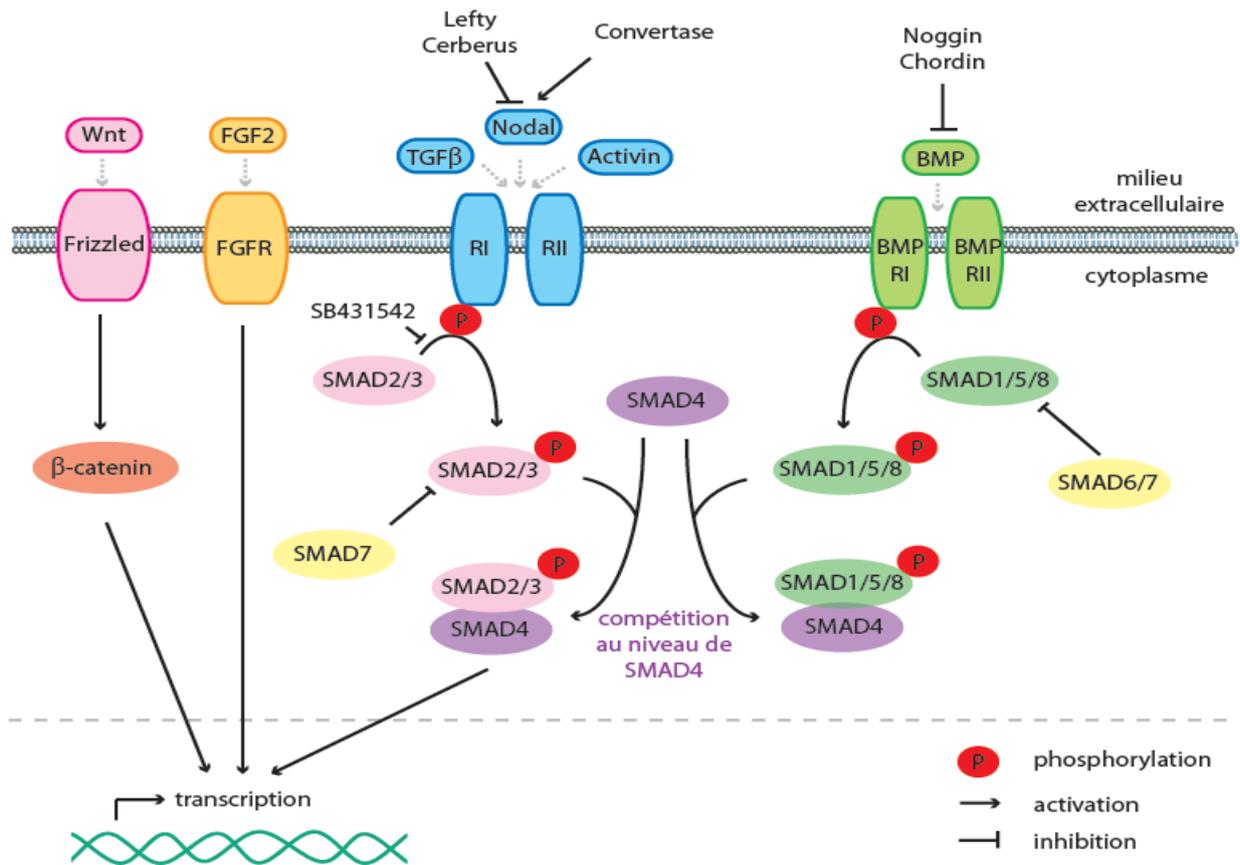
Les voies de signalisation cellulaire couplent les informations physico-chimiques à l'extérieur de la cellule avec les réseaux géniques et épigénétiques contrôlant l'état d'indifférenciation. Avant la dérivation des cellules hES, on considérait le LIF (Leukemia Inhibitory Factor) comme le facteur universel de pluripotence. Bien qu'il permette le maintien





**Figure 10 : Réseau de régulation multifactorielle actualisé du contrôle de l'identité des cellules hES.**

Les protéines codées par les gènes clés de pluripotence (rond bleu) constituent une boucle d'auto-régulation transcriptionnelle. Ces protéines se fixent sur les promoteurs de nombreux gènes (rectangle rose) et microARNs (losange violet) intervenant dans l'identité des cellules ES. Il peut alors y avoir une activation de l'expression (rond orange) ou une répression médiée par le recrutement de complexe protéique (rond vert) ; PcG : Polycomb (D'après Marson, Levine et al. 2008).



**Figure 11 : Principales voies de signalisation participant à l'identité des cellules hES.**

Les voies de signalisation induites par les composés de la famille du TGFβ, par le FGF2 ainsi que la voie de Wnt/β-caténine permettent de réguler la transcription de gènes impliqués dans l'auto-renouvellement et la pluripotence des cellules hES. Le TGFβ se lie aux récepteurs TGFβ RI/II. L'activine et Nodal se lient au récepteur de l'activin RI/II.

(Adapté de Stewart, Stojkovic et al. 2006.)

à l'état d'indifférencié des cellules ES de souris, aucun effet sur les hES n'a pu être mis en évidence (Okita and Yamanaka, 2006). Cette constatation implique que les informations contenues dans la très abondante littérature sur le sujet doivent nécessairement tenir compte de la source murine ou humaine des cellules ES. Toutefois, cela n'exclue pas l'existence de voies de signalisations communes mais il est nécessaire de savoir systématiquement si les connaissances de l'un des systèmes sont transposables à l'autre (Rao, 2004).

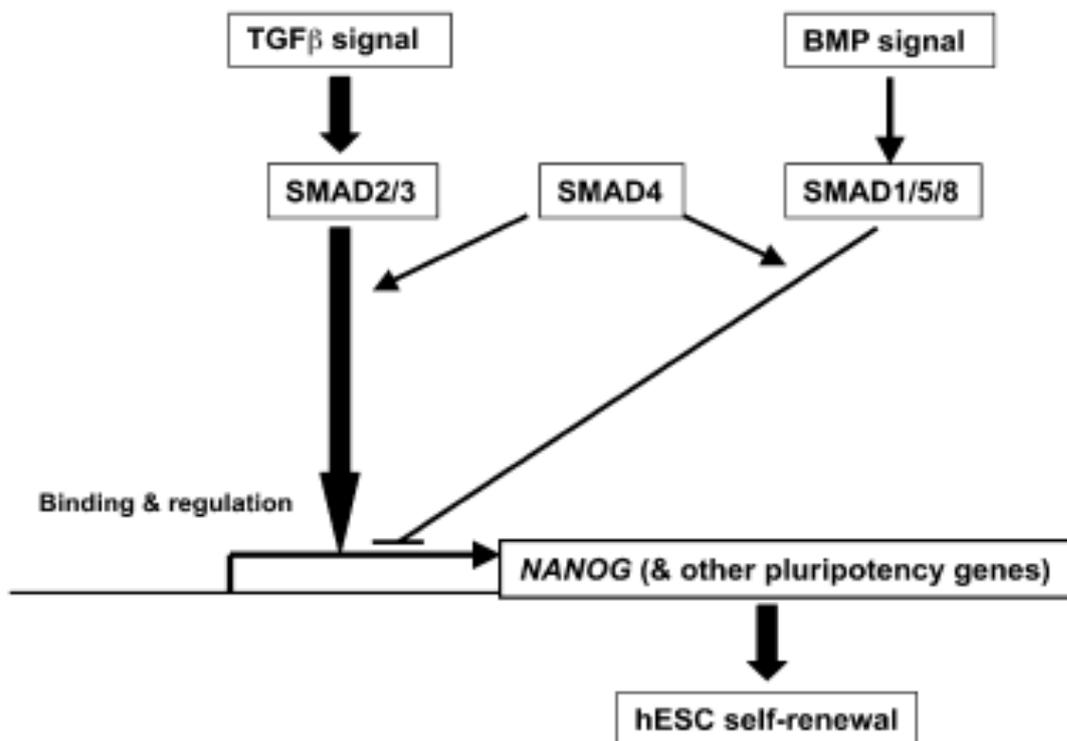
Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans les mécanismes régulant le maintien de l'identité des cellules hES que nous allons brièvement décrire (**Figure 11**).

- **la voie des récepteurs du TGF $\beta$  :**

Il s'agit de l'une des voies centrales régulant le maintien de l'état d'indifférenciation et d'auto-renouvellement des cellules hES (Valdimarsdottir and Mummery, 2005). Trois familles de facteurs de croissance polypeptidiques dimériques -les Activines, les protéines morphogéniques osseuses (les BMPs) et le facteur de croissance du TGF- $\beta$ - activent des récepteurs de type serine/threonine kinase. Leur stimulation entraînent la phosphorylation de facteurs de transcription mobiles, les smads, qui forment avec co-smad (smad4) un dimère pouvant se transloquer dans le noyau et s'associer à d'autres protéines afin d'activer ou d'inhiber certains gènes cibles. On distingue deux voies de signalisation. Celle qui agit par l'intermédiaire de la phosphorylation de Smad2/3 et qui dépend de l'activation de la voie par certains ligands comme TGF $\beta$ , l'Activine A ou Nodal et celle qui agit par l'intermédiaire de la phosphorylation de Smad1/5/8 qui dépend des BMPs.

- **la voie régulée par l'Activine A :**

La présence d'Activine A dans la culture des cellules hES suffit à les maintenir à l'état indifférencié soulignant l'importance de cette voie (Vallier et al., 2005). Ce rôle central peut être expliqué par le fait que cette protéine influe sur l'expression de tous les facteurs d'auto-renouvellement comme les gènes *OCT4* et *NANOG* ainsi que sur l'activation d'autres voies de signalisation comme Wnt, FGF et Nodal (Xiao et al., 2006). Cependant, il a aussi été montré que l'Activine A induisait la différenciation notamment vers l'endoderme mais cela ne semble se produire que si une autre voie, la voie PI3K (Phosphatidyl-inositol 3kinase), est inhibée (McLean et al., 2007). Plus récemment, des connections entre la voie de l'activine A et des microARNs ont été identifiées dans les cellules hES (Tsai et al. 2010).



**Figure 12 : Signalisation régulant les gènes de pluripotence.**

La voie des TGFβ régule directement les gènes de pluripotence par l'intermédiaire de la voie des SMAD2/3 alors que la voie des BMP contribue à la différenciation en inhibant les gènes de pluripotence par l'intermédiaire de la voie des SMAD1/5/6.

- **la voie régulée par Nodal :**

La voie activée par Nodal semble également intervenir dans le maintien des cellules hES à l'état indifférencié. En effet, l'inhibition de cette voie par son inhibiteur physiologique Lefty, ou par de petites molécules comme le SB431542, entraîne une différenciation vers le lignage neur ectodermique (Chambers et al., 2009; Patani et al., 2009; Smith et al., 2008).

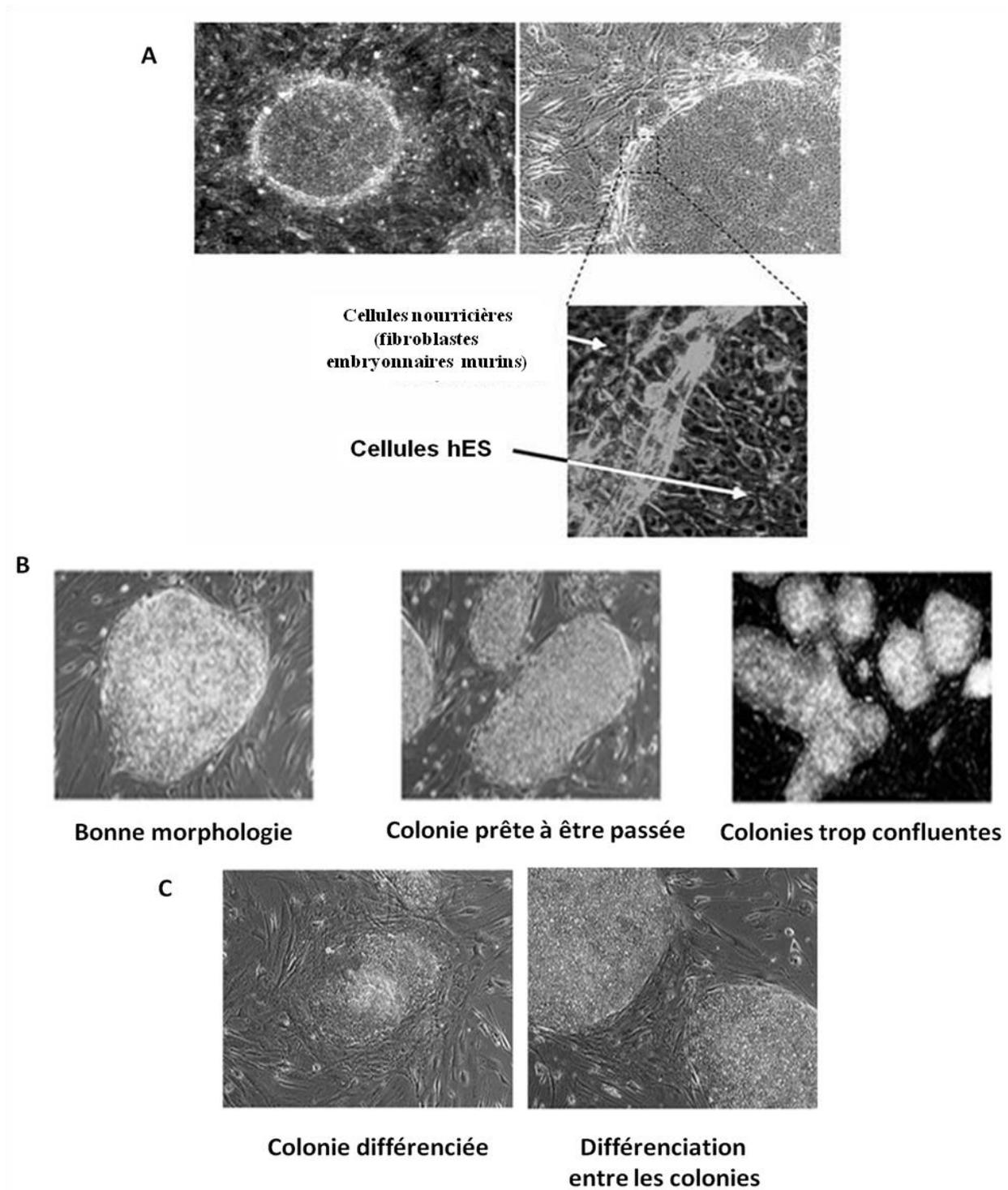
- **la voie régulée par les BMPs :**

Plusieurs ligands appartenant à la famille des BMPs sont sécrétés par les cellules ES elles-mêmes et semblent être impliqués dans leur différenciation précoce ainsi que dans la sélection du choix des lignages. Par exemple, le BMP2 est un puissant inducteur cardiogénique (Leschik et al., 2008) et le BMP4, un inducteur des cellules de l'ectoderme (Guenou et al., 2009). L'inhibition de ces voies peut donc contribuer au maintien de l'état d'indifférenciation. Paradoxalement, la voie des BMPs est impliquée dans l'auto-renouvellement des cellules ES de souris en agissant simultanément avec la voie Jak/Stat dépendante du LIF et d'autres voies de signalisation telles que Wnt et PI3K (Lee et al., 2009b).

En résumé, l'ensemble de ces études montre que les voies du TGF- $\beta$ , de l'Activine et de Nodal participent à l'identité des cellules ES en favorisant l'auto-renouvellement alors que la voie des BMPs induit la différenciation spontanée des hES. Ces deux systèmes contribuent à la régulation de nombreux gènes clés de la pluripotence comme *NANOG* par exemple (**Figure 12**). Une étude très récente réalisée par l'équipe anglaise de Peter Andrews à l'université de Sheffield en Angleterre précise ce mécanisme en montrant que l'extinction de co-smad (smad4) qui est commun aux différentes voies décrites plus haut, n'empêchait pas le maintien de l'auto-renouvellement mais rendait les cellules insensibles au traitement par le BMP. De plus, l'inhibition continue de smad4 rend les cellules instables et plus permissives à l'induction neurale. Cette étude semble donc indiquer que les voies de signalisation médiées par les smads soutient la pluripotence en empêchant la différenciation dépendante du BMP plutôt que leur implication directe dans la régulation de la pluripotence (Avery et al. 2010).

- **la voie régulée par le FGF2 :**

Le facteur de croissance fibroblastique basique (bFGF ou FGF2) est utilisé quotidiennement au laboratoire pour soutenir l'auto-renouvellement des cellules hES (Ding et al., 2006; Wang et al., 2005; Xu et al., 2001; Xu et al., 2005). Il agirait en aval de l'Activine A



**Figure 13 : Aspect morphologique des colonies de cellules hES cultivées en co-culture avec des cellules nourricières de souris.**

(A) Co-culture entre les cellules hES et les cellules nourricières de souris. (B) Examen de la croissance des colonies de hES. (C) Aspect morphologique de colonies en cours de différenciation.

(D'après Culture and maintenance of human embryonic stem cells, <http://www.jove.com>).

en stimulant la voie MEK-ERK et se comporterait comme un facteur de compétence pour Nodal (Greber, 2007; Vallier, 2005 ; Li et al., 2007). Par ailleurs, il est surprenant de constater que l'utilisation de FGF2 sur une culture de cellules ES de souris conduit au résultat inverse en induisant leur différenciation par inactivation du facteur de transcription Stat3 qui contrôle l'autorenouvellement de ces cellules par l'intermédiaire de la voie du LIF.

- **la voie canonique des Wnt :**

La voie canonique Wnt (du nom du gène de la drosophile *wingless*) est une voie de signalisation cellulaire qui régule la clairance d'une protéine cytoplasmique : la  $\beta$ -caténine. La voie intervient dans la cellule par l'intermédiaire de ligands qui reconnaissent la famille des récepteurs Frizzled. Leur activation entraîne une cascade conduisant à l'inhibition de la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine dépendante de la GSK3 (glycogène synthase kinase) ce qui empêche sa dégradation. La  $\beta$ -caténine commence alors à s'accumuler et entre dans le noyau où elle joue un rôle de régulation génique activateur ou répresseur en fonction de ses partenaires. L'inhibition pharmacologique de la GSK3 par des molécules synthétiques comme la 6 bromo-indirubine 3'oxime (BIO) active la voie Wnt en augmentant la quantité de  $\beta$ -caténine nucléaire permettant le maintien de l'expression du gène *OCT4* (Sato et al., 2004).

## **2.5 Manipulation *in vitro* des cellules hES**

### 2.5.1 Morphologie

Sur les bases des connaissances que nous avons résumées dans le chapitre précédent, il est possible de maintenir en culture au laboratoire les cellules hES à l'état indifférencié. Ces dernières sont rondes et de petites tailles (2-3 $\mu$ m) et présentent un rapport nucléocytoplasmique élevé. Elles prolifèrent sous la forme de colonies circulaires compactes d'aspect caractéristique et sont généralement cultivées avec des cellules nourricières (voir paragraphe suivant en 2.5.2) (**Figure 13A**). L'observation journalière de ces cellules à l'aide d'une loupe à contraste de phase ou d'un microscope à faible grossissement permet de suivre la croissance des colonies (**Figure 13B**) et de repérer une différenciation spontanée (**Figure 13C**).



### 2.5.2 Maintien expérimental de l'état d'indifférenciation en culture

Dans la plupart des laboratoires, les cellules hES sont co-cultivées avec des lignées primaires ou immortalisées de cellules fibroblastiques murines (respectivement MEF ou STO) dont la prolifération est stoppée par l'utilisation de mitomycine C ou par irradiation. Ces lignées sécrètent des facteurs qui soutiennent l'état d'indifférenciation des hES en agissant par des effets paracrines (Park et al., 2003; Thomson et al., 1998). Une alternative d'efficacité comparable consiste à cultiver les hES en présence de milieu conditionné par ces mêmes cellules nourricières (Xu et al., 2001). Par ailleurs, l'utilisation de matrices moléculaires artificielles telles que le matrigel, la laminine, la fibronectine ou des cocktails de protéines recombinantes permettent dans certains cas de s'affranchir de l'utilisation de cellules nourricières démontrant l'importance des interactions physiques matrice-cellules.

Les conditions de culture nécessitent également l'utilisation de sérum de veau foetal riche en facteurs de croissance (Reubinoff et al., 2001; Thomson et al., 1998), contrairement au sérum d'origine humaine qui semble avoir une efficacité plus faible (Rajala et al., 2007; Richards et al., 2002).

L'objectif technologique actuel est le développement de conditions de culture entièrement définies exemptes de contaminants d'origine animale, notamment pour le développement d'applications de grade clinique (détaillé plus loin dans le chapitre II.1 sur la thérapie cellulaire). Des sérums de remplacement (KSR), dont la composition est définie, ont été développés afin de remplacer le sérum de veau foetal mais ils ne sont pas totalement exempts de produits d'origine animale puisqu'ils contiennent de l'albumine et de la transferrine bovine. (Amit et al., 2000; Koivisto et al., 2004; Stojkovic et al., 2005; Strelchenko et al., 2004). Toujours avec ce même objectif, certains auteurs ont tenté de remplacer les cellules nourricières de souris par des cellules fœtales ou adultes d'origines humaines (Stacey et al., 2006). Par exemple, des fibroblastes provenant de prépuce (cellules « foreskin ») ou des fibroblastes embryonnaires obtenus par différenciation des cellules hES elles-mêmes permettent d'établir un système de culture autogénique (Mallon et al., 2006; Stojkovic et al., 2005). Malgré ces améliorations technologiques, l'efficacité des différentes lignées nourricières à maintenir l'état d'indifférenciation est variable et dépend principalement de l'effet paracrine des molécules qu'elles sécrètent (Eiselleova et al., 2008).

Des analyses protéomiques des différents secrétomes de lignées de cellules nourricières ont permis d'identifier des facteurs efficaces sur la maintenance de l'identité des cellules hES.

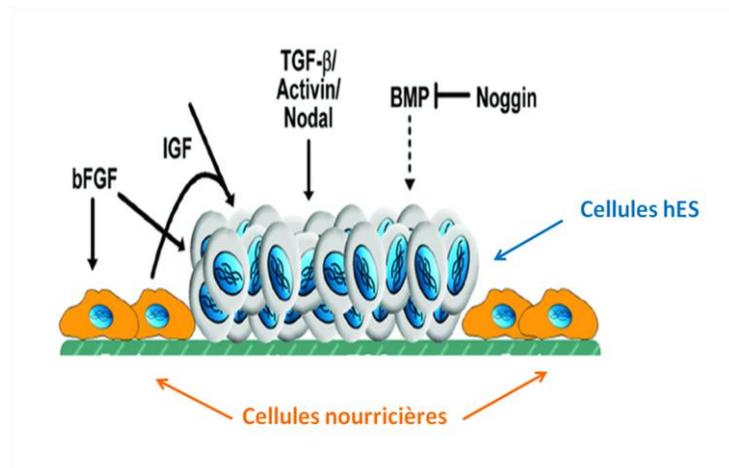


Figure 14 : Résumé des facteurs permettant le maintien des hES à l'état indifférencié en culture.

	Transfert mécanique	Transfert enzymatique
<b>Avantages</b>	Idéal pour le maintien des cellules hES	Utile pour les applications nécessitant beaucoup de cellules
	Transfert sélectif des cellules hES indifférenciées (au centre de la colonie; les cellules à la périphérie ayant tendance à se différencier)	Plus rapide et plus facile que le transfert mécanique
<b>Inconvénients</b>	Laborieux et chronophage	Moins homogène ; colonies de formes et de tailles variables ; présence de mélanges cellulaires entre cellules hES+cellules en cours de différenciation + présence de cellules nourricières.
	Difficulté à traiter beaucoup de cellules simultanément	Probabilité augmentée d'anomalies chromosomiques (voir chapitre 2.5.5.)

Tableau 1 : Comparatif des avantages et inconvénients des deux méthodes utilisées pour le passage des cellules hES.

Parmi ces facteurs, le FGF2 à fortes concentrations combiné avec de l'Activine A ou Nodal suffisent à cultiver les cellules hES en l'absence de cellules nourricières ou de milieu conditionné (Levenstein et al., 2006). D'autres molécules ont été utilisées dans les milieux de cultures définis par exemple le facteur de croissance de l'insuline (IGF-1) ou des inhibiteurs de la voie BMP, comme la protéine Noggin, qui préviennent la différenciation spontanée des cellules hES (**Figure 14**).

#### 2.5.3 Passage des cellules

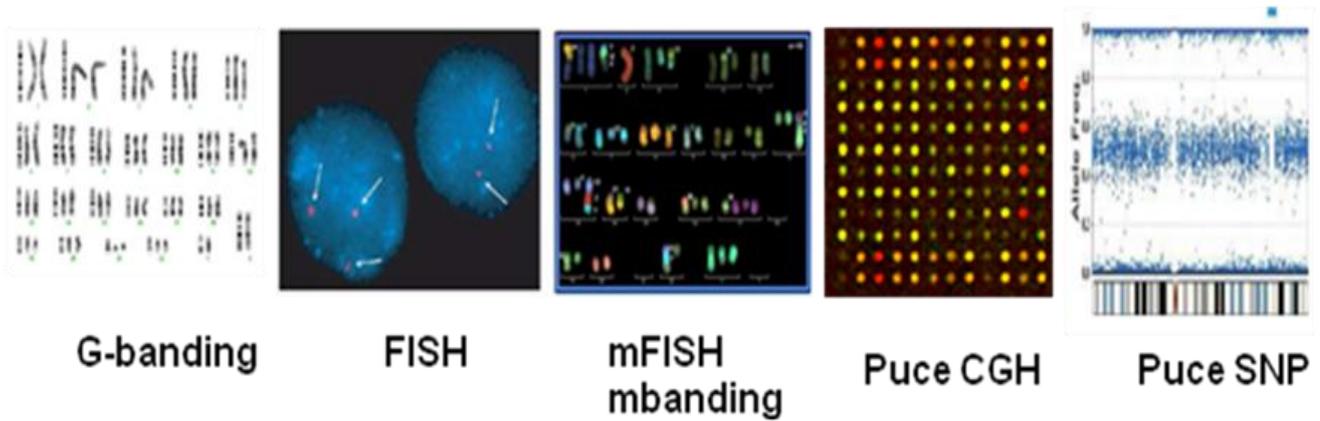
Il existe schématiquement deux méthodes pour passer les cellules hES : la dissociation mécanique utilisant un quadrillage réalisé avec l'aide d'une aiguille sous le contrôle d'une loupe binoculaire et la dissociation enzymatique par l'utilisation de trypsine, collagénase ou dispase. Chaque méthode présente des avantages et des inconvénients (**Tableau 1**).

#### 2.5.4 Marqueurs phénotypiques

Contrairement aux cellules souches adultes, les cellules hES maintenues à l'état indifférencié expriment les marqueurs spécifiques de pluripotence tels que les 3 facteurs de transcription clés *NANOG*, *OCT4* et *SOX2*. D'autres gènes sont aussi fréquemment utilisés pour estimer l'état d'indifférenciation des cellules dont *LEFTY*, *CRYPTO* ou *REX-1*. En plus de ces marqueurs nucléaires, un certain nombre de marqueurs membranaires de nature glucidique ont été identifiés tels que SSEA3, SSEA4, Tra-1-60 et Tra-1-81. A l'inverse, le suivi de l'expression de gènes précoces spécifiques d'un lignage donné permet d'apprécier, en cas de levée de l'état d'indifférenciation, le type de différenciation dans lequel les cellules hES se sont engagées.

#### 2.5.5 Recherche d'anomalies caryotypiques ou génomiques

La stabilité génomique est l'une des caractéristiques des cellules hES cependant certaines conditions de culture semblent générer des anomalies chromosomiques. Par exemple, les cultures sans cellules nourricières ou encore l'utilisation de trypsine favoriseraient des aneuploïdies comme les trisomies 12 ou 17 (Brimble et al., 2004; Hoffman and Carpenter, 2005; Lefort et al., 2009). La dissociation mécanique pourrait également entraîner des défauts mais plus focalisés (Lefort et al., 2008). Enfin les méthodes de congélation classiques utilisant le DMSO (*diméthylsulfoxyde*) en tant que cryopréservateur, sont connues pour affecter le profil épigénétique des cellules. De plus, la production de radicaux libres qui a lieu lors de tels cycles pourrait affecter la réplication de l'ADN ainsi que la structure des chromosomes. Ces



**Figure 15 : Méthodes utilisées pour le suivi de la stabilité caryotypique des lignées hES.**

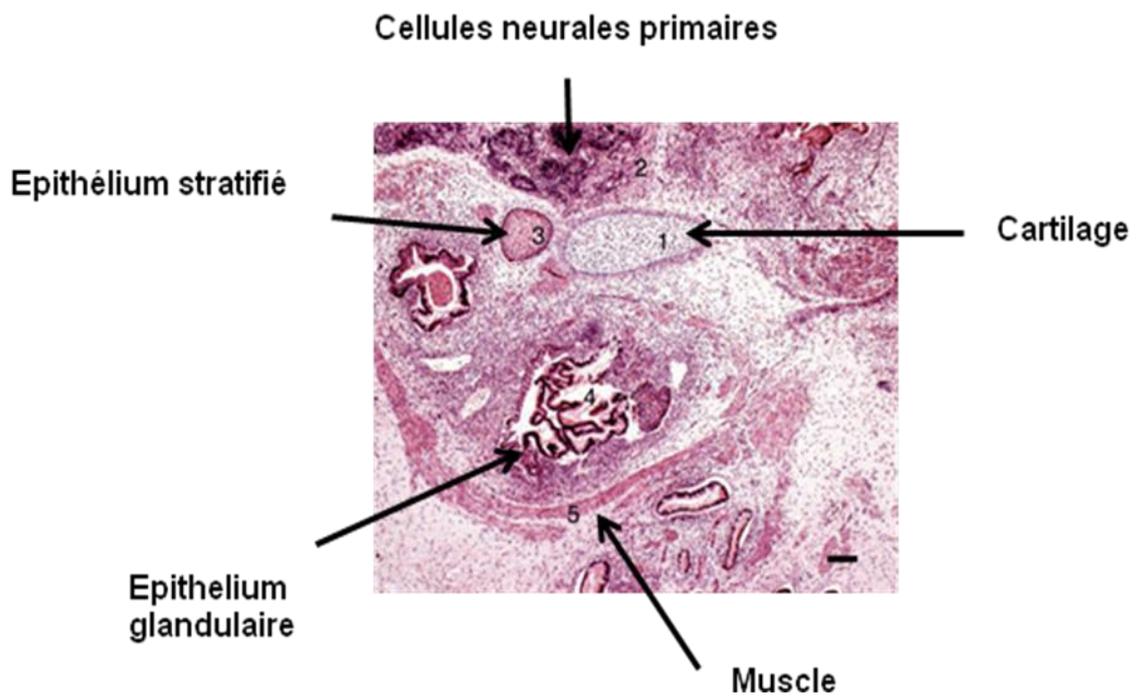
Ces méthodes ont des résolutions différentes : de 5 à 10 mégabases (Mb) pour le G-Banding, de l'ordre de 1,5 Mb pour le mFISH, à moins de 0,5 Mb pour le FISH et le CGH array. La méthode des puces à polymorphisme SNP est la plus résolutive, de l'ordre de quelques kilobases.

changements pourraient conférer des avantages en termes de prolifération ou de survie pour certains clones entraînant une hétérogénéité intrinsèque dans les cultures. Aussi, il est nécessaire de contrôler régulièrement la stabilité génomique des cellules hES en effectuant au minimum des caryotypes classiques (bande-G) permettant d'apprécier les anomalies chromosomiques. Il existe d'autres méthodes de cytogénétique (FISH, mFISH) ou de biologie moléculaire (puce CGH ou à SNP) permettant de rechercher certaines anomalies, soit sans avoir d'*a priori*, soit en recherchant une modification bien précise (**Figure 15**).

#### 2.5.6 Activité télomérasique

Les télomères sont des séquences d'ADN répétées en tandem du motif hexanucléotidique TTAGGG qui protègent et stabilisent l'extrémité des chromosomes eucaryotes (Blackburn, 1991). Les quelques 200 nucléotides de leur extrémité 3' sont constitués d'ADN simple brin (de Lange, 2002) et ne peuvent pas être répliqués par l'ADN polymérase au cours de la phase S de la mitose conduisant à leurs raccourcissements à chaque division. Trois biologistes américains, Carol Greider, Jack Szostak et Elizabeth Blackburn ont reçu le prix Nobel de médecine en 2009 pour avoir démontré que ce mécanisme était associé au vieillissement cellulaire (ou sénescence) (Yang et al. 2010). En effet, lorsque les télomères deviennent trop courts, les cellules perdent leurs capacités de se diviser. Dans la plupart des cellules somatiques, ce nombre de divisions est de l'ordre de 50, un seuil connue sous le nom de limite de Hayflick (Hayflick and Moorhead, 1961). En revanche, dans les cellules souches qui ont la propriété de se diviser un très grand nombre de fois, la diminution de la longueur de télomère est compensée par un complexe ribonucléoprotéique dont l'activité enzymatique est portée par la télomérase constituée de deux sous-unités essentielles : la TERT (*telomerase reverse transcriptase*) et la TR (*telomerase RNA*) qui apporte la matrice d'ARN nécessaire pour générer de nouveaux motifs TTAGGG (Weinrich et al., 1997).

Les hES présentent une expression particulièrement élevée de la TERT associée à une forte activité télomérasique (Thomson et al., 1998) permettant le maintien de la longueur de leurs télomères (Carpenter et al., 2004; Rosler et al., 2004). En revanche, lorsque les cellules entrent en différenciation, elles perdent cette propriété (Armstrong et al., 2000). Ces données montrent que l'activité télomérasique est nécessaire aux cellules ES et représente un bon marqueur de l'état indifférencié.



**Figure 16 : Micrographie d'une section histologique d'un tératome coloré par l'hématoxyline et l'éosine résultant de l'injection des cellules hES à des souris immunodéprimées.**

(Adapté de Pera and Trouson, 2004.).

### 2.5.7. Démonstration du caractère pluripotent

La propriété de pluripotence des cellules hES est généralement testée *in vivo* par injection dans la capsule testiculaire de souris immunodéficientes de type « nude ou scid ». Ces souris développent alors -si les cellules injectées sont pluripotentes- des tératomes caractérisés par la présence d'un mélange de tissus provenant d'au moins 2 des 3 feuillets embryonnaires (**Figure 16**).

Le caractère pluripotent peut également être mis en évidence *in vitro*. La différenciation spontanée des hES conduit alors à la formation de corps embryoides constitués de différents types cellulaires appartenant aux 3 feuillets embryonnaires comme cela est décrit ci-dessous (Heins et al., 2004).

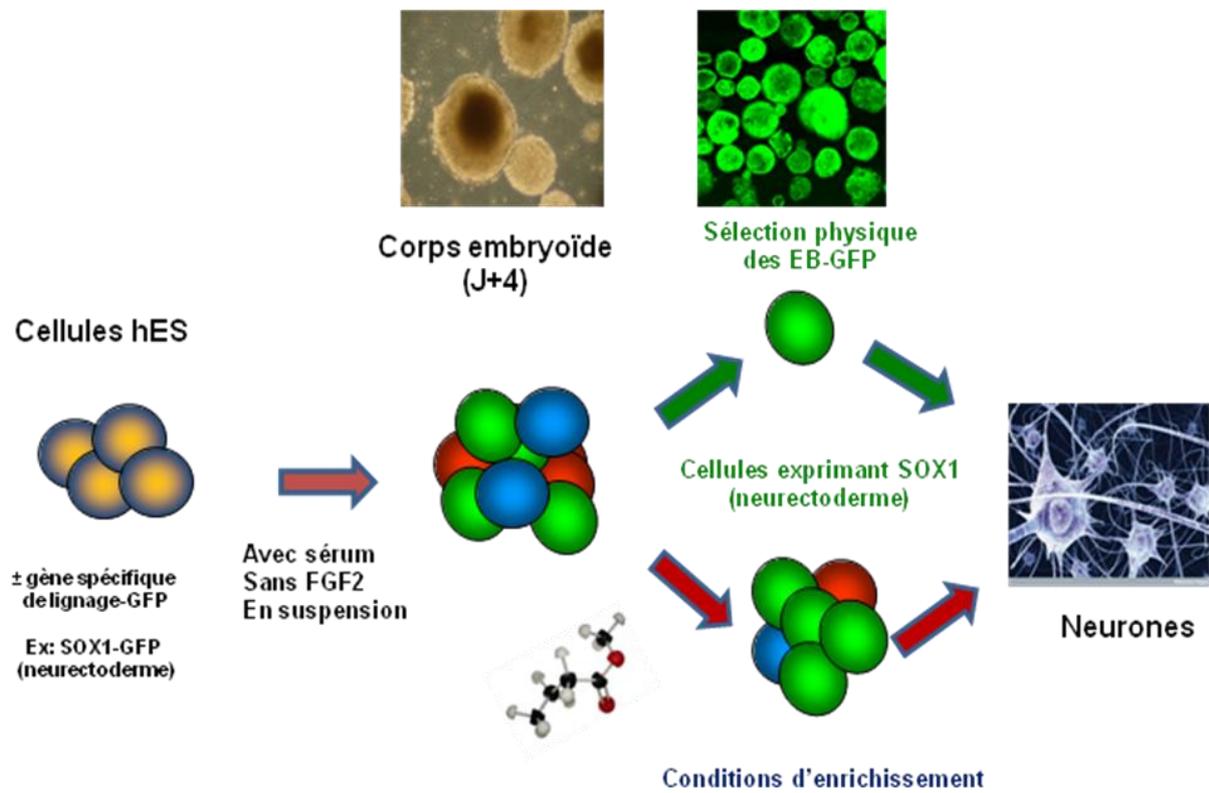
## 2.6 Différenciation des cellules ES

Comme cela a été évoqué au début de ce chapitre, les cellules ES de part leurs propriétés de pluripotence sont capables de se différencier vers l'ensemble des types cellulaires de l'organisme. Il existe plusieurs stratégies expérimentales pour contrôler le choix du lignage des hES vers un phénotype donné :

- **la différenciation spontanée** : elle permet d'obtenir des structures tridimensionnelles, les corps embryoides, composée de nombreuses cellules de phénotypes différents. Il est ensuite possible d'effectuer une étape de sélection pour isoler des populations cellulaires particulières.
- **la différenciation guidée** : elle consiste à favoriser un lignage spécifique soit par l'utilisation de l'effet inducteur de certaines lignées stromales utilisés en co-culture, soit grâce à l'utilisation de petites molécules ou de protéines morphogéniques recombinantes modulant les voies de signalisation intervenant dans la différenciation.

### 2.6.1 Différenciation spontanée et formation de corps embryoides

Les cellules ES, lorsqu'elles sont mises en suspension dans un milieu contenant du sérum mais sans la présence des signaux permettant leur maintien à l'état indifférencié, se différencient spontanément en 3-4 jours en formant des agrégats de cellules que l'on appelle corps embryoides (EBs, embryoid bodies). Il existe au moins 3 méthodes principales pour les obtenir : la culture en suspension statique, la méthode de la goutte suspendue et la culture en système hydrodynamique, chacune de ces méthodes présentant ses avantages et ses inconvénients (Bratt-Leal, Carpenedo et al. 2009). Lors de la formation des EB, les cellules



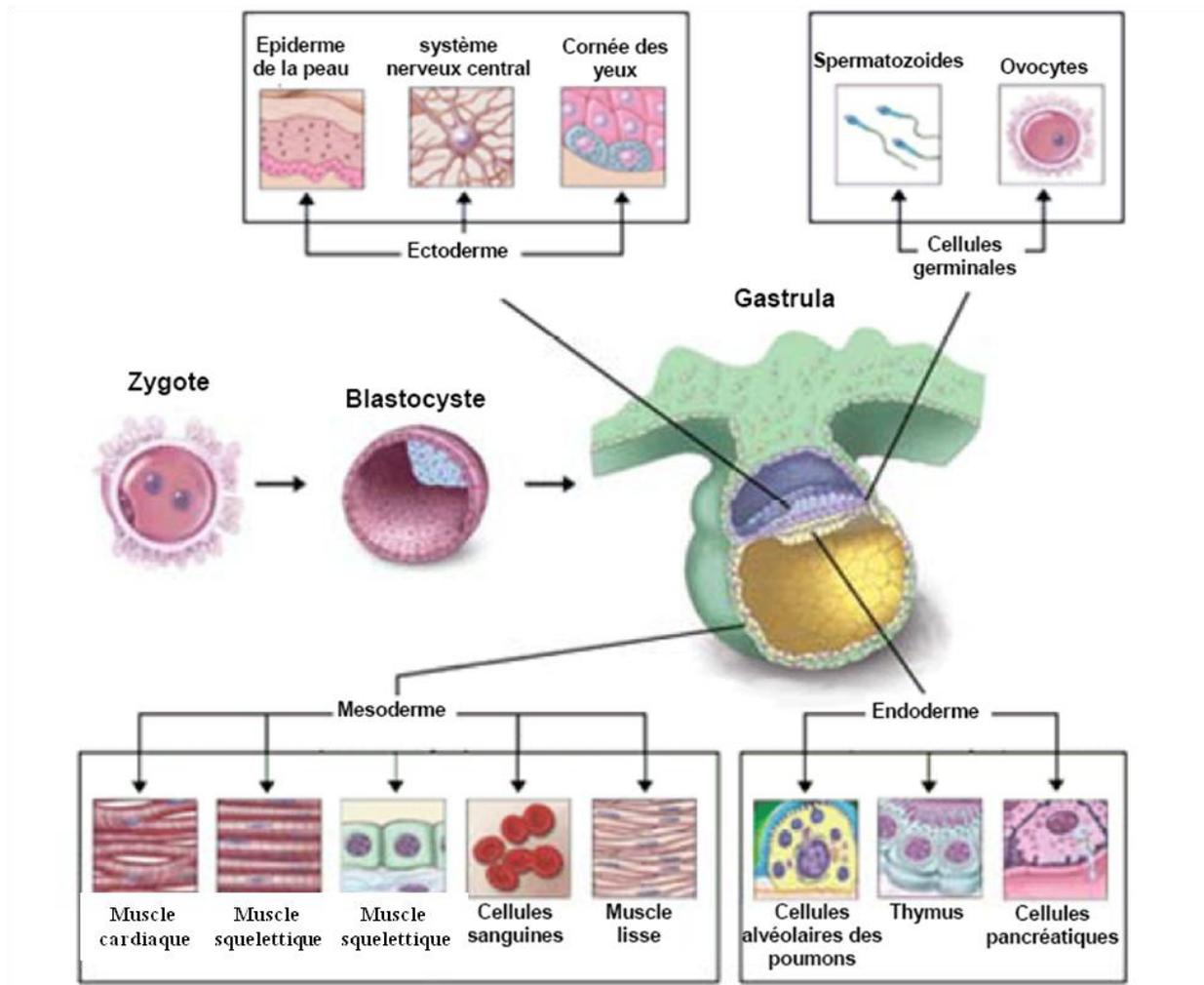
**Figure 17 : Exemples de stratégies de différenciation basée sur l'utilisation des corps embryoïdes.**

Les cellules hES forment des corps embryoïdes après 4 jours de différenciation. Les boules rouges, vertes et bleues correspondent à des cellules originaires d'un feuillet embryonnaire différent.

hES s'agrègent entre elles puis elles se différencient spontanément pour former une couche épithéliale d'endoderme primitif à sa surface extérieure (Maurer et al., 2008). Cet épithélium forme une lame basale qui sépare l'écorce endodermique du reste de la structure (Li et al., 2001). Au fur et à mesure que l'EB se développe, de nombreuses cellules de phénotypes variés originaires des 3 feuillets embryonnaires apparaissent. Par exemple, la différenciation hématopoïétique est matérialisée par l'apparition de structure ressemblant aux îlots sanguins de la membrane vitelline. La différenciation vers les cardiomyocytes est aisément observable puisque des groupes de cellules se mettent à se contracter spontanément (on parle alors de EB « battants »). Enfin, si l'on place ces EB sur un substrat adhérent, des projections neuritiques apparaissent témoignant d'une différenciation neuronale et des cellules endothéliales, fibroblastiques ou d'autres phénotypes cellulaires peuvent être identifiés. Les mécanismes qui gouvernent la différenciation en EB sont complexes et sont globalement inconnus. Ils aboutissent à un amas très hétérogène de cellules.

Pour pouvoir isoler une population d'intérêt, il va falloir utiliser une méthode de purification basée sur une sélection génique, sur des propriétés physiques, sur l'effet inducteur chimique de milieux spécifiques ou encore des petites molécules (**Figure 17**).

Le principe de la sélection génique consiste à générer des cellules ES avec une construction contenant un promoteur spécifique de lignage sous le contrôle d'un gène rapporteur. A titre d'exemple, l'obtention de cellules hES exprimant la construction SOX1-GFP va permettre de sélectionner des précurseurs neuraux SOX1 positifs à partir des EB par tri cellulaire sur l'expression de la GFP (Chung et al., 2006). Une variante de cette technique consiste à modifier les cellules ES avec des promoteurs spécifiques de lignage contrôlant des gènes toxiques permettant l'enrichissement des cultures par sélection négative des lignages indésirables. La sélection physique est basée sur l'expression de protéines de surface qui permettent de trier positivement ou négativement des populations cellulaires par FACS. Enfin, il est possible, par sélection chimique, d'enrichir des populations particulières à l'aide de petites molécules. Par exemple, le traitement des EB avec de l'acide rétinoïque permet l'enrichissement des populations cellulaires en neurones (Carpenter et al., 2001).



**Figure 18 : Ontogénèse embryonnaire et potentialités de différenciation de la MCI.**

Au cours de l'embryogénèse, le blastocyste évolue vers la gastrula qui représente un stade comprenant 3 feuilletts embryonnaires, l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme ainsi que les cellules de la lignée germinale

## 2.6.2 Différenciation guidée

La différenciation guidée consiste à diriger expérimentalement les hES vers un phénotype cellulaire d'intérêt. Son principe est basé sur la notion que ces cellules se différencient *in vitro* en suivant l'ontogénèse embryonnaire (**Figure 18**).

Ainsi pour diriger la différenciation des cellules hES vers l'un des types cellulaires, il faut d'abord pouvoir les induire spécifiquement vers l'un des trois feuilletts embryonnaires :

- **l'ectoderme** : il donnera l'épiderme, le système nerveux et les dérivés des crêtes neurales à l'origine de nombreux lignages dont le système nerveux périphérique, les mélanocytes, les cellules chromaffines de la médullo-surrénale.
- **le mésoderme** : il donnera tout ce qui se trouve entre l'épiderme et l'épithélium du tube digestif, c'est-à-dire le tissu conjonctif (ou du moins sa majeure partie), l'appareil locomoteur (muscle, squelette), l'appareil cardio-vasculaire (cœur, vaisseaux et sang), l'appareil uro-génital.
- **l'endoderme** : il donnera l'épithélium du tube digestif, l'arbre trachéo-broncho-pulmonaire ainsi que les glandes annexes du tube digestif (foie, pancréas) et la thyroïde.

Dans cette partie, les différents protocoles de différenciation guidée seront présentés selon cette hiérarchie embryonnaire, en faisant dans chaque cas un bref rappel du développement et des signaux morphogéniques connus *in vivo*.

### ***2.6.2.1 Différenciation vers le lignage ectodermique***

Dans l'embryon humain, au cours de la 3<sup>ème</sup> semaine de développement, la gastrulation permet la mise en place, entre la couche épiblastique et l'hypoblaste, d'un feuillet de nature mésodermique. L'épiblaste devient l'ectoderme de surface qui produit un morphogène, le BMP4, permettant de générer le tissu épidermique recouvrant l'ensemble de l'embryon. Dans la région médiane sous jacente, une structure de nature mésodermique, la notochorde, produit un inhibiteur de ce BMP4 : la protéine Noggin. C'est dans cette région axiale de l'ectoderme que se développera le neurectoderme à l'origine de l'encéphale et de la moelle épinière. Enfin, dans la région intermédiaire entre l'ectoderme de surface et le neurectoderme se développe une

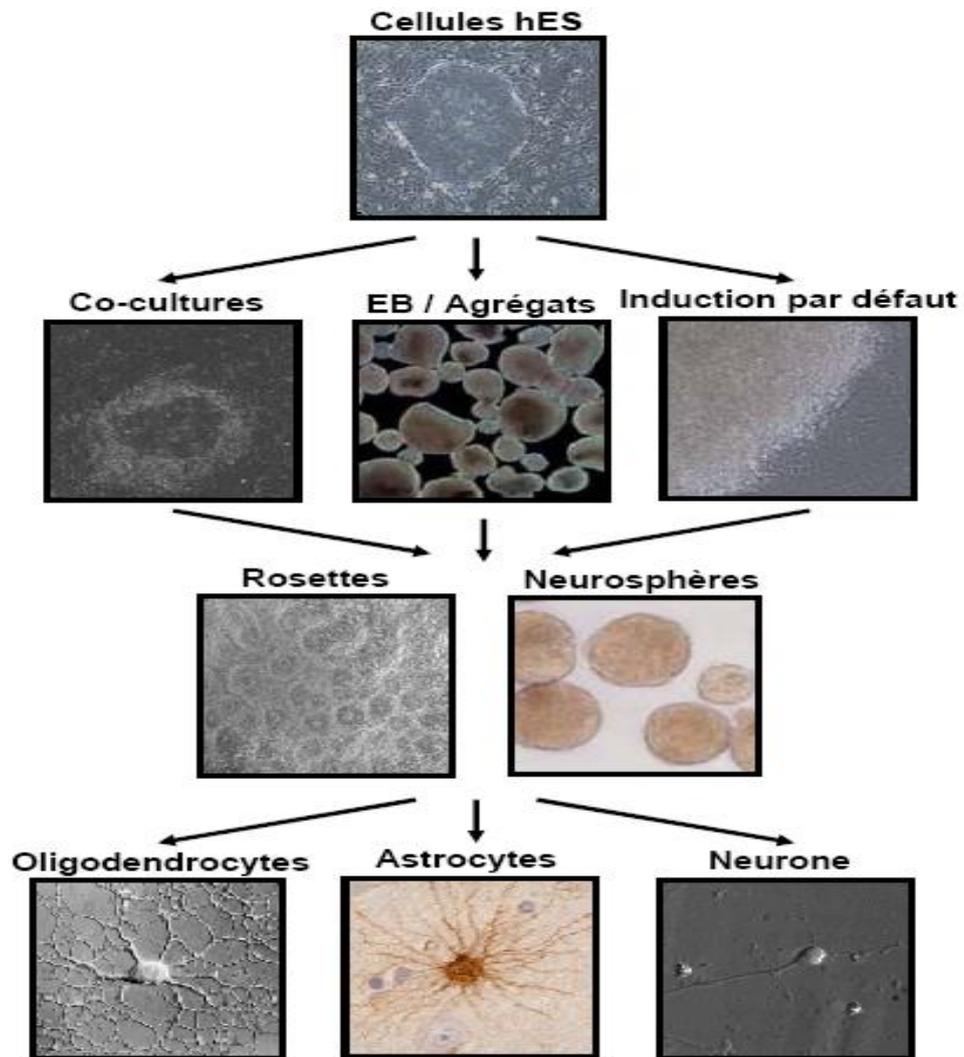


Figure 19 : Principales méthodes utilisées pour l'induction dans la voie neurale.

population appelée « crête neurale » à l'origine à de nombreux types cellulaires (voir chapitre en 6.2.1.1.3).

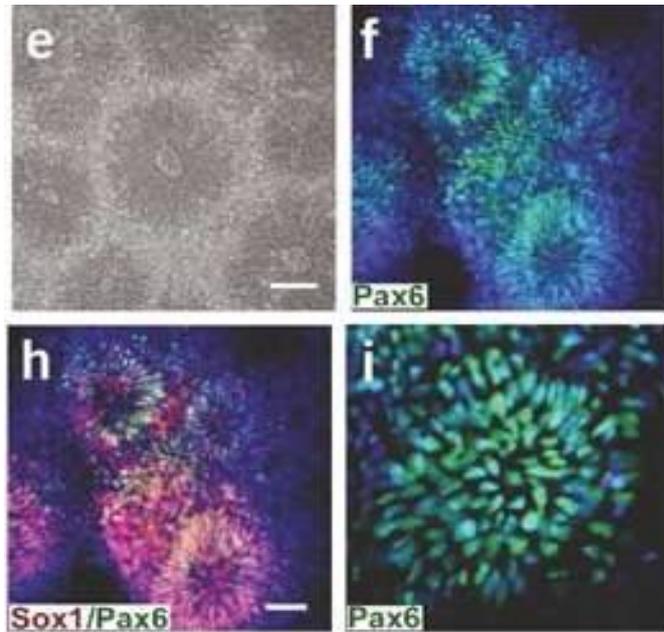
#### **2.6.2.1.1. Différenciation neurale**

Le système nerveux central est constitué d'environ  $10^{12}$  cellules, dont 90% sont des astrocytes. Les 10% restants représentent de nombreux sous-types de neurones et les oligodendrocytes. Malgré cette diversité morphologique et fonctionnelle, ces cellules ont une origine commune et dérivent de progéniteurs neurectodermiques multipotents (les NEPs) qui sont présents dans le neuroépithélium cylindrique qui constituent, au cours de la 4<sup>ème</sup> semaine du développement embryonnaire chez l'Homme, la plaque neurale puis le tube neural. La première étape du protocole de différenciation guidée des cellules hES vers ce lignage est appelée induction neurale et consiste à favoriser l'enrichissement de ces cultures en NEPs.

Il existe plusieurs méthodes expérimentales (**Figure 19**).

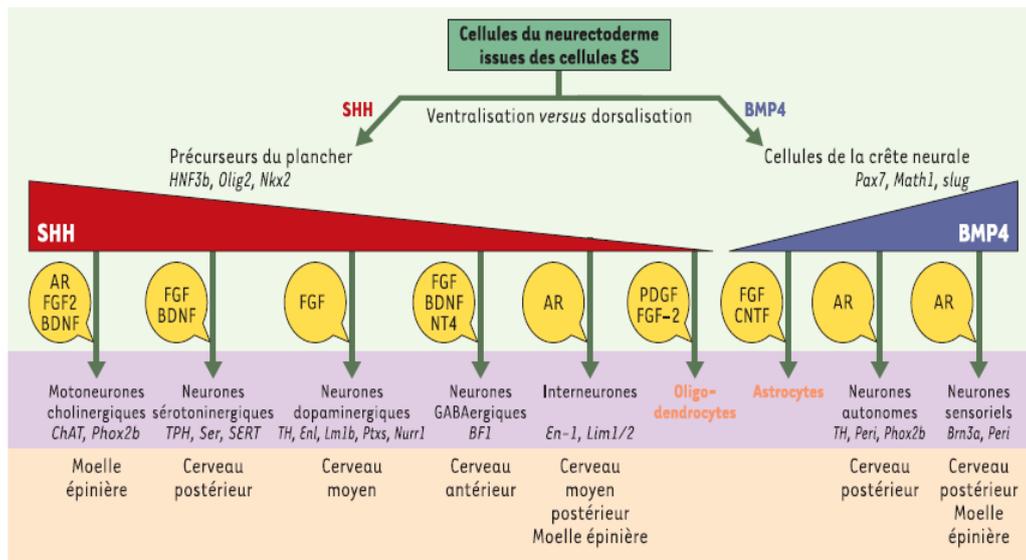
- **l'induction par défaut** : elle consiste à cultiver les cellules à forte densité, en l'absence de sérum, jusqu'à l'apparition d'agrégats cellulaires en suspension appelés neurosphères (Reubinoff et al., 2001).
- **la co-culture avec des cellules nourricières stromales** : elle est connue dans la littérature sous le terme de SDIA pour « *Stromal Differentiation Inducing Activity* » (Kawasaki et al., 2000; Perrier et al., 2004).
- **l'utilisation de petites molécules ciblant les voies de signalisation** : elle inclue l'utilisation de la protéine Noggin dont nous avons déjà parlé, qui inhibent la voie des BMPs (Pera et al., 2004) et le SB431542, une petite molécule synthétique, qui inhibe la phosphorylation des récepteurs de l'Activine et du TGF $\beta$  (Chambers et al., 2009). Ces deux facteurs agissent en synergie pour augmenter l'enrichissement en cellules neurales (Chambers et al., 2009).

Au cours de ce protocole d'induction, hormis si les cellules sont cultivées en suspension, les cellules hES présentent des modifications morphologiques majeures qui se caractérisent par la formation d'un épithélium cylindrique organisé radialement appelée rosettes neurales. Ces structures contiennent des progéniteurs neuro-épithéliaux semblables aux NEPs et reproduisent l'aspect en deux dimensions d'une coupe transversale du tube neural évoqué ci-dessus



**Figure 20 : Cellules neurales obtenues à partir de cellules hES**

Elles s'organisent en rosettes neurales évoquant la coupe transversale d'un tube neural. Aspect morphologique typique en microscopie par contraste de phase (e). Les cellules à l'intérieur des rosettes sont positives pour les facteurs de transcription *PAX6* et *SOX1* (f-h-i.). (D'après Li, Du et al. 2005).



**Figure 21 : Différenciation des progéniteurs neurectodermiques issus des cellules ES dans différents types de cellules neurales.**

L'action opposée de Sonic hedgehog (Shh) et du BMP4 sur les progéniteurs neurectodermiques conduit à la production de cellules précurseurs du plancher et de cellules de la crête neurale. Les marqueurs spécifiques des différents types cellulaires sont en italiques. Les types de neurones sont placés selon le gradient de concentration SHH qui permet l'acquisition de leur identité. La localisation embryonnaire correspondant à l'identité acquise par les cellules issues des cellules ES est indiquée sous les différents neurones. Le schéma montre que la différenciation des cellules ES en neurones reproduit la différenciation spatio-temporelle obtenue au cours du développement embryonnaire *in vivo*. Les acteurs de différenciation sélectifs (FGF, BDNF, NT4, PDGF, CNTF, AR) sont indiqués dans les bulles jaunes.

(D'après Cazillis, Rasika et al. 2006).

(**Figure 20**). Les rosettes neurales expriment des marqueurs neurectodermiques comme les facteurs de transcription *PAX6* et *SOX1* et sont compétentes pour répondre à des signaux développementaux leur permettant de se différencier en différents types de neurones et en cellules gliales (Li et al., 2005b; Perrier et al., 2004). La seconde étape du protocole de différenciation guidée vers un sous-type neuronal donné est appelée régionalisation des progéniteurs neuraux. *In vivo*, les cellules neuroépithéliales contenues dans le tube neural ne sont pas toutes équivalentes et acquièrent une identité différente le long de :

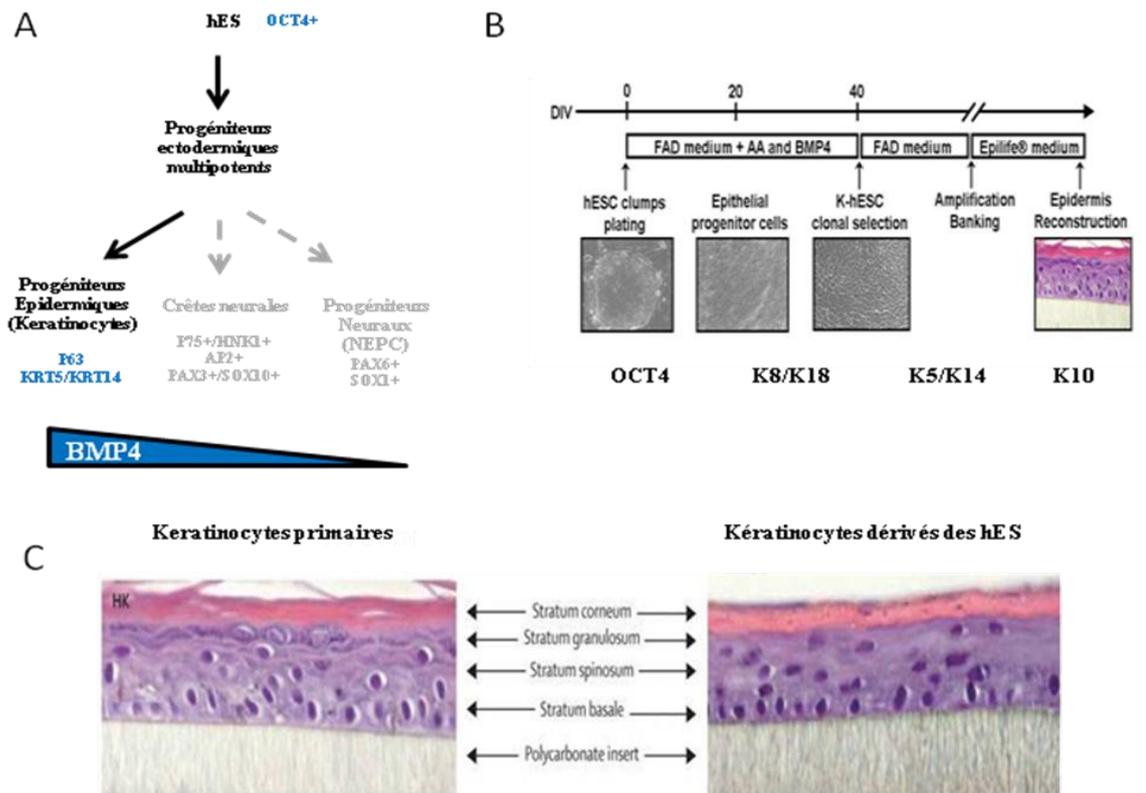
- **l'axe dorso-ventral** : le gradient de BMP4 secrété par les cellules les plus dorsales et le gradient de Sonic hedgehog (Shh) secrété par le chordo-mésoderme en position ventrale sont responsables de cette régionalisation.
- **l'axe antéropostérieur** : la voie des Wnt ainsi que la voie du FGF et de l'acide rétinoïque sont impliquées.

L'intégration de ce codage chimique positionnel qui permet la régionalisation du tube neural déclenchant l'activation de réseaux de gènes spécifiques définissant leur identité propre et leur capacité de différenciation. De manière remarquable, il est possible de mimer *in vitro* cette régionalisation en exposant les progéniteurs neurectodermiques contenus dans les rosettes neurales aux mêmes facteurs, reproduisant ainsi l'activation des gènes spécifiques de ce processus (Cazillis et al., 2006).

La dernière étape, appelée différenciation terminale, permet à partir de progéniteurs régionalisés d'obtenir de nombreux types de cellules neurales spécialisées (**Figure 21**).

#### 2.6.2.1.2 Différenciation épidermique

La différenciation des cellules hES vers l'épiderme comprend plusieurs étapes successives : l'induction vers le lignage ectodermique suivi de la différenciation en kératinocytes exprimant les kératines K5/K18 et enfin la stratification permettant la reconstitution des différentes couches de l'épiderme complet (**Figure 22**). Ce protocole a pu être mis au point grâce à certains travaux de biologie du développement réalisés chez le *Xenopus*. Ils ont permis à Brivanlou et Melton de proposer l'hypothèse dite de « l'induction neurale par défaut », basée sur le fait que les régions de l'ectoderme contenant du BMP4 empêchaient l'induction neurale en favorisant la voie épidermique (Hemmati-Brivanlou and Melton, 1997). Parmi les gènes clés contrôlant en aval cette différenciation épidermique en réprimant la différenciation neurale, la protéine p63, un homologue du facteur de transcription p53, est l'une des cibles majeures.



**Figure 22 : Différenciation des cellules hES vers le lignage épidermique.**

(A) L'utilisation de BMP4 permet de diriger la différenciation des hES vers des kératinocytes. (B) Protocole d'obtention de kératinocytes fonctionnels. La différenciation est accompagnée de l'expression séquentielle de kératines K8/K18 puis K5/K14 et K10 dans l'épiderme reconstruit. (C) Les kératinocytes dérivés à partir des hES sont capables de reconstituer un épiderme identique à celui issu de lignées primaires de kératinocytes. DIV= Day *in vitro*.

(Adapté d'après Guenou et al, 2009).

L'extinction de ce gène chez le poisson zèbre et chez la souris entraîne d'importantes anomalies structurales de la peau (Bakkers, 2002; Candi, 2006). Par ailleurs, cette protéine présente deux isoformes qui semblent avoir des rôles distincts au cours de la différenciation épidermique :

- **TAp63** : il est nécessaire à l'engagement embryonnaire des cellules ectodermiques vers le lignage kératinocytaire.
- **ΔNp63** : il est impliqué dans la stratification épidermique (Candi et al., 2007).

Sur la base de ces données embryonnaires, plusieurs études *in vitro* ont démontré la possibilité de guider la différenciation des cellules ES vers ce lignage en les traitant par du BMP4 recombinant. Ce protocole permet de diminuer le nombre de cellules exprimant la Nestine (marqueur neural) et d'augmenter en parallèle le nombre de cellules exprimant K14 (marqueur de l'épiderme) (Kawasaki et al., 2000).

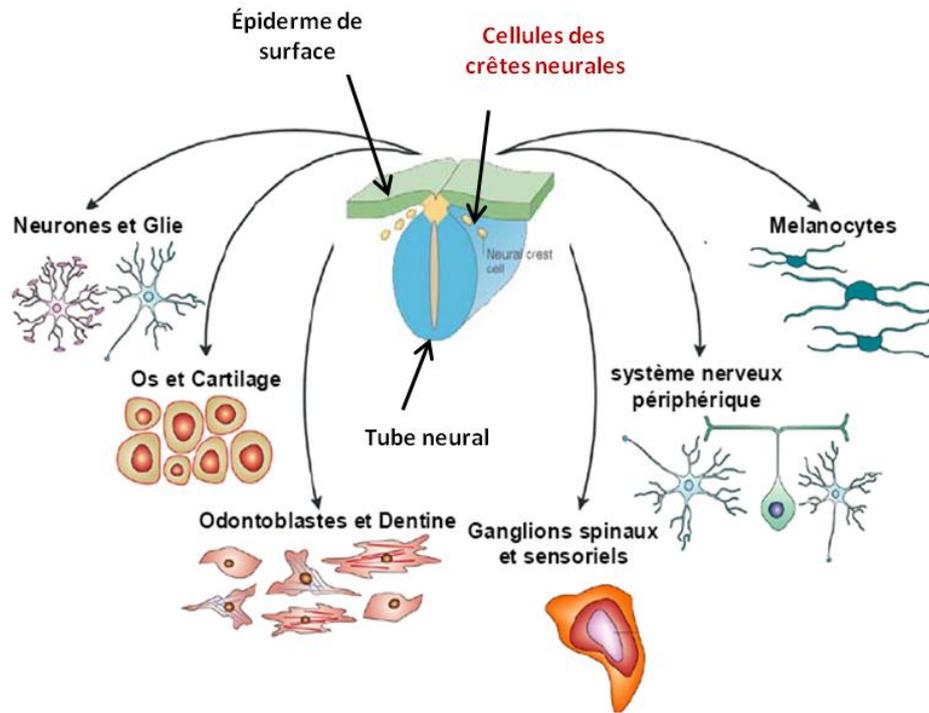
En 2006, l'équipe de Daniel Aberdam a démontré que le traitement par le BMP4 de cellules ES de souris entraînait une apoptose importante des progéniteurs neuraux favorisant ainsi leur engagement dans le lignage épithélial. Dans la même étude, ces chercheurs ont associé cet effet pro-apoptique de la BMP4 à l'inhibition de Smad6 et au clivage de la caspase 3 (Gambaro et al., 2006).

Très récemment, une équipe de notre laboratoire a mis un protocole de différenciation des cellules hES qui reproduit l'ensemble des étapes observées *in vivo*. Il aboutit à l'obtention de kératinocytes capables de reconstruire un épiderme complet à la fois *in vitro* mais aussi *in vivo* lorsque ces cellules sont greffées dans des souris immunodéprimées (Guenou et al., 2009) (**Figure 22**).

### ***2.6.2.1.3 Différenciation vers les crêtes neurales***

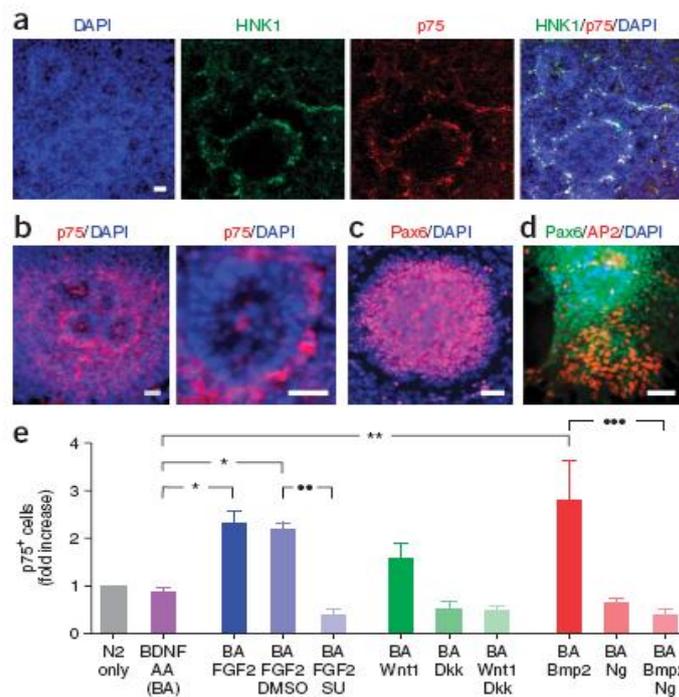
Les cellules de la crête neurale sont des progéniteurs multipotents qui peuvent donner naissance à de nombreux types cellulaires incluant les neurones et les cellules gliales du système nerveux sensoriel sympathique et parasympathique, les cellules de la glande médullosurrénale qui produisent l'adrénaline, les cellules pigmentées de l'épiderme et plusieurs composants du squelette et du tissu conjonctif de la tête (**Figure 23**).

Très récemment, l'équipe de Lorentz Studer au Sloan-Kettering Institute à New-York a mis au point un protocole de culture permettant de diriger la différenciation des cellules hES vers



**Figure 23: Progénies des cellules des crêtes neurales.**

(Adapté de Aaron J. et al 2008).



**Figure 24 : Dérivation de progéniteurs des crêtes neurales à partir des cellules hES.** (a-b) Immunomarquage montrant la présence de progéniteurs des crêtes neurales positives pour les protéines p75 (en rouge) et HNK1 (en vert) autour des rosettes neurales. (c) Les progéniteurs neuraux positifs pour le marqueur PAX6 sont à l'intérieur des rosettes neurales. (d) AP2 (en rouge) marque les progéniteurs en cours de migration. Les noyaux sont marqués par le DAPI. (e) Influence du FGF2, de Wnt1 et du BMP2 et de leurs inhibiteurs respectifs sur le nombre de cellules positives pour le marqueur P75. (D'après Lee, 2007).

ce type de progéniteurs (Lee et al.; Lee et al., 2007). Cette équipe a montré que les cellules qui bordent les rosettes neurales sont composées de progéniteurs ayant un phénotype de crête neurale et expriment le marqueur p75, HNK1 et AP2. Ces mêmes auteurs ont également montré que l'exposition des rosettes aux signaux morphogéniques Wnt1, FGF2 ou BMP2 permettait d'augmenter le nombre de cellules p75+ (**Figure 24**). Ces deux protéines membranaires ont permis de trier ces cellules par FACS et de les purifier. Ces cellules se sont révélées capables de se différencier en cellules spécialisées incluant des neurones périphériques (periphérin+/mash1+ ou Brn3a+), des cellules de Schwann (GFAP/Sox10) et des cellules mésenchymateuses (CD73+).

D'autres protocoles sont en cours de développement. Par exemple, une équipe australienne propose l'utilisation d'un inhibiteur de la voie effectrice des ROCK I/II, le Y27632 pour permettre l'augmentation de l'efficacité de différenciation en cellules présentant un phénotype de cellules des crêtes neurales, capable de migrer après transplantation dans un embryon de poulet et de se différencier en neurones entériques (Hotta et al., 2009).

#### 2.6.2.2. Différenciation mésodermique et endodermique

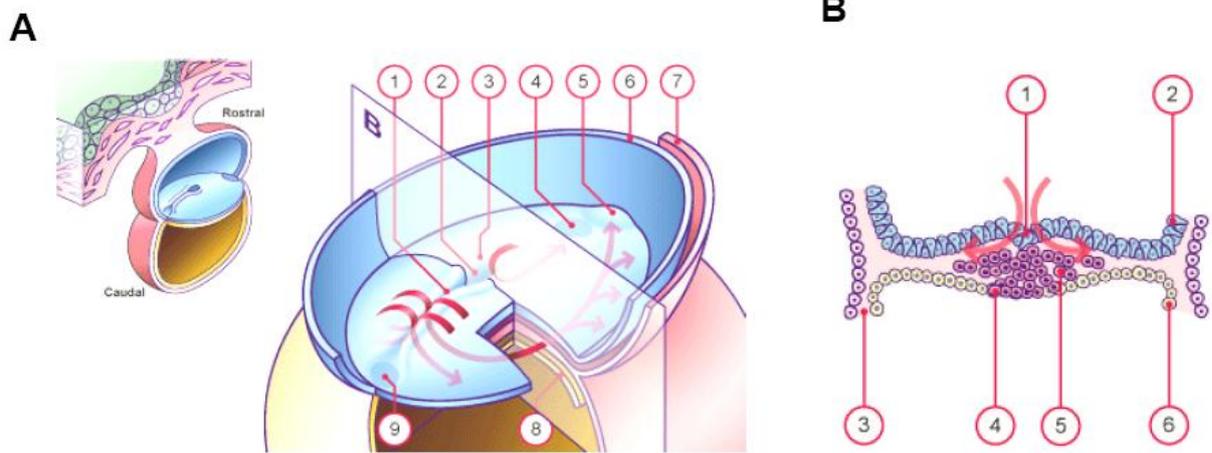
Les cellules hES peuvent également être différenciées en cellules d'origine mésodermique ou endodermique (**Tableau 2**). Les cellules hématopoïétiques et cardiaques représentent les types cellulaires les mieux documentés. Il faut toutefois noter que certaines différenciations restent très peu efficaces, comme par exemple pour le muscle strié squelettique (Barberi et al., 2005; Zheng et al., 2006).

De manière similaire à ce que l'on a décrit précédemment pour le lignage ectodermique, de nombreux protocoles ont été développés pour chacun de ces phénotypes en utilisant soit des co-cultures avec des lignées nourricières aux propriétés inductrices soit une sélection à partir des EBs. Ainsi, des précurseurs hématopoïétiques dérivés des cellules hES ont pu être obtenus dès 2001 par co-culture avec des cellules de moelle osseuse ou des cellules dérivées du cordon ombilical (Kaufman et al., 2001). Les cellules hES ainsi cultivées se différencient à la fois en cellules de type endothélial et en précurseurs hématopoïétiques caractérisés par l'expression respective des marqueurs CD31 et CD34. La population exprimant le marqueur CD34 est capable de donner des colonies de cellules de type érythroïde et myéloïde. Une autre étude réalisée à partir de corps embryoides traités avec plusieurs cytokines montre la possibilité de dériver des précurseurs hématopoïétiques (CD34+ et CD45+) (Chadwick et al., 2003).



<b>Origine</b>	<b>Phénotypes cellulaires</b>	<b>Référence</b>
<b>Mésoderme</b>	<b>cellules hématopoïétiques</b>	(Kaufman 2009)
	<b>cellules endothéliales</b>	(James, Nam et al.)
	<b>cellules mésenchymateuses</b>	(de Peppo, Svensson et al.; Mahmood, Harkness et al.; Barberi, Willis et al. 2005; Mateizel, De Becker et al. 2008)
	<b>Chondrocytes</b>	(Gong, Ferrari et al.; Toh, Lee et al.; Bigdeli, Karlsson et al. 2009)
	<b>cardiomyocytes</b>	(Vidarsson, Hyllner et al.)
	<b>muscle lisse</b>	(Vo, Hanjaya-Putra et al.)
<b>Endoderme</b>	<b>hépatocytes</b>	(Cai, Zhao et al. 2007; Chiao, Elazar et al. 2008)
	<b>cellules pancréatiques <math>\beta</math></b>	(Shi; Hay, Zhao et al. 2007; Zhang, Jiang et al. 2009)

**Tableau 2: Exemples de phénotypes cellulaires d'origine mésodermique ou endodermique obtenus par différenciation guidée des cellules**



**Figure 25: Mise en place de la ligne primitive de l'embryon et formation du troisième feuillet cellulaire lors de la gastrulation**

(A) Disque embryonnaire (15 jours de développement) vu par sa face supérieure (dorsale). Les flèches rouges représentent schématiquement la migration des cellules épiblastiques vers leurs territoires présomptifs : (1) ligne primitive ; (2) dépression primitive ; (3) nœud de Hensen ; (4) membrane oropharyngée ; (5) aire cardiaque ; (6) bord sectionné de l'amnios ; (7) mésoderme ; (8) endoderme ; (9) ligne primitive. (B) Section transversale au niveau de la ligne primitive au moment de la gastrulation montrant l'invagination des cellules épiblastiques formant le futur mésoblaste : (1) ligne primitive ; (2) épiblaste ; (3) mésoblaste extra-embryonnaire ; (4) entoblaste définitif ; (5) invagination des cellules formant le futur mésoblaste ; (6) hypoblaste.

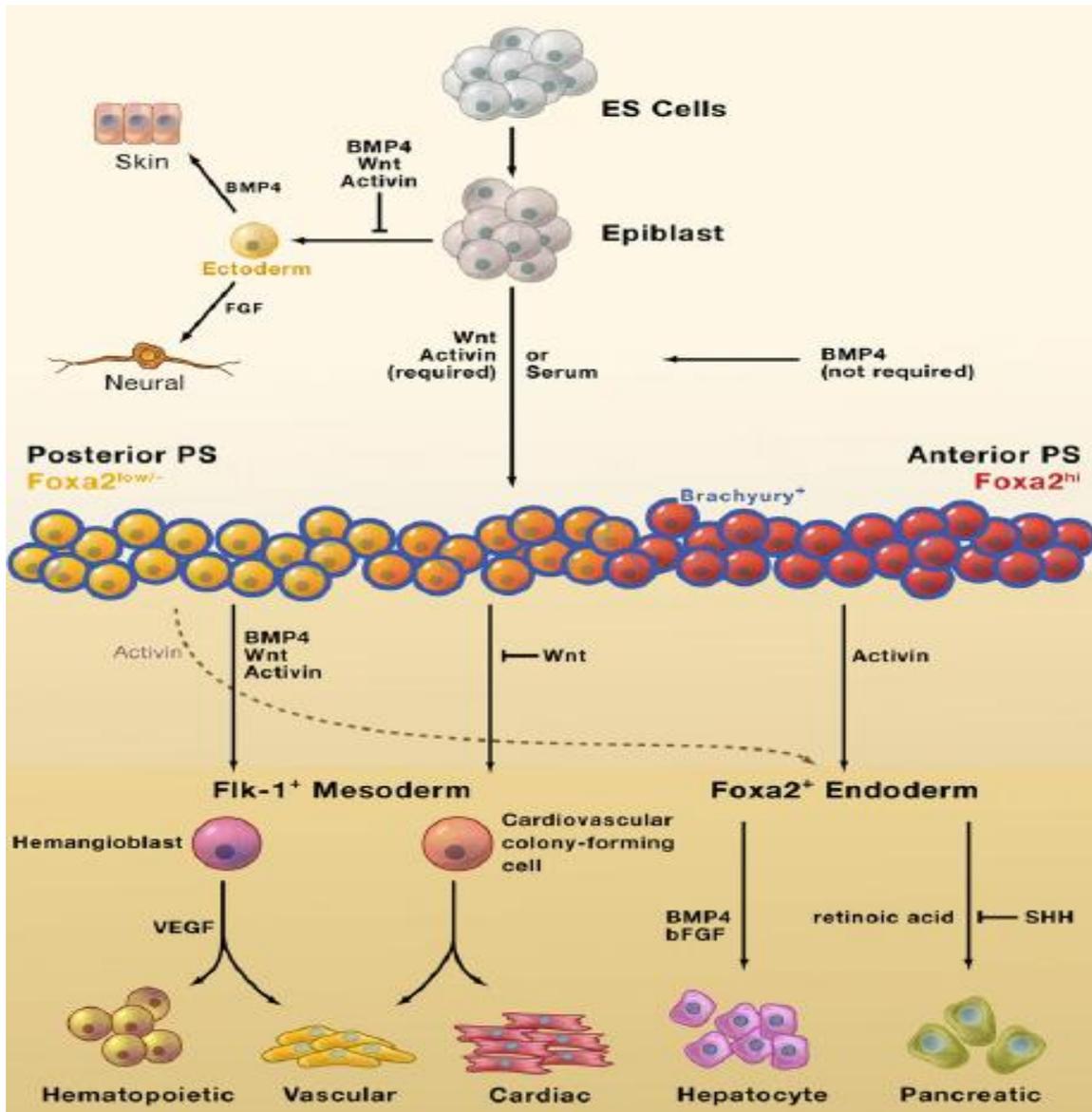
Adapté de [www.embryology.ch](http://www.embryology.ch) . Copyright : Dr. A Senn et al, CHUC Lausanne.

Les cellules hES peuvent également se différencier en cellules cardiaques objectivées par l'apparition au sein des corps embryoides de zones « battantes » dans lesquelles les cellules se contractent. Après microdissection de ces régions, Kehat et ses collègues ont montré que ces cellules présentaient des propriétés de cellules cardiaques fœtales et néonatales, comme en témoignent leur organisation myofibrillaire, la répartition subcellulaire des jonctions « gap » et leur activité électrique (Kehat et al., 2001). Ces cellules expriment des marqueurs spécifiques des cellules cardiaques telles que la Troponine Ic, la chaîne lourde alpha de la myosine et un certain nombre de facteurs de transcription dont *Nkx2.5*, *GATA4* et *MEF2A*. La caractérisation de cette population a ensuite été complétée par des études d'électrophysiologie et par l'analyse de l'ultrastructure formée par ces cellules (Kehat et al., 2002; Snir et al., 2003).

En ce qui concerne le lignage endodermique, il avait été montré dès 2001 que les corps embryoides dérivés des cellules hES étaient capables de sécréter de l'insuline. Cette hormone est physiologiquement produite par les cellules  $\beta$  du pancréas endocrine qui ont une origine endodermique (Assady et al., 2001). La différenciation vers ce lignage est complexe et les protocoles disponibles conduisent à des populations cellulaires mixtes de nature méso-endodermique. Par exemple, l'utilisation de co-cultures avec des cellules nourricières de souris de type END-2 conduit à la fois à des cardiomyocytes immatures regroupés sous forme de zones battantes mais aussi à des cellules exprimant des marqueurs de l'endoderme viscéral.

Beaucoup plus récemment, les connaissances acquises sur la différenciation méso-endodermique a progressé de manière importante. Une nouvelle fois, ce sont les connaissances concernant les morphogènes intervenant *in vivo* au cours de la gastrulation qui ont permis d'améliorer les protocoles de différenciation guidée des cellules hES.

Au cours de ce processus développemental, des cellules se détachent de l'épiblaste et s'invaginent le long d'une structure médiane appelée, la ligne primitive (**Figure 25**). Les premières cellules mobilisées migrent de manière postérieure et forment le mésoderme extra-embryonnaire à l'origine des annexes comme l'amnios, l'allantoïde et les cellules de la paroi du sac vitellin composées de cellules hématopoïétiques, endothéliales et du muscle lisse vasculaire. Dans un second temps, d'autres cellules migrent de manière plus antérieure pour former le mésoderme cranial et cardiaque ainsi que le mésoderme axial et paraxial. Enfin, les dernières cellules à migrer forment l'endoderme définitif. Ces étapes développementales sont fortement régulées de manière spatio-temporelle créant ainsi des microenvironnements qui contrôlent la différenciation vers des lignages spécifiques. Bien que la régulation précise de ces étapes ne soit pas entièrement comprise, différentes analyses d'expression génique et d'études



**Figure 26 : Modèle d'induction méso-endodermique des mES.**

La première étape est la formation de cellules ressemblant à l'épiblaste de l'embryon murin. Une fois activées par wnt, activine, BMP4 ou du sérum, ces cellules génèrent une population cellulaire ressemblant à la ligne primitive (PS). Cette population cellulaire est régionalisée selon un profil d'expression identique à l'axe antéro-postérieur *in vivo*. Les cellules de profil antérieur (en rouge) expriment fortement FOXA2 alors que les cellules de profil postérieur (en jaune) l'expriment plus faiblement. En fonction de ces différents signaux, les cellules sont ensuite capables de se différencier vers des populations cellulaires différentes d'origine mésodermique ou endodermique.

(Adapté de Murry and Keller 2008).

de gain ou de perte de fonction ciblées sur certains gènes ont été réalisées chez la souris. Elles ont permis d'impliquer des membres de la famille du TGF $\beta$  incluant le BMP4 et Nodal. (Hogan, 1996; Conlon et al., 1994; Schier, 2003) ainsi que différents membres de la famille des Wnt (Yamaguchi, 2001).

La manipulation *in vitro* de ses voies de signalisation permet de contrôler cette différenciation vers des lignages cellulaires différents (Murry and Keller, 2008). La première étape consiste à obtenir des progéniteurs de la ligne primitive qui expriment le facteur de transcription *brachyury*. Ces protocoles nécessitent soit du sérum, riche en facteurs de croissance et cytokines, soit des activateurs de la voie Wnt et de l'Activine A. Dans un second temps et de manière similaire à ce que l'on a décrit plus haut pour le lignage neurectodermique, il est possible de régionaliser ces progéniteurs de la ligne primitive selon un axe antéro-postérieur permettant l'enrichissement ultérieur des cultures vers les principaux phénotypes d'origine mésodermique ou endodermique par pression sélective de différentes molécules (**Figure 26**).

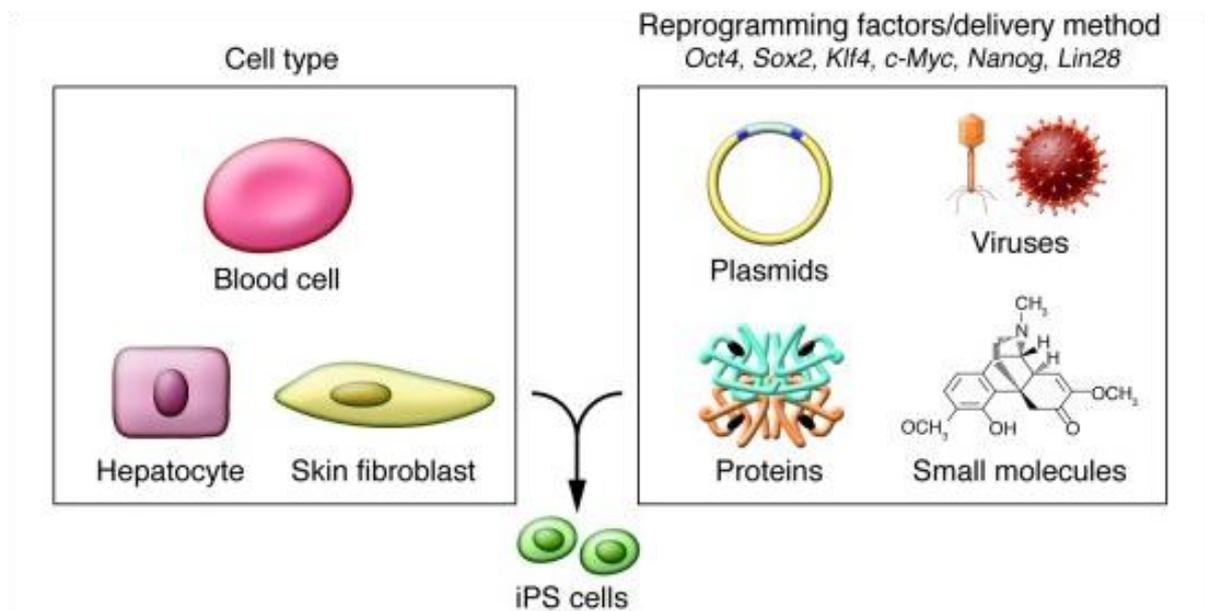
En conclusion, de nombreux protocoles permettant d'induire la différenciation des cellules hES vers différents phénotypes cellulaires ont été décrits ouvrant ainsi la voie à de nombreuses applications dont nous parlerons plus loin. Toutefois, il est nécessaire de poursuivre l'effort de recherche entrepris dans la mise au point de ces protocoles qui, pour la plupart, ne sont pas encore optimisés.

## **2.7. Induction de la pluripotence *ex vivo***

Les cellules hES représentent le seul type « naturel » de cellules souches pluripotentes, mais il existe plusieurs méthodes d'induction expérimentale de la pluripotence regroupées sous le terme de reprogrammation.

### **2.7.1 Le transfert nucléaire somatique (SCNT)**

Dans cette technique, après collection des oocytes, leurs noyaux sont retirés et remplacés par celui d'une cellule somatique différenciée. Le noyau somatique avec 2N chromosomes est reprogrammé et se comporte alors comme un zygote qui s'engage dans un programme développemental en progressant vers le stade blastocyste. Il est alors possible, en suivant les techniques décrites plus haut, d'isoler à partir de la masse cellulaire interne les cellules ES.



**Figure 27 : Génération des cellules induites à la pluripotence (iPS)**

Présentation des différentes cellules et outils nécessaires à l'obtention des iPS.

(Adapté de Kiskinis et al. 2010).

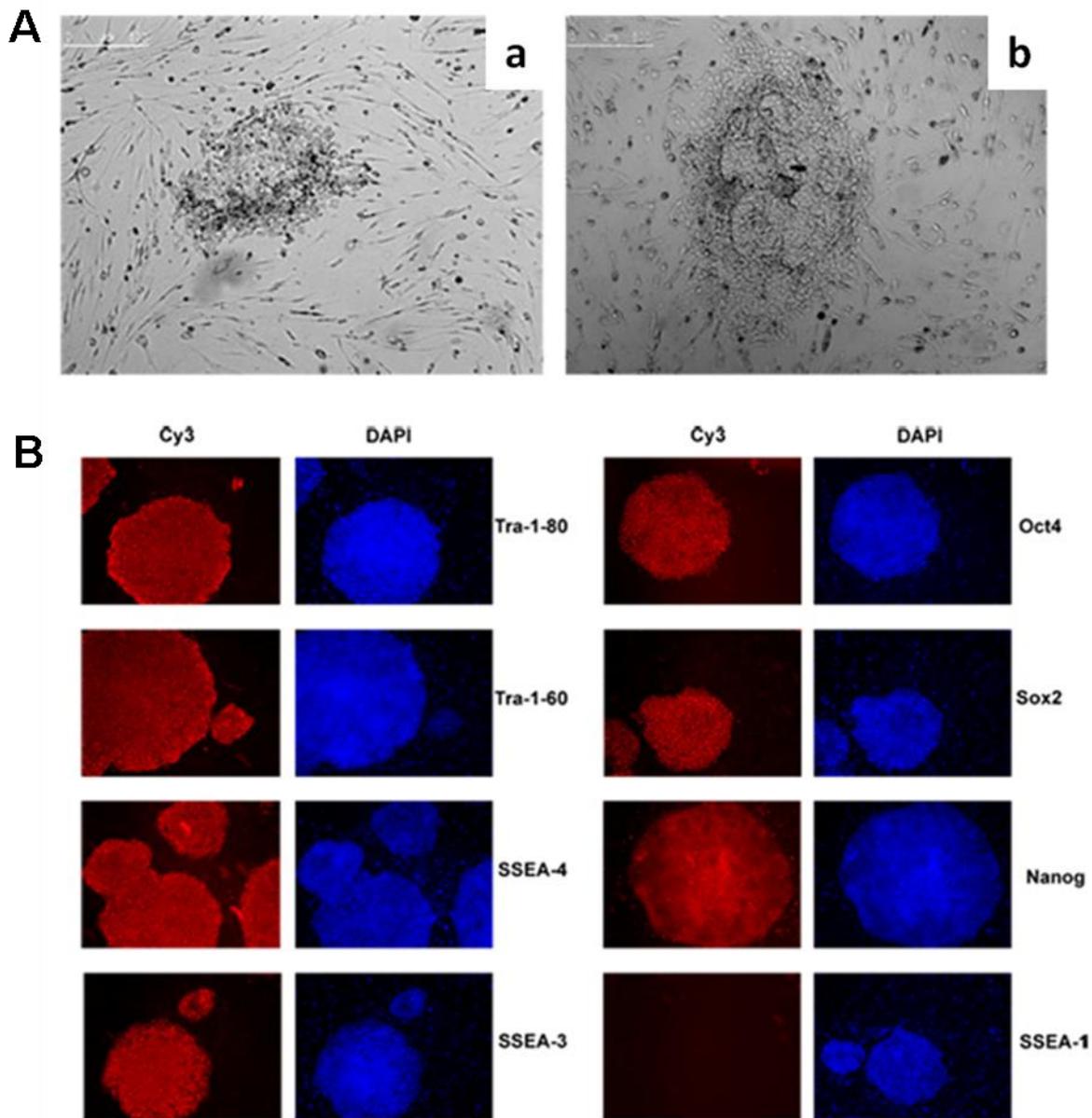
Aujourd'hui, la technique de dérivation de cellules ES utilisant cette méthode est techniquement au point chez le primate (Byrne et al., 2007) mais aussi chez l'Homme (French et al., 2008). Une variation de cette technique, le transfert nucléaire altéré, vise à créer des lignées de cellules ES en transférant dans l'oocyte un noyau dont le gène *Cdx2*, requis pour la formation du trophectoderme, est délété. Il n'y a donc pas de création d'embryon au sens strict (Meissner and Jaenisch, 2006).

### 2.7.2 La fusion cellulaire

En 2005, l'équipe de Kevin Eggan de l'université d'Harvard a décrit qu'il était possible de reprogrammer des cellules de peau humaine en les fusionnant avec des cellules ES humaines (Cowan et al., 2005). Cette expérience montrait que des facteurs contenus dans la cellule ES non seulement maintiennent l'état d'indifférenciation, mais surtout sont capables de l'induire à partir de cellules différenciées. Les hybrides obtenus sont tétraploïdes mais ce modèle est cependant intéressant pour étudier les mécanismes moléculaires qui dirigent la reprogrammation (Do and Scholer 2010).

### 2.7.3 La reprogrammation directe

Dans son éditorial de « Science » du 19 décembre 2008, Bruce Alberts présentait la sélection des 10 découvertes scientifiques majeures récentes. Était classée en tête, la reprogrammation de cellules adultes spécialisées en cellules pluripotentes (iPS, *induced Pluripotent Stem cells*) ayant des potentialités très proches, sinon identiques, aux cellules ES. Pour la première fois des cellules embryonnaires étaient produites en laboratoire en l'absence d'embryons ou d'ovocytes. Tout avait commencé 2 ans plus tôt, le 25 août 2006, par une publication dans la revue « Cell » de chercheurs de l'Université de Kyoto (Takahashi and Yamanaka, 2006). La reprogrammation est obtenue par l'infection de fibroblastes murins par des rétrovirus permettant la surexpression de 4 gènes : *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* et *c-Myc* qui codent pour des facteurs de transcription choisis parmi une liste de 24 gènes connus pour jouer un rôle dans la pluripotence des cellules ES (**Figure 27**). Ce principe fut ensuite rapidement adapté à l'Homme par la même équipe en transduisant des fibroblastes de derme humain avec la même combinaison de gènes (Takahashi et al., 2007). Dans le même temps, l'équipe américaine de James A. Thomson a réussi également à générer des cellules iPS en utilisant une combinaison de gènes légèrement différente : *NANOG*, *OCT4*, *SOX2* et *LIN28* (Yu et al., 2007). Dans tous les cas, le rendement de ces techniques est inférieur à 1% mais cela est suffisant pour obtenir



**Figure 28 : Caractérisation phénotypique des cellules iPS humaines.**

(A) Changement morphologique de fibroblastes après 4 jours (a) et 17 jours (b) après transductions des 4 constructions lentivirales contenant *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* et *c-MYC* induisant la reprogrammation. (B) Expression à haut niveau des marqueurs de pluripotence incluant les marqueurs de surface TRA-1-81, TRA-1-60, SSEA-4 et SSEA-3 et les marqueurs nucléaires Oct 4, Nanog et Sox2

(D'après "Generation of Induced Pluripotent Stem Cells by Reprogramming Human Fibroblasts with the Stemgent Human TF Lentivirus Set", 2009), <http://www.jove.com>

plusieurs clones de cellules iPS à partir de plusieurs milliers de fibroblastes. Les fibroblastes reprogrammés en cellules iPS présentent un phénotype semblable aux cellules hES en termes de morphologie, prolifération et expression des marqueurs de pluripotence (**Figure 28**). Les premières études visant à comparer l'expression génique et épigénétique des cellules ES et iPS à l'échelle du génome entier avaient conclu à des profils identiques (Maherali et al., 2007 ; Wernig, 2007 ; Mikkelsen, 2008 ; Amabile and Meissner, 2009), mais cette notion est actuellement discutée (Chin et al., 2009; Stadtfeld et al. 2010).

Les perspectives ouvertes par l'utilisation de ces cellules notamment pour la thérapie cellulaire font avancer très rapidement la recherche sur ce sujet et de nouvelles stratégies pour induire la pluripotence sont actuellement testées (O'Malley et al., 2009; Patel and Yang). Très schématiquement, on distingue plusieurs méthodes utilisant :

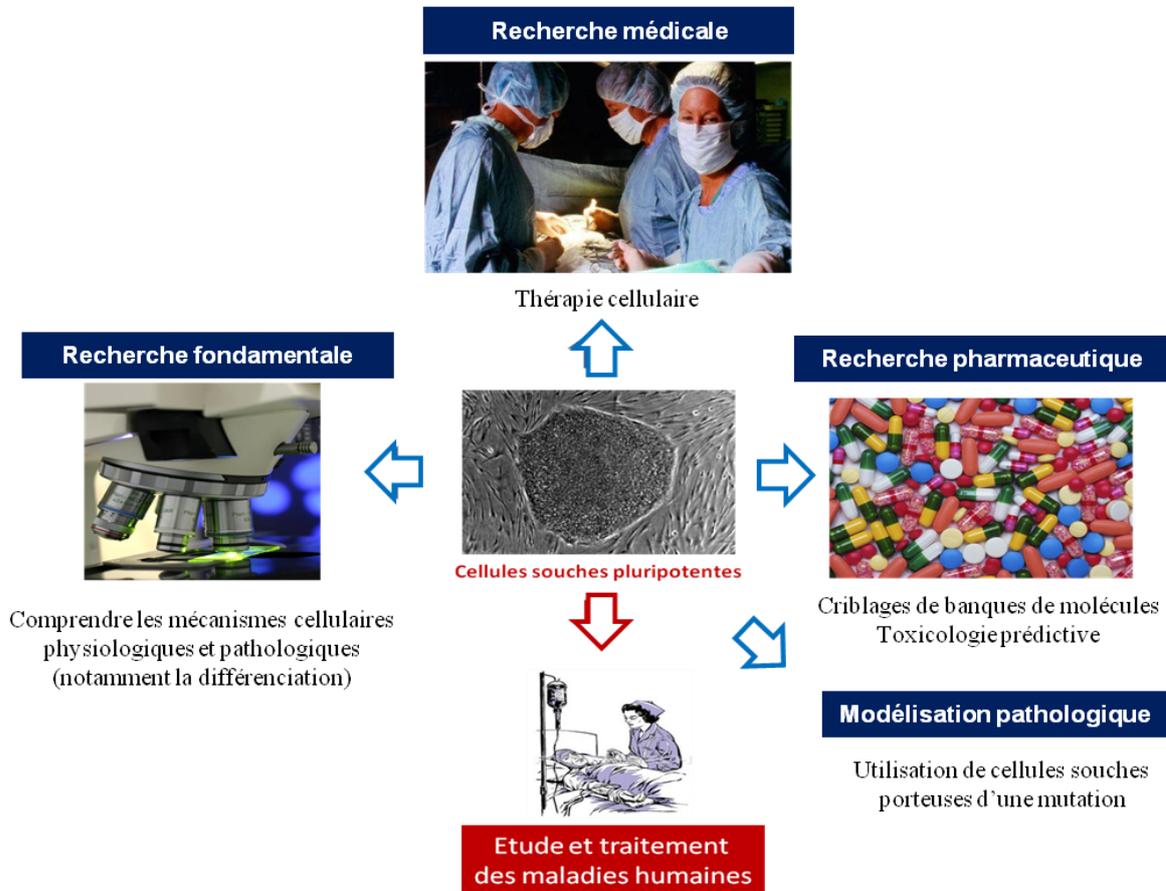
- **des constructions lentivirales** : ces constructions intègrent des systèmes d'excision permettant d'enlever les facteurs de reprogrammation qui se seraient intégrés dans la séquence d'ADN de la cellule reprogrammée en utilisant soit le système cre-LoxP basé sur la recombinaison, soit le système PiggyBac basé sur la transposition.
- **des méthodes d'inductions transitoires non virales** : la transfection plasmidique est suffisante à la reprogrammation bien que son efficacité soit très faible (Okita, 2008)
- **des petites molécules ou des protéines recombinantes** : cette dernière méthode semble la plus prometteuse et des lignées d'iPS murines et humaines ont été produites grâce à des protéines recombinantes codées par les gènes permettant la reprogrammation et taguées avec un peptide poly-arginine permettant leur passage transmembranaire (Zhou et al., 2009). Toutefois, cette méthode a une efficacité très faible de l'ordre de 10 fois inférieure à celle obtenue avec les lentivirus.

Par ailleurs, d'autres petites molécules pourraient également jouer un rôle pour aider la reprogrammation et permettraient de s'affranchir de l'utilisation des oncogènes *KLF4* et *cMYC*. Parmi elles, l'acide valproïque, un modulateur bien connu de l'état de condensation de la chromatine permet de reprogrammer un fibroblaste humain avec uniquement OCT4 et SOX2 (Huangfu et al., 2008). D'autres petites molécules ciblant les voies de signalisation telles que des inhibiteurs de la voie de la GSK3 (Silva et al., 2008), sont à l'essai. Dans un futur proche, des criblages de petites molécules à grande échelle devraient permettre de disposer de nouvelles molécules efficaces pour induire la pluripotence (Gonzalez et al. 2010).

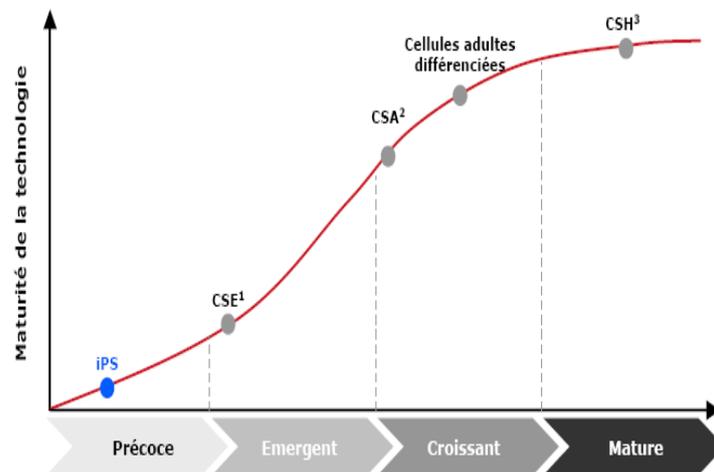
En résumé, il existe de nombreuses méthodes en cours de développement permettant la reprogrammation mais les rendements sont faibles. Pour contourner en partie ce problème de



rendement, plusieurs équipes ont montré que la reprogrammation de cellules souches somatiques non fibroblastiques à partir de cellules non entièrement différenciées telles que des kératinocytes, permettaient d'augmenter l'efficacité de la reprogrammation (Aasen et al., 2008).



**Figure 29 : Applications proposées pour l'utilisation des cellules souches pluripotentes à des fins thérapeutiques.**



**Figure 30 : Profil de maturité des technologies de la thérapie cellulaire.** 1. Cellules souches embryonnaires ; 2. Cellules souches adultes ; 3. Cellules souches hématopoïétiques. Source : Etude Thérapie cellulaire du LEEM (les entreprises du médicament), Février 2010, disponible sur le site <http://www/leem.org>.

## **II. Les applications à visées thérapeutiques des cellules souches pluripotentes**

Les propriétés des cellules souches pluripotentes humaines que nous venons de décrire permettent des applications variées. Elles peuvent être utilisées *in vivo* comme « médicament » en étant implantées dans le corps des patients dans le cadre de thérapie cellulaire ou utilisée *in vitro* soit en recherche fondamentale permettant une meilleure compréhension des mécanismes physiologiques de la différenciation, soit pour la recherche de nouveaux médicaments.

Chacune de ces applications contribue à l'étude et au traitement des maladies humaines (**Figure 29**).

### **1. Thérapie cellulaire**

#### **1.1. Principe et état d'avancement des applications des cellules souches en thérapie cellulaire**

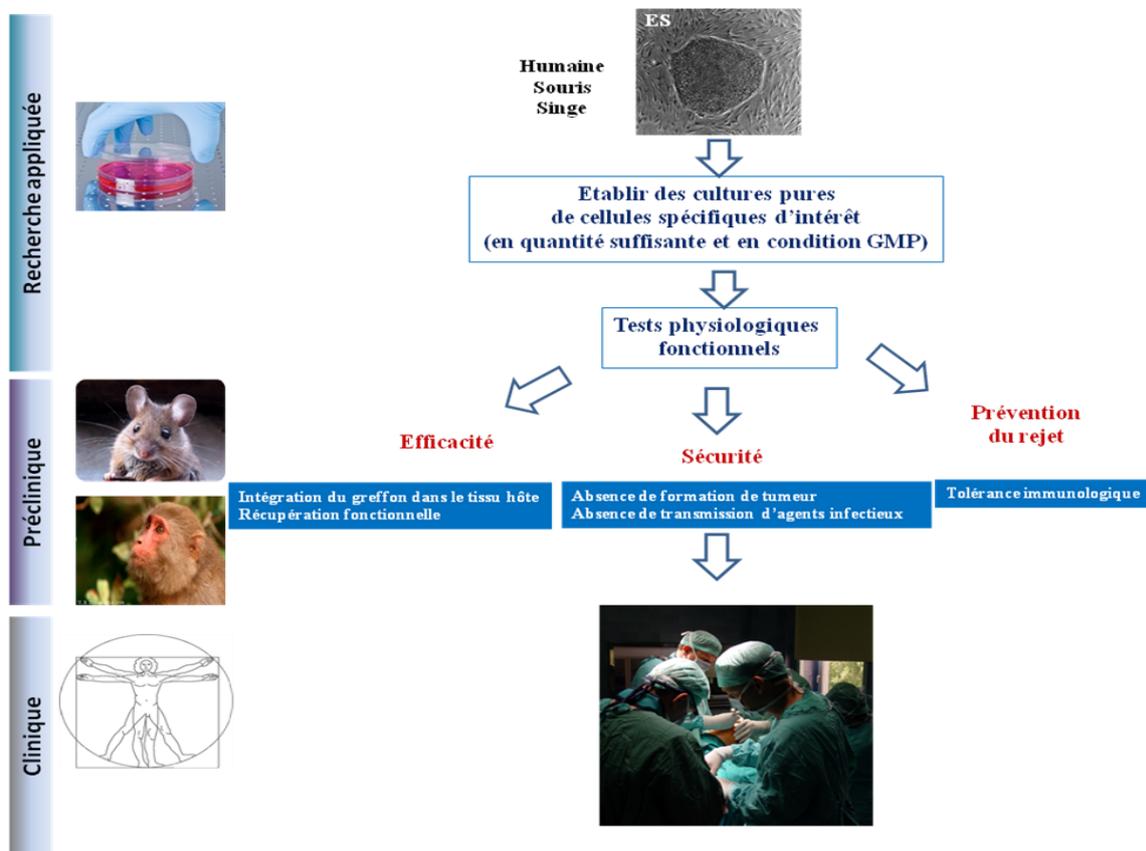
La thérapie cellulaire consiste à implanter des cellules exogènes vivantes dans le but de prévenir, atténuer ou traiter des traumatismes ou des maladies.

Il existe 2 stratégies principales :

- **la thérapie cellulaire substitutive** : elle concerne l'implantation de cellules saines pouvant produire une substance nécessaire à l'organisme ou influencer sur son microenvironnement de façon à moduler une réponse physiologique, par exemple la réponse immunitaire.
- **la thérapie cellulaire régénératrice** : l'utilisation de cellules (principalement des cellules souches) pouvant se substituer aux cellules ciblées dans le but de reconstituer un tissu ou un organe défaillant. C'est ce que l'on appelle la thérapie cellulaire régénératrice.

Les applications cliniques de la thérapie cellulaire sont plus ou moins développées en fonction de la source de cellules utilisées. Excepté dans le cas des cellules souches hématopoïétiques (CSH), leurs utilisations thérapeutiques restent encore très limitées, en particulier pour les cellules souches pluripotentes (**Figure 30**).

Depuis plus de 10 ans, l'utilisation des CSH a donné des résultats satisfaisants qui ont débouché sur des applications cliniques majeures. Ces cellules ont été obtenues à partir de sang périphérique ou de la moelle osseuse et sont indiquées dans le traitement de nombreuses



**Figure 31 : Étapes du développement d'un essai clinique impliquant l'utilisation de cellules souches pluripotentes.**

La première étape du projet est la maîtrise des conditions de culture permettant l'obtention de cellules d'intérêt avec les ES humaines mais aussi murines et de singe (pour le passage en pré-clinique). Ces conditions doivent permettre d'obtenir une quantité suffisante de cellules fonctionnelles purifiées et caractérisées en condition GMP (bonne pratique de production, norme nécessaire pour le passage en clinique). L'étape suivante est pré-clinique, c'est-à-dire qu'elle se déroule chez un animal modèle le plus souvent la souris puis chez le gros animal comme le singe. Ces expériences vont permettre d'établir l'efficacité, la sécurité et les problèmes de rejet immunologique. Sur la base de ces résultats expérimentaux répétés plusieurs fois par des équipes indépendantes, les autorités administratives étudient les demandes d'autorisation pour le lancement d'un essai clinique multicentrique chez l'Homme.

pathologies, principalement en onco-hématologie comme par exemple la leucémie, le lymphome, le myélome ou pour le traitement des hémoglobinopathies comme la drépanocytose ou les thalassémies. Depuis quelques années, l'accès à d'autres sources de CSH, comme le sang de cordon ou le sang placentaire, se développe de manière importante.

Les applications utilisant d'autres types de cellules souches adultes sont plus restreintes mais les lancements d'essais cliniques se sont multipliés ces dernières années. Ils concernent un peu moins de 200 produits en cours de développement dans le monde dont environ la moitié vise les maladies cardiovasculaires, mais aussi des indications dans les soins cicatriciels des plaies et les traitements des maladies du cartilage et de l'os (source : Leem, 2010). Les cellules souches mésenchymateuses occupent une place toute particulière. En effet, elles sont capables de se différencier en plusieurs types cellulaires mais aussi de moduler la réponse immunitaire trouvant des applications dans le traitement anti-rejet ou de sécréter des facteurs solubles modulant la prolifération et la différenciation cellulaire (Garcia-Castro et al., 2008). D'autres types de cellules souches adultes sont actuellement utilisées dans les essais cliniques comme des myoblastes, qui sont les cellules souches du muscle strié squelettique, pour des indications dans le traitement des ischémies cardiaques sévères (Menasche et al., 2008) mais aussi des neuroblastes fœtaux indiqués dans certaines maladies neurodégénératives (Peschanski, 2001; Peschanski et al., 2000) notamment dans la maladie de Parkinson (Peschanski, 2000) ou la maladie d'Huntington (Bachoud-Levi, 2009).

L'expérience acquise lors de ces essais cliniques apporte la preuve de concept de l'efficacité de la thérapie cellulaire. Toutefois la limitation de l'accès à ces ressources biologiques ainsi que les méthodes de préparation des greffons et la variabilité dans les résultats obtenus ont conduit au développement de nouvelles stratégies basées notamment sur l'utilisation de cellules pluripotentes, cellules hES et encore plus récemment des cellules iPS.

## **1.2 Thérapie cellulaire basée sur l'utilisation des cellules pluripotentes**

Les cellules pluripotentes (hES ou hiPS) de part leurs propriétés représentent une source biologique alternative prometteuse pour la thérapie cellulaire. Cependant, les étapes nécessaires pour arriver à leur utilisation en clinique restent encore nombreuses (**Figure 31**).

Comme nous l'avons déjà signalé, la greffe directe de cellules souches pluripotentes n'est pas envisageable puisque ces cellules, une fois greffées, se différencient spontanément en une masse cellulaire composée de cellules de différentes origines embryologiques, le tératome.

<b>Phénotypes</b>	<b>Indications</b>	<b>Etat d'avancement</b>	<b>Référence</b>
<b>Progéniteurs cardiovasculaires</b>	Ischémie cardiaque	Préclinique  (Singe)	<b>(Blin, Nury et al.)</b>
<b>Kératinocytes  (Cellules de la peau)</b>	Grands brûlés  Génodermatoses	Préclinique  (souris)	<b>(Guenou, Nissan et al. 2009)</b>
<b>Neurones GABAergiques moyen épineux du striatum  (Précurseurs)</b>	Maladie d'Huntington	Préclinique  (rat ; singe en cours non publié)	<b>(Aubry, Bugi et al. 2008)</b>
<b>Neurones dopaminergiques  du cerveau moyen  (Précurseurs)</b>	Parkinson	Préclinique  (Singe)	<b>(Perrier, Tabar et al. 2004)</b>

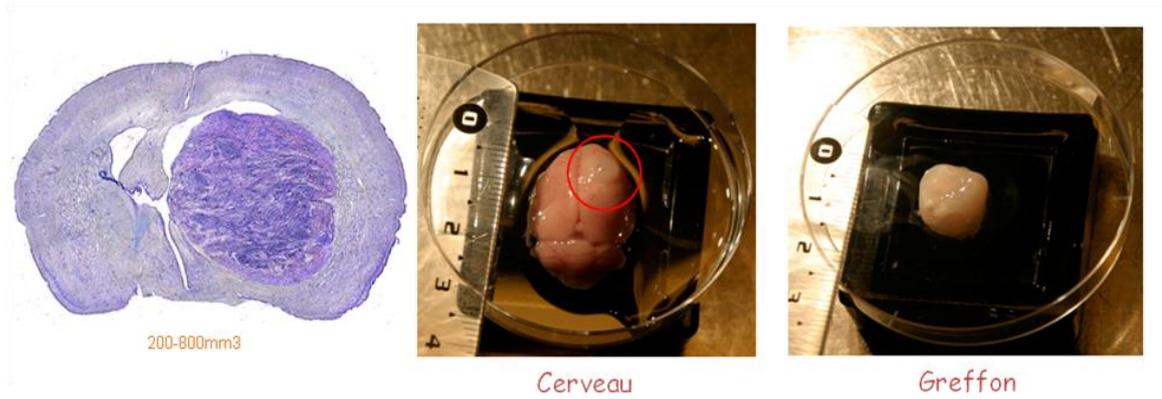
**Tableau 3: Quelques exemples de populations cellulaires obtenues par différenciation guidée des cellules hES et leurs indications thérapeutiques potentielles.**

Le pré-requis pour pouvoir utiliser ces cellules hES (ou les hiPS) est leur différenciation guidée vers le type cellulaire d'intérêt par rapport à la pathologie à traiter. Ces cellules doivent en outre démontrer leur fonctionnalité : par exemple une cellule des îlots  $\beta$  de Langerhans doit être capable de produire de l'insuline, un neurone doit être capable de générer des potentiels d'action et les cardiomyocytes doivent être contractiles. En général, ces propriétés sont rapportées dans les publications originales décrivant les protocoles de différenciation mais le transfert de la technologie pour le passage en phase préclinique nécessite de revoir les protocoles initiaux en intégrant des précautions particulières (Protocole GMP pour *Good Manufacture Practice*). Par exemple, nous l'avons déjà évoqué plus haut, les milieux de culture doivent être dépourvus de contaminants d'origine animale et la préparation cellulaire utilisée doit être la plus pure possible. Les deux défis majeurs sont alors de démontrer :

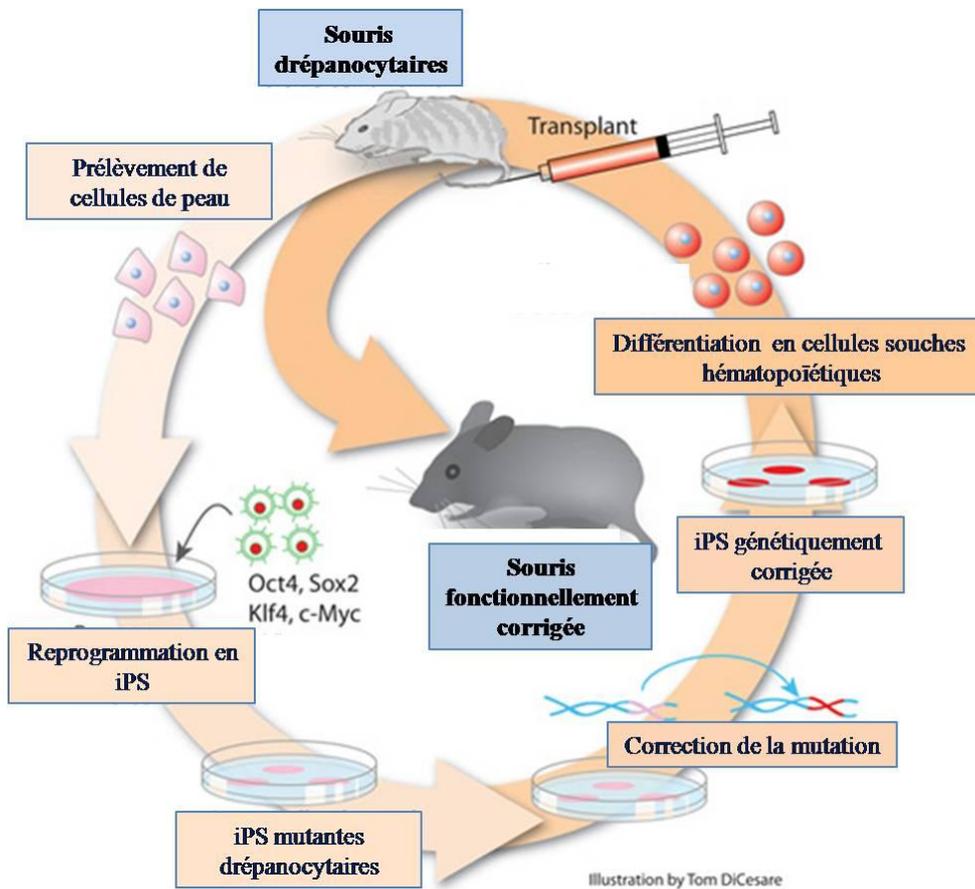
- **l'efficacité de la greffe** : il s'agit de mesurer la récupération fonctionnelle consécutive à l'injection des cellules d'intérêt
- **la sécurité du greffon** : elle recherche l'absence de tumeur et de réaction immunitaire.

La possibilité de trier une population cellulaire d'intérêt par une méthode très sensible et très spécifique comme le FACS permet de purifier les cellules à greffer. Cette méthode est toutefois limitée par notre connaissance des marqueurs de surface qui définissent ces populations cellulaires (**Tableau 3**). Pour prendre un exemple récent, 2 équipes l'une américaine dirigée par Gordon Keller à New-York et l'autre française dirigée par Michel Puceat à Evry, ont étudié le potentiel des hES dans l'indication d'insuffisance cardiaque avancée. La première équipe a mis au point un protocole permettant de générer des progéniteurs multipotents Flk1+ à partir de cellules ES de souris et humaines capables de se différencier en cellules endothéliales, en cellules du muscle lisse vasculaire et dont environ 50% sont des cardiomyocytes contractiles (Yang et al., 2008). La deuxième équipe a mis au point un protocole permettant de générer des progéniteurs cardiaques après induction des cellules hES par le BMP2 et tri sur le marqueur SEEA1+ (Leschik et al., 2008; Puceat, 2008).

Ces cellules ont été greffés dans un modèle de singe immunodéprimé et les premiers résultats sont encourageants puisque les progéniteurs se différencient en cardiomyocytes *in vivo* et reconstituent 20% du tissu malade. De plus, la population de progéniteurs triés sur le marqueur SEEA1+ ne développe pas de tératome contrairement à la fraction SEEA1- (Blin et al. 2010).



**Figure 32 : Observation d'une sur-prolifération du greffon comprimant le parenchyme cérébral.**  
(D'après Aubry et al, 2008).



**Figure 33 : Exemple de d'utilisation thérapeutique de cellules iPS pour le traitement de souris drépanocytaires.**

(Modifié d'après Hanna, 2007).

Toutefois, une étude récente rapportée par des chercheurs d'I-STEM a montré que la présence dans le greffon de cellules à l'état indifférencié n'était pas le seul problème et que des cellules partiellement différenciées à partir de cellules hES pouvaient être responsables de surcroissance cellulaire (**Figure 32**). En effet, lorsque l'on greffe des progéniteurs neuraux moyens épineux obtenus par différenciation guidée des cellules hES dans le striatum de rat, ceux-ci peuvent proliférer et sont capables de générer après 3-5 mois des surcroissances cellulaires massives (Aubry et al., 2008).

Ces considérations obligent les chercheurs à concevoir, en amont, de nouvelles stratégies de sécurisation du greffon. Il est par exemple théoriquement possible de réaliser le même type de différenciation mais à partir de cellules hES modifiées exprimant de manière stable une construction de type gène suicide, tel que la Thyrosine kinase, qui permet d'éliminer le greffon en cas de sur-prolifération par administration au patient d'une molécule substrat dont le produit est toxique. Ce principe a déjà été utilisé avec succès en hématologie pour prévenir les effets délétères de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) (Ciceri et al., 2005).

Une fois les études précliniques franchies, la dernière étape est d'ordre technologique. Elle dépend de la capacité des industriels à changer d'échelle (*scale-up*) et à développer des moyens de production en masse des cellules d'intérêt (par exemple par bioréacteurs) dans des conditions GMP permettant de répondre aux critères de qualité.

A ce jour, seule la firme californienne Geron Corporation a reçu le 23 janvier 2009 une autorisation pour la mise en place d'une étude clinique multicentrique de Phase I de la Food and Drug Agency (l'autorité réglementaire américaine). Elle vise à évaluer la sécurité de précurseurs oligodendrocytaires (GRNOPC1) dérivés à partir de la lignée hES H1 (Alper, 2009). Cet essai, qui a été récemment suspendu à la demande de la firme Geron, devrait reprendre fin 2010-début 2011.

### **1.3 Place des cellules iPS en thérapie cellulaire**

#### ***1.3.1 Preuve de concept***

Le potentiel thérapeutique des iPS a été évalué avec succès chez la souris par l'équipe de Rudolf Jaenisch (Hanna et al., 2007) (**Figure 33**). Dans un modèle murin drépanocytaire (la plus courante des hémoglobinopathies d'origine génétique), des cellules fibroblastiques de peau ont été collectées et reprogrammées en cellules iPS. Dans un premier temps, les cellules



iPS mutantes ont été corrigées de leurs anomalies génétiques par manipulation génétique *ex vivo* en générant des clones allogéniques normaux. Ces cellules iPS ont ensuite été différenciées en cellules souches hématopoïétiques à partir d'EB et sélectionnées par surexpression du gène *HOXB7* impliqué dans la différenciation vers ce lignage. Enfin, ces cellules ont été greffées, comme dans une greffe de moelle classique, dans les souris malades rendues aplasiques par irradiation. Une fois la moelle reconstituée, les souris ont restauré des lignées hématopoïétiques exemptes de la maladie d'origine, permettant une récupération fonctionnelle, c'est à dire une ré-augmentation des fractions d'hémoglobine normale HbA au dépend de la forme HbS pathologique.

Cet exemple apporte la preuve de concept de l'intérêt thérapeutique des cellules iPS dans le traitement de maladies génétiques. D'une manière théorique, il est possible d'envisager ce type d'approche pour n'importe quelles maladies génétiques humaines à condition, d'une part de maîtriser la différenciation des cellules iPS dans le type de cellules d'intérêt souhaité et dans des conditions de production compatibles avec une utilisation clinique, et d'autre part de pouvoir administrer ces cellules à la localisation souhaitée. Pour les maladies hématologiques, une simple transfusion est nécessaire pour que les cellules souches hématopoïétiques recolonisent la moelle osseuse par « *homing* » alors que les greffes stéréotaxiques et les greffes chirurgicales intracardiaques permettent d'envisager ce type d'approche respectivement pour les maladies neurologiques et cardiaques.

### ***1.3.2 Problèmes spécifiques liés à l'utilisation des cellules iPS***

En plus des difficultés déjà évoquées pour la thérapie cellulaire basée sur les cellules hES, la technique utilisée pour la reprogrammation entraîne un certain nombre de problèmes intrinsèques qui sont des obstacles à des applications cliniques immédiates.

En effet, l'utilisation de rétrovirus lors de la reprogrammation peut causer un risque d'intégration d'un transgène de manière aléatoire dans le génome pouvant alors provoquer des mutations insertionnelles à l'origine de cancer (Hacein-Bey-Abina et al., 2003). Pourtant le système utilisant le rétrovirus MMLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) présente, outre ses propriétés d'infection élevées, des avantages importants pour la reprogrammation expérimentale : il permet de délivrer une expression constante de transgène qui s'éteint naturellement une fois la reprogrammation achevée due à des modifications épigénétiques du promoteur viral intervenant dans des cellules à l'état indifférencié (Matsui et al. 2010). Une solution qui autoriserait l'utilisation de rétrovirus en toute sécurité pourrait venir du



développement de séquenceurs à ADN de nouvelle génération permettant dans un avenir proche de cribler en quelques heures le génome de plusieurs clones d'iPS à la recherche d'éléments intégratifs et ainsi d'écarter ceux qui présenteraient une mutation insertionnelle (Nakayama, 2009).

Un autre problème fondamental est l'utilisation d'oncogène tel que cMyc dans le processus de reprogrammation qui rend cette technique inutilisable pour générer des cellules hiPS dans des conditions cliniquement acceptables. La sécurisation du mode de production des cellules hiPS passe nécessairement par la suppression de l'utilisation de cet oncogène. Ce problème a trouvé rapidement une solution puisqu'il n'est pas indispensable à la reprogrammation même s'il augmente son rendement (Nakagawa et al., 2008). Toutefois, il n'est pas clair que la réactivation de l'un des autres gènes, *OCT4*, *KLF4* ou *SOX2*, ne puissent pas générer également des tumeurs. L'induction expérimentale de la pluripotence dans des conditions de grade clinique GMP inclura probablement la possibilité de reprogrammation par des méthodes non virales, par de petites molécules ou par la transduction de protéines.

En conclusion, les recherches appliquées dans le domaine de la thérapie cellulaire évoluent rapidement. On observe notamment dans le domaine des cellules souches adultes, une augmentation de l'utilisation du sang de cordon ombilical pour la greffe de cellules souches hématopoïétiques (création de 5 nouvelles banques en France entre 2008 et 2009).

Dans le domaine des cellules souches pluripotentes, des avancées décisives ont été réalisées, laissant présager un développement considérable de cette approche thérapeutique. Parmi celles-ci, on peut citer :

- La découverte des iPS.
- L'autorisation du premier essai clinique utilisant des cellules hES par la FDA (Janvier 2009).
- La suppression des restrictions de financement fédéral aux recherches sur les cellules issues d'embryons humains par le Président américain Barack Obama (Mars 2009).
- L'harmonisation européenne de la réglementation des médicaments de thérapie cellulaire.
- L'implication, depuis 2008, d'une stratégie industrielle par les grands laboratoires pharmaceutiques qui commencent à ouvrir des départements de recherche et développement consacrés à la médecine régénérative (Pfizer) ou établissent des contrats de partenariat avec des laboratoires académiques (Roche, Aventis).

Modèles	Type	Modifications génétiques	Stabilité génétique	Prolifération	Quantité disponible	Variabilité cellulaire	Problèmes éthiques
Modèles cellulaires classiques	Cellules primaires	Non	oui	très limitée	très limitée	oui (+)	non
	Cellules tumorales ou transformées	Oui	non (aneuploïde)	oui (accélérée)	illimitée	oui (+++)	non
Cellules souches	Cellules souches adultes	Non	oui	oui	très limitée	oui (+)	non
	Cellules hES	Non	oui	oui (+++)	illimitée	faible	oui
	Cellules iPS	Oui	oui	oui (+++)	illimitée	faible	non

**Tableau 4 : Comparaison des différents modèles *in vitro* utilisés dans la recherche pharmaceutique.**

Les avantages sont identifiés en vert et les inconvénients en rouge.

## 2. Recherche pharmaceutique

Le marché des produits de la santé est l'un des plus importants à travers le monde. Dans un contexte très concurrentiel, le processus de recherche conduisant à la mise sur le marché d'un médicament est lent, extrêmement coûteux (de l'ordre de 900 millions de dollars sur 10 à 15 ans) et subit un taux d'échec très important (Kola and Landis, 2004). L'une des raisons principales de ces problèmes vient du fait que les modèles utilisés, aussi bien dans les phases de découverte de nouveaux composés potentiellement thérapeutiques que dans les phases d'évaluation de leurs propriétés pharmacologiques ou toxicologiques, sont parfois peu représentatifs du malade et conduisent à des erreurs souvent révélées tardivement.

Les modèles *in vitro* classiquement utilisés dans l'industrie pharmaceutique sont soit des cultures primaires issues de patients, souvent limitées par l'accès à des quantités et des phénotypes cellulaires adaptés au besoin de la recherche, soit des cellules transformées ou immortalisées qui permettent de disposer d'une quantité importante de cellules mais qui présentent un métabolisme, des voies de signalisation et une stabilité génétique perturbées, pouvant interférer sur la qualité des résultats obtenus.

Depuis seulement quelques années, les cellules hES et récemment les hiPS ont été proposées comme des alternatives à ces modèles (Cezar, 2007; Cezar, 2007; McNeish, 2004). Elles offrent la possibilité de pallier à un certain nombre de problèmes du fait de leurs caractéristiques. Théoriquement, leur propriété d'auto-renouvellement permet de s'affranchir de la limitation en matériel biologique, puisqu'une fois établies ces cellules offrent la possibilité de disposer d'une source continue de cellules. Leur propriété de pluripotence permet l'obtention de cellules de phénotypes pertinents, parfois inaccessibles par un autre moyen, à condition cependant de pouvoir disposer de protocoles de différenciation guidée adaptés (Ben-Yosef et al., 2008; Dvash et al., 2006; Stephenson et al., 2009) (**Tableau 4**).

### 2.1 Modèles de pharmacologie et de toxicologie prédictive

La possibilité de diriger les cellules hES vers des cellules ressemblant à des hépatocytes ou des cardiomyocytes ouvrent de nouvelles applications de modélisation prédictive des paramètres pharmacocinétiques et toxicologique d'une molécule (Laustriat et al., 2009), comme la modélisation du métabolisme hépatique ou la prédiction de l'hépatotoxicité et de la cardiotoxicité qui sont 2 éléments majeurs dans le développement de molécules d'intérêts thérapeutiques.



### ***2.1.1. Applications des hépatocytes dérivés des hES :***

Les cellules hES peuvent se différencier en cellules ressemblant à des hépatocytes (Agarwal et al., 2008; Baharvand et al., 2006; Cai et al., 2007; D'Amour et al., 2006; Rambhatla et al., 2003). Ces cellules présentent un certain nombre de caractéristiques des hépatocytes primaires prélevés *in vivo* telles que la capacité de production de l'albumine, la synthèse d'urée ou le stockage du glycogène. Il a également été décrit que celles-ci pouvaient exprimer des enzymes du métabolisme de type I comme le cytochrome P450 CYP1A (Duan et al., 2007) ou des enzymes de type II telle que la glutathione-S tranferase (Soderdahl et al., 2007). Ces données suggèrent la possibilité de créer des modèles cellulaires permettant de tester précocement, au cours du processus de découverte de nouveaux médicaments, l'effet des biotransformations métaboliques mimant l'effet de premier passage hépatique. Ces informations sont d'une importance capitale car la mise en évidence d'un métabolisme inattendu entraînant la toxicité ou l'inefficacité d'un composé d'intérêt peut conduire à la suspension ou à l'arrêt de son développement industriel. Par conséquent, il est souhaitable de repérer ces effets le plus précocement possible.

Le modèle d'hépatocytes dérivés de cellules hES pourrait apporter un avantage par rapport aux modèles existants tels que les cultures primaires d'hépatocytes, qui sont difficiles d'accès et ont tendance à perdre leurs caractéristiques fonctionnelles en culture, ou les lignées d'hépatomes humains (tel que HepG2) qui présentent une activité enzymatique métabolique faible et significativement différente des hépatocytes natifs. Les données de la littérature sont toutefois partielles et en l'état actuel des connaissances, il est encore trop tôt pour considérer les hépatocytes dérivés des hES comme des cellules complètement fonctionnelles par rapport aux hépatocytes fraîchement isolés (Jensen et al., 2009). Le développement de cette technologie fortement attendue par l'industrie pharmaceutique passera probablement par une meilleure définition des procédés de maintien de ces cellules en culture.

### ***2.1.2. Applications des cardiomyocytes dérivés des hES :***

La cardiotoxicité est un point clé du développement d'un médicament car sa recherche est demandée par les agences réglementaires américaine (FDA) et européenne du médicament (EMA). Par exemple, la capacité de certaines molécules à induire de manière inattendue des torsades de pointes par prolongement de l'espace QT est la première cause de retrait de produit du marché.



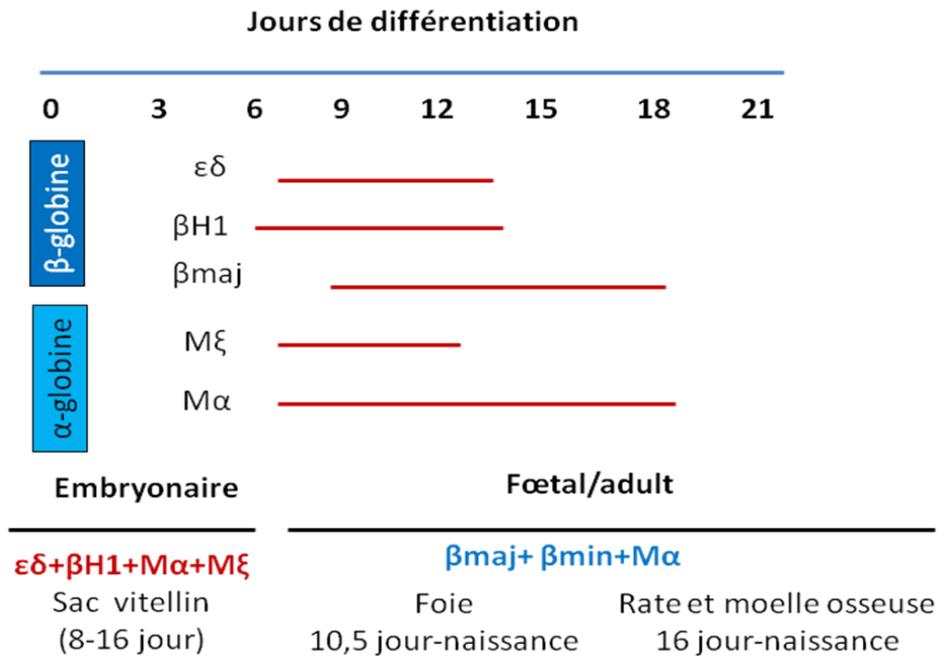
La possibilité de différencier les cellules hES vers des cardiomyocytes fonctionnels, c'est-à-dire répondants aux stimuli électriques et pharmacologiques, suggère la présence de canaux et de récepteurs adrénergiques et muscariniques adéquats (Norstrom et al., 2006). Par ailleurs, la possibilité d'enregistrer des courants électriques sur ces cardiomyocytes dérivés de hES, par exemple par le système de puce à microélectrodes, permet de prédire la capacité d'une molécule à retarder la repolarisation (Liang et al.; Reppel et al., 2005). Ce modèle permet également de tester de nombreux autres paramètres parmi lesquels la fonction contractile, l'arythmie cardiaque et la réponse au stress oxydant.

Aujourd'hui, les modèles prédictifs basés sur l'utilisation des cellules hES ou iPS ne sont pas encore pris en compte par les agences réglementaires. Toutefois les perspectives de développement de ces approches sont très importantes et font désormais partie des stratégies industrielles développées par les grands groupes pharmaceutiques désireux de diminuer les coûts de production et le taux d'échec en recherche et développement en utilisant des modèles *in vitro* plus informatifs.

### **3. Applications en recherche fondamentale**

L'étude des étapes précoces du développement humain se limite, lorsqu'elle est autorisée, à des études anatomiques et biochimiques réalisées par dissection d'embryons malades après avortement. La quantité d'information accumulée en biologie du développement a été possible grâce à l'utilisation d'animaux modèles en particulier la souris dont les caractéristiques génétiques sont bien définies. Bien que ces études aient fait progresser notre connaissance du développement, il existe des différences majeures en termes de taille, de croissance et d'anatomie entre la souris et l'Homme entraînant des différences dans l'expression de certains gènes et dans le métabolisme. En complément de l'usage des modèles animaux, l'utilisation de lignées cellulaires humaines et en particulier les cellules hES, apparaissent comme un outil performant pour l'étude des processus physiopathologiques impliqués dans les mécanismes développementaux (Dvash et al., 2006).

Il existe actuellement des données de la littérature montrant que la différenciation des cellules ES de souris et humaines sont capables de récapituler les étapes du développement précoce embryonnaire. Par exemple, l'expression des gènes connus pour être exprimés *in vivo* soit de manière très précoce, soit plus tardivement au cours de la différenciation spécifique de



**Figure 34 : Expression des gènes de l' α- et de la β-globine au cours de la différenciation des cellules mES.**

Ces gènes sont exprimés à des stades spécifiques du développement dans des sites différents d'érythropoïèse. Les EB dérivés des ES expriment les différentes isoformes d'hémoglobine qui apparaissent dans un ordre chronologique identique à leur apparition *in vivo*.

lignage, est reproduit dans l'espace et dans le temps lors de la formation d'EB à la fois chez la souris (Leahy, 1999) et chez l'Homme (Dvash et al., 2004). Dans cette dernière étude, les chercheurs ont étudié la voie de signalisation médiée par Nodal qui joue un rôle dans la détermination des axes embryonnaires (gauche/droite, antéro/postérieur et dorso/ventral) et dans l'induction du mésoderme au cours de la gastrulation. Ils ont comparé le niveau d'expression de *NODAL* et de ces cibles *LEFTYA*, *LEFTYB* et *PITX2* entre les stades EB précoces, intermédiaires et matures. Ces gènes sont activés au cours de la différenciation en reproduisant le profil d'expression qui se produit naturellement *in vivo* au cours du développement embryonnaire normal.

La conservation de la chronobiologie au cours de la différenciation des ES de souris peut également être illustrée par une étude relativement ancienne dans laquelle l'expression des gènes de l' $\alpha$  et de la  $\beta$  globine a été suivie au cours de la différenciation en EB. Ce processus est régulé tout au long du développement et la séquence chronologique d'expression est parfaitement mimée par le modèle cellulaire ES (Lindenbaum and Grosveld, 1990) (**Figure 34**).

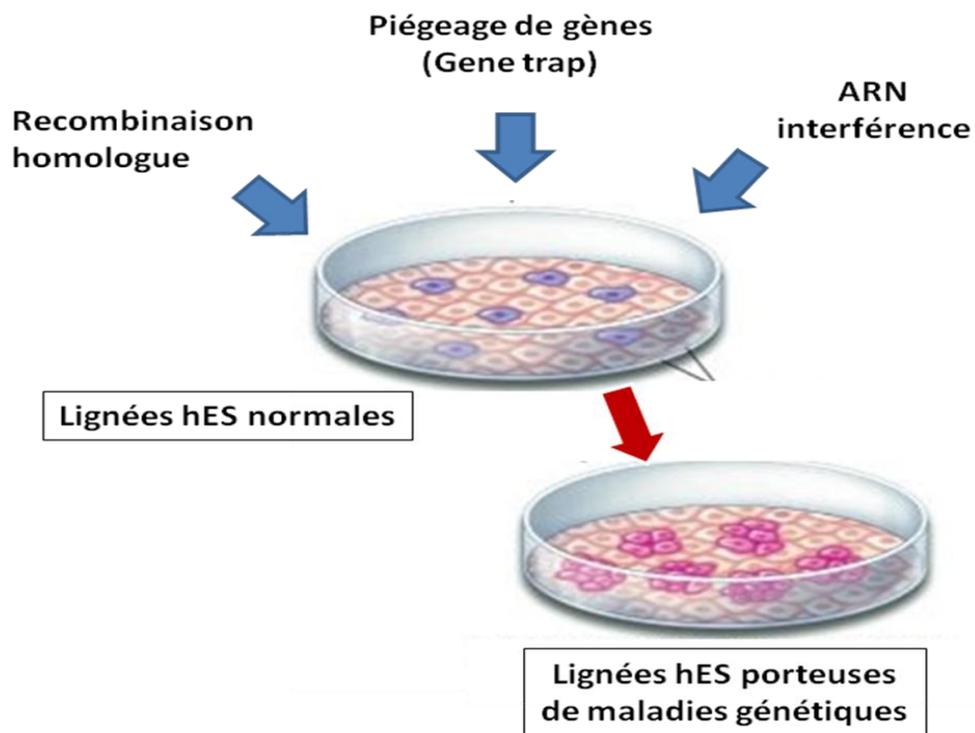
De manière plus générale, l'étude des profils d'expression génique par transcriptome sur puces à ADN a largement contribué à l'identification de groupes de gènes impliqués dans la différenciation des cellules hES au cours de la formation des EB ou au cours de différenciation spécifique de lignage. En utilisant cette stratégie, nous avons pu identifier des profils d'expression génique et la modulation des voies de signalisation différentielle dans 2 types de progéniteurs, neuraux et mésodermaux, obtenus à partir des cellules hES. Ces résultats seront présentés plus loin dans l'article I.

D'autres mécanismes cellulaires régulés au cours du développement ont été étudiés grâce à l'utilisation de cellules pluripotentes incluant les mécanismes génétiques et épigénétiques, la régulation par les microARNs et les voies de signalisation.

#### **4. Modélisation pathologique**

La modélisation pathologique permet d'étudier les mécanismes physiopathologiques et de rechercher de nouvelles cibles thérapeutiques pour une maladie donnée. L'existence de lignées hES mutantes spontanées ou artificielles permet d'envisager la modélisation pathologique de nombreuses maladies monogéniques. Elles peuvent être obtenues de plusieurs façons :

- par modifications génétiques : une mutation est introduite dans des cellules ES dérivées d'un embryon surnuméraire normal.



**Figure 35 : Principe de la création de lignées hES mutantes pour la modélisation pathologique des maladies monogéniques.**

- par dérivation à partir d'un embryon porteur d'une mutation identifiée dans le cadre d'un diagnostic préimplantatoire (DPI).
- par reprogrammation directe à partir de tissus de patients (iPS spécifiques de patients).

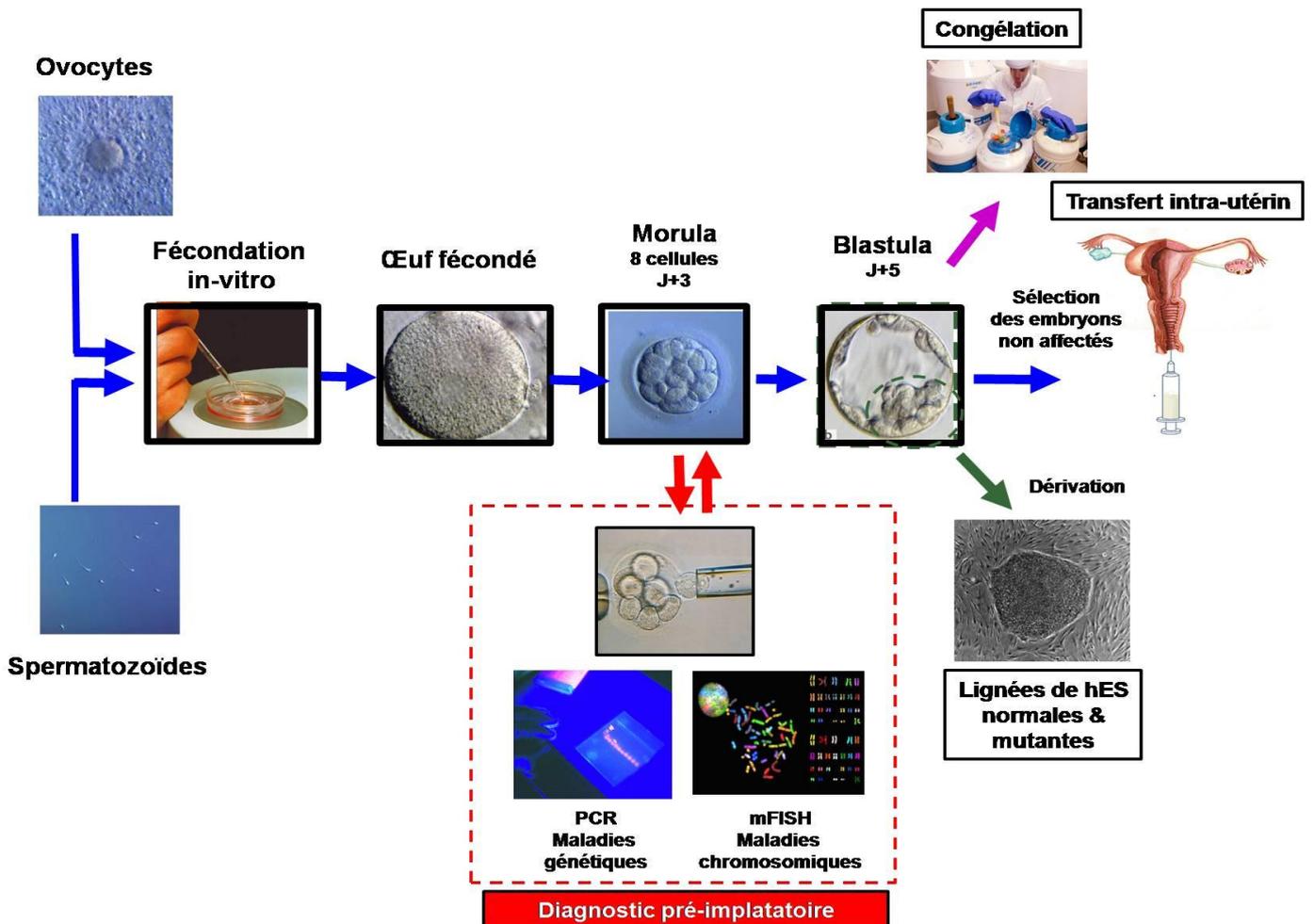
#### **4.1 Les cellules hES normales modifiées par génie génétique**

Le transfert de gènes dans les cellules ES permet de produire des souris transgéniques afin de tester leurs fonctions à l'échelle d'un animal entier. Pour des raisons évidentes, cette technique est impossible à transférer à l'Homme, en revanche il est possible, comme pour toutes lignées, de modifier les cellules hES par génie génétique (Eiges et al., 2001; Ma et al., 2003; Pfeifer et al., 2002; Zwaka and Thomson, 2003). Ces manipulations sont considérées d'un point de vue légal comme un organisme génétiquement modifié dont les exigences diffèrent principalement en fonction des moyens mis en œuvre pour le transfert de gènes et surtout du type de transgène mais finalement peu du type de cellules modifiées.

L'une des applications immédiates de ces manipulations génétiques est la possibilité de créer, à partir des cellules hES normales, des lignées porteuses d'une maladie génétique (Friedrich Ben-Nun and Benvenisty, 2006). Les modèles de maladies génétiques dominantes dues à une mutation de type gain de fonction peuvent être créés simplement en introduisant dans les cellules ES le gène malade alors que pour les maladies récessives dues à une mutation de type perte de fonction, il faut cibler les 2 allèles d'un gène. Cela peut être réalisé soit en insérant une mutation dirigée par recombinaison homologue ou par la technique du piégeage de gènes, soit en éteignant l'expression d'un gène cible par ARN interférence. (Tenzen et al. 2010) (**Figure 35**). Plusieurs modèles cellulaires ont ainsi été créés par cette technique. Par exemple dans le syndrome de Lesch Nyhan, des cellules hES normales ont été modifiées en introduisant une mutation dans le gène causal de la maladie, le gène *HPRT1* (Urbach and Benvenisty, 2009; Zwaka and Thomson, 2003).

#### **4.2 Les lignées de cellules ES mutantes porteuses d'anomalies génétiques**

Ces lignées de cellules souches sont dérivées dans le cadre d'une procédure médicalement assistée associant fécondation *in vitro* (FIV) et diagnostic préimplantatoire (DPI). Cette technique permet à un couple ayant un risque important (25-50%) de transmettre une maladie génétique grave et incurable de pouvoir donner naissance à un enfant exempt de la maladie. La procédure générale est celle de la FIV avec un DPI réalisé au stade morula (8 cellules). Un



**Figure 36 : Origine des lignées de cellules souches embryonnaires mutantes.**

Au cours de la fécondation *in vitro* (flèche bleue), les ovocytes et les spermatozoïdes sont mis en contact dans une boîte de pétri en présence du milieu de culture adapté. L'embryon évolue jusqu'au stade blastocyste (5<sup>ème</sup> jour). Les embryons choisis sont transférés par insémination artificielle dans l'utérus receveur et la grossesse peut alors se poursuivre. Les embryons surnuméraires sont soit congelés (flèche violette), soit détruits et dans ce dernier cas ils peuvent servir à établir une lignée de cellules hES (flèche verte) après recueil du consentement éclairé du couple. Lors du diagnostic préimplantatoire (flèche rouge), un blastomère peut être biopsié au stade 8 cellules et analysé par des méthodes de PCR ou de mFISH afin de détecter la présence respectivement d'une maladie génétique ou chromosomique, c'est ce que l'on appelle le diagnostic pré-implantatoire. Les embryons avec 7 blastomères se développent normalement jusqu'au stade blastocyste et les embryons exempts de la maladie sont inséminés permettant la naissance d'enfant non atteint.

blastomère est prélevé et analysé par une méthode de biologie moléculaire afin de détecter les embryons porteurs de la maladie recherchée. Les embryons qui ne sont pas réimplantés peuvent être utilisés dans un but de recherche et notamment pour la dérivation de lignée de cellules hES mutantes (**Figure 36**).

Certaines de ces pathologies « graves et incurables » sont plus fréquemment testées que d'autres du fait notamment de l'existence de moyen diagnostic en terme de rapidité, fiabilité et de la compatibilité de ces techniques de biologie moléculaire avec l'utilisation d'une seule cellule pour le test.

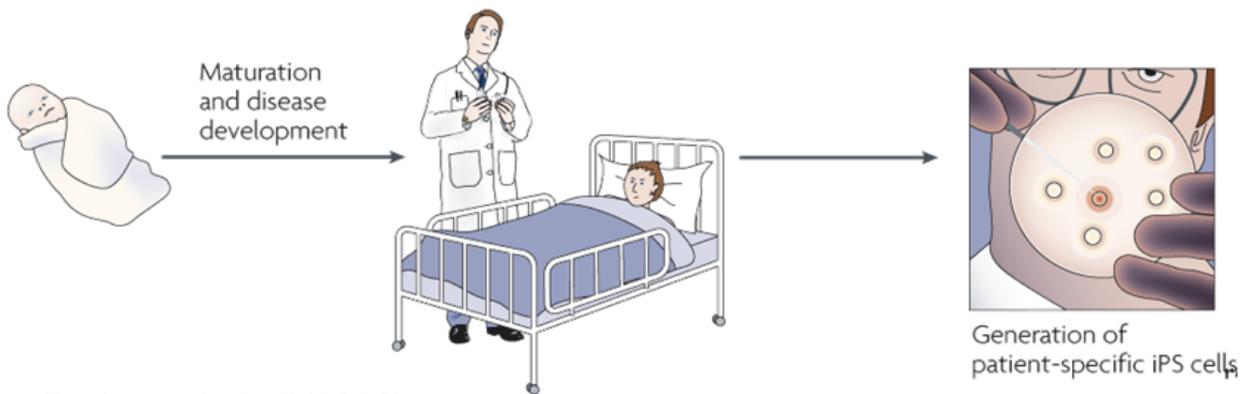
Cette technologie a permis d'obtenir des lignées de cellules souches hES mutantes principalement pour les maladies couramment testées dans le cadre du DPI, telles que la mucoviscidose, la myopathie de Duchenne, le syndrome de l'X fragile, la chorée de Huntington et la Dystrophie Myotonique de type I présentée dans le cadre de cette thèse. (Frumkin et al.; Mateizel et al., 2006; Pickering et al., 2005; Verlinsky et al., 2005).

#### **4.3 Les cellules induites à la pluripotence spécifiques de patients**

La possibilité d'induire expérimentalement la pluripotence par reprogrammation directe de fibroblastes ou de lymphocytes de patients, cellules facilement accessibles, permet d'étendre de manière considérable la possibilité de créer des modèles cellulaires de maladies génétiques humaines. Chaque clone d'iPS généré à partir des cellules d'un patient spécifique permet d'envisager l'obtention de plusieurs sous-modèles cellulaires donnant ainsi la possibilité de tenir compte de l'âge, du sexe mais aussi et surtout du type de mutation.

Très rapidement, plusieurs équipes, dont celles de Georges Q. Daley à l'hôpital pédiatrique de Boston, ont dérivé des clones d'iPS en reprogrammant principalement des fibroblastes de patients en utilisant la méthode lentivirale avec les 4 facteurs (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *cMYC*) (Park et al., 2008). Ce premier papier fait état de l'établissement d'une première banque de lignées iPS obtenue pour une dizaine de maladies génétiques (**Tableau 5**).

Trois autres études rapportent la description de cellules iPS spécifiques de patients. Les 2 premières concernent des iPS de maladies de l'adulte affectant le motoneurone, la sclérose latérale amyotrophique (Dimos et al., 2008) et l'atrophie musculaire spinale (Ebert et al., 2009). Dans la première étude, aucune différence n'est observée entre les lignées normales et mutées alors que la seconde révèle la dérégulation du gène impliqué dans la maladie (*SMN*, codant un facteur de survie du motoneurone). Dans cette même étude, les auteurs montrent



Park, et al. *Cell* (2008).

**Table 1. iPS Cells Derived from Somatic Cells of Patients with Genetic Disease**

Name	Disease	Molecular Defect
ADA	ADA-SCID	GGG > AGG, exon 7 and Del(GAAGA) exon 10, <i>ADA</i> gene
GD	Gaucher disease type III	AAC > AGC, exon 9, G-insertion, nucleotide 84 of cDNA, <i>GBA</i> gene
DMD	Duchenne muscular dystrophy	Deletion of exon 45–52, <i>dystrophin</i> gene
BMD	Becker muscular dystrophy	Unidentified mutation in <i>dystrophin</i>
DS1, DS2	Down syndrome	Trisomy 21
PD	Parkinson disease	Multifactorial
JDM	Juvenile diabetes mellitus	Multifactorial
SBDS	Swachman-Bodian-Diamond syndrome	IV2 + 2T > C and IV3 – 1G > A, <i>SBDS</i> gene
HD	Huntington disease	72 CAG repeats, <i>huntingtin</i> gene
LNSc	Lesch-Nyhan syndrome (carrier)	Heterozygosity of <i>HPRT1</i>

**Tableau 5 : Génération des iPS et exemples de maladies pour lesquelles il existe un modèle iPS spécifique de patients.**

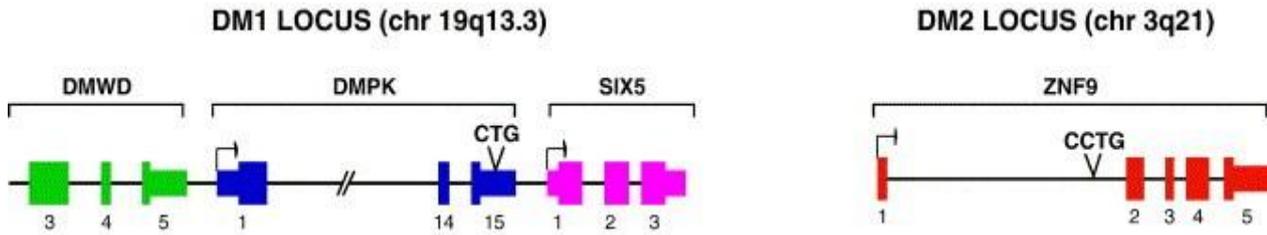
(D'après Park, 2008).

également que l'acide valproïque et la trobramycine, deux molécules connues pour stimuler l'expression du gène *SNM*, permettaient de rétablir des niveaux d'expression normale. La dernière étude récemment publiée par le groupe de Lorentz Studer porte sur la dérivation d'iPS pour une maladie congénitale affectant les cellules des crêtes neurales, la dysautonomie familiale (Lee et al., 2009a). Ces travaux sont les premiers à rapporter réellement un phénotype. Les iPS mutantes ont été différenciées en cellules des crêtes neurales puis en neurones sympathiques. Les auteurs ont pu montrer que cette différenciation terminale était altérée reproduisant le phénotype observé chez les patients. De plus, la réalisation d'un crible de composés chimique a permis d'identifier de nouvelles molécules potentiellement thérapeutiques démontrant pour la première fois l'intérêt de ces cellules pour une modélisation pathologique et comme modèle cellulaire utile pour la découverte de nouveaux composés thérapeutiques dans le cadre de criblage à haut débit.



**2<sup>ème</sup> Partie :**

**La dystrophie myotonique de type 1  
(ou maladie de Steinert).**



**Figure 37 : Les deux gènes responsables de la dystrophie myotonique de type 1 (DM1) et de type 2 (DM2).**

Disease	Mutation/ repeat unit	Gene name (protein product)	Putative function	Normal repeat length	Pathogenic repeat length
<b>Diseases that are caused by loss of protein function</b>					
FRDA	(GAA) <sub>n</sub>	<i>FRDA</i> (frataxin)	Mitochondrial iron metabolism	6–32	200–1,700
FRAXA	(CGG) <sub>n</sub>	<i>FMR1</i> (FMRP)	Translational regulation	6–60	>200 (full mutation)
FRAXE	(CCG) <sub>n</sub>	<i>FMR2</i> (FMR2)	Transcription?	4–39	200–900
<b>Diseases that are caused by altered protein function</b>					
SCA1	(CAG) <sub>n</sub>	<i>SCA1</i> (ataxin 1)	Transcription	6–39	40–82
SCA2	(CAG) <sub>n</sub>	<i>SCA2</i> (ataxin 2)	RNA metabolism	15–24	32–200
SCA3 (MJD)	(CAG) <sub>n</sub>	<i>SCA3</i> (ataxin 3)	De-ubiquitylating activity	13–36	61–84
SCA6	(CAG) <sub>n</sub>	<i>CACNA1A</i> ( <i>CACNA1<sub>α</sub></i> )	P/Q-type $\alpha$ 1A calcium channel subunit	4–20	20–29
SCA7	(CAG) <sub>n</sub>	<i>SCA7</i> (ataxin 7)	Transcription	4–35	37–306
SCA17	(CAG) <sub>n</sub>	<i>SCA17</i> (TBP)	Transcription	25–42	47–63
DRPLA	(CAG) <sub>n</sub>	<i>DRPLA</i> (atrophin 1)	Transcription	7–34	49–88
SBMA	(CAG) <sub>n</sub>	<i>AR</i> (androgen receptor)	Steroid-hormone receptor	9–36	38–62
HD	(CAG) <sub>n</sub>	<i>HD</i> (huntingtin)	Signalling, transport, transcription	11–34	40–121
<b>Diseases that are caused by altered RNA function</b>					
DM1	(CTG) <sub>n</sub>	<i>DMPK</i> (DMPK)	RNA-mediated	5–37	50–1,000
DM2	(CCTG) <sub>n</sub>	<i>ZNF9</i> (ZNF9)	RNA-mediated	10–26	75–11,000
FXTAS	(CGG) <sub>n</sub>	<i>FMR1</i> (FMRP)	RNA-mediated	6–60	60–200 (premutation)
<b>Diseases of unknown pathogenic mechanism(s)</b>					
SCA8	(CTG) <sub>n</sub>	<i>SCA8</i> (transcribed/untranslated)	Unknown	16–34	>74
SCA10	(ATTCT) <sub>n</sub>	Unknown	Unknown	10–20	500–4,500
SCA12	(CAG) <sub>n</sub>	<i>PPP2R2B</i> (PPP2R2B)	Phosphatase regulation	7–45	55–78
HDL2	(CTG) <sub>n</sub>	<i>JPH3</i> (junctophilin 3)	PM/ER junction protein	7–28	66–78

*CACNA1A*, calcium channel, voltage-dependent, P/Q type,  $\alpha$ 1A subunit; *DMPK*, dystrophia myotonica protein kinase; DRPLA, dentatorubral-pallidoluysian atrophy; DM, dystrophia myotonica; ER, endoplasmic reticulum; FRDA, Friedreich ataxia; FMRP, fragile X mental retardation protein; *FMR1*, fragile X mental retardation 1; *FMR2*, fragile X mental retardation 2; FXTAS, fragile X tremor/ataxia syndrome; HD, Huntington disease; HDL2, Huntington disease-like 2; MJD, Machado-Joseph disease; PM, plasma membrane; *PPP2R2B*, protein phosphatase 2 (formerly 2A) regulatory subunit B; SBMA, spinal and bulbar muscular atrophy; SCA, spinocerebellar ataxia; TBP, TATA box binding protein; *ZNF9*, zinc-finger protein 9.

**Figure 38 : Exemples de maladies caractérisées par une mutation instable.**

(D'après Gatchel, 2005).

Les premiers cas identifiés de dystrophie myotonique (DM) furent décrits en 1909 par le médecin allemand Hans Steinert et une équipe de médecins anglais Batten et Gibb. Cette maladie était présentée comme une entité clinique combinant une myotonie, c'est-à-dire une lenteur de décontraction des muscles associée à une faiblesse musculaire. Aux fils des années, de nombreux symptômes non-musculaires furent décrits sans lien évident entre eux, le tableau clinique comprenant une atteinte, cardiaque, oculaire, endocrinienne et du système nerveux central définissant une maladie multisystémique.

Il existe 2 types de DM, la dystrophie myotonique de type 1 (DM1), également appelée maladie de Steinert et la dystrophie myotonique de type 2 (DM2) ou dystrophie myotonique proximale (PROMM). Elles sont très proches sur le plan clinique mais elles sont causées par des mutations touchant des gènes différents (**Figure 37**).

### **I. Aspects génétiques**

Le gène responsable de la DM1 a été identifié en 1992. Il s'agit du gène *DMPK* qui est localisé sur le chromosome 19 (locus 19q13.3). Cette mutation consiste en une répétition d'un motif de trois nucléotides CTG qui est anormalement augmentée dans la partie 3' non traduite de l'exon 15. (Brook et al., 1992; Buxton et al., 1992; Fu et al., 1992; Harley et al., 1992a; Harley et al., 1992b; Mahadevan et al., 1992). Le nombre de ces répétitions varie entre 5 et 38 dans la population générale et on observe de 50 à 4000 répétitions chez les patients DM1. Une seconde mutation, suspectée par des études de liaisons génétiques a été identifiée en 2001 (Day et al., 1999; Ranum et al., 1998). Il s'agit d'une expansion du quadruplet CCTG qui est localisée dans l'intron 1 du gène *ZNF9* (locus 3q21). Cette mutation est responsable de la DM2 et on observe chez ces patients de 70 à près de 11000 répétitions (Liquori et al., 2001).

Ce type de mutation est appelé mutation instable ou dynamique et se caractérise par une augmentation de la taille des expansions nucléotidiques d'une génération à l'autre. Une vingtaine de maladies, souvent neuromusculaires ou neurologiques, présentent ce type de mutation et partagent certaines caractéristiques génétiques communes (**Figure 38**). La plupart de ces maladies, dont la DM1, sont transmises sur un mode dominant à pénétrance incomplète et expressivité variable et elles ne suivent généralement pas les règles de transmission mendélienne. En effet, il existe le plus souvent un phénomène d'anticipation, c'est-à-dire que la sévérité de la maladie augmente au fil des générations avec des symptômes qui apparaissent de



plus en plus tôt au cours de la vie des malades. Ce phénomène est également connu sous le terme de paradoxe de Sherman.

Dans la suite de cette thèse, nous nous concentrerons uniquement sur la DM1.

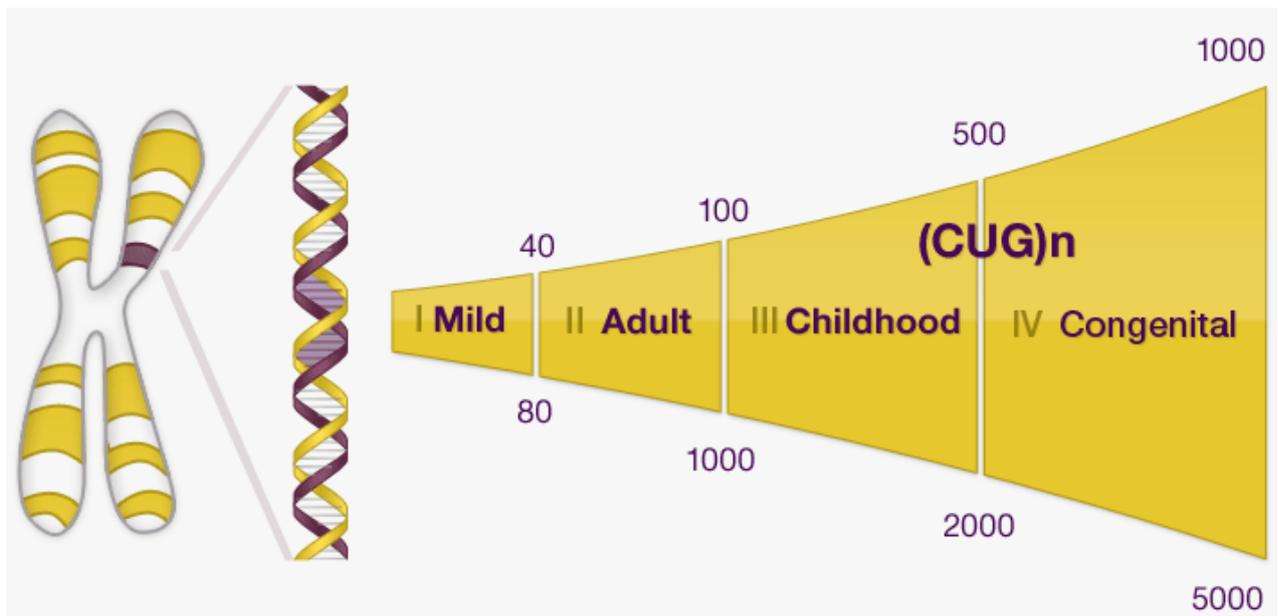
Dans la DM1, il existe un biais de transmission qui dépend de la taille des répétitions CTG et du sexe du parent transmetteur. Dans le cas de répétitions de plus de 500 CTG, la taille augmente uniquement si la transmission est maternelle pouvant conduire à des formes sévères - dit congénitales- de la maladie (voir chapitre III). A l'inverse, la taille des expansions a tendance à diminuer si la transmission est paternelle. Ce mécanisme pourrait s'expliquer par une sélection au moment de la spermatogénèse qui éliminerait les cellules portant de grandes expansions (Brunner et al., 1993). Ainsi, il est exceptionnel que le père puisse transmettre une forme congénitale de la maladie bien que quelques cas isolés aient été décrits (Zeesman et al., 2002). Enfin, dans le cas de petites répétitions CTG (inférieure à 100), l'amplification à la génération suivante est plus importante si la transmission est paternelle.

On observe aussi chez les patients DM1, un phénomène de mosaïsme dû à l'instabilité somatique. Cela signifie que toutes les cellules de l'organisme ne possèdent pas le même nombre de répétitions CTG. Ce phénomène est plus ou moins marqué en fonction des tissus, par exemple il semble particulièrement important dans le muscle, mais il est présent également dans d'autres tissus comme dans le cerveau. Ce mécanisme d'extension des triplets semble se produire dès le stade embryonnaire (Martorell, 1997) et continuerait au moins jusqu'à la naissance (Pearson, 2005). On retrouve aussi bien ce phénomène dans les tissus à division rapide que dans des tissus qui ne se renouvellent pas. Cela signifie qu'il ne semble pas influencé par la mitose.

Les mécanismes physiopathologiques associés à la l'instabilité des répétitions CTG qui entraînent l'augmentation des répétitions CTG sont encore peu connus mais impliqueraient des protéines de réparation des mésappariements de l'ADN (Savouret et al., 2003). Nous en reparlerons plus loin dans les stratégies thérapeutiques de la DM1.

## **II. Epidémiologie**

La répartition géographique de la maladie est mondiale et représente la plus fréquente des dystrophies musculaires de l'adulte. Sa prévalence est estimée à 1 sur 7400 mais elle s'élève à 1 sur 550 dans la population du nord-est du Québec dans les régions de Charlevoix et de Saguenay-Lac St Jean. Des études génétiques réalisées sur des familles DM1 de ces régions ont



**Figure 39 : La relation génotype-phénotype et les différentes formes cliniques de la maladie.**

La taille des répétitions (CUG) $n$  est corrélée avec les différentes formes de la maladie.



**Figure 40 : Présentation d'une famille de malades DM1.**

Une mère, au centre, et ses deux enfants âgés de 17 et 15 ans porteurs d'une forme congénitale de DM1.

révélé un effet fondateur descendant d'un même couple immigré au Canada au XVII<sup>e</sup> siècle (Mathieu et al., 1990; Yotova et al., 2005). Deux facteurs ont contribué à l'amplification de la maladie. Le premier est le taux de fécondité particulièrement élevé chez la population du Saguenay qui comprenait quelques centaines d'habitants en 1840. Ce chiffre est passé à 280000 durant la décennie 1980. Le second facteur est le faible taux de migration.

### **III. Aspects cliniques**

Aujourd'hui, il est courant de classer les patients en 4 groupes : les formes bénignes, classiques, juvéniles et congénitales. La sévérité du tableau clinique est d'autant plus grande que la période d'apparition des premiers symptômes est précoce. La taille des répétitions CTG est corrélée positivement avec la sévérité du tableau clinique mais la relation génotype-phénotype n'est pas parfaite (**Figure 39**).

#### **3.1 formes bénignes :**

Le tableau clinique est asymptomatique ou pauci-symptomatique, caractérisé seulement par une cataracte et parfois une calvitie frontale précoce avec éventuellement un déficit musculaire minime. Toutefois, le risque d'atteinte cardiaque n'est pas négligeable et impose une surveillance. Cette forme constitue un réservoir de pré-mutation qui représente la source de transmission vers des formes plus graves de la maladie et comme nous l'avons déjà vu ce sont les pères qui ont tendance à transmettre les répétitions les plus grandes.

#### **3.2 formes classiques :**

Les symptômes de la forme classique de la maladie débutent chez l'adulte entre 30 et 40 ans et sont très variables, regroupant de nombreux troubles d'ordre musculaire, qui associés à une calvitie précoce et un prominauris (grandes oreilles décollées) donne au visage un aspect très particulier évocateur du diagnostic (**Figure 40**). Dans cette forme, ce sont les symptômes musculaires qui prédominent, mais il existe aussi des troubles cardiaques, respiratoires, digestifs, psychiatriques et endocriniens.

- **les anomalies des muscles squelettiques** : elles sont courantes et caractérisées par une myotonie (lenteur de décontraction des muscles à la suite d'une contraction volontaire ou provoquée, notamment au niveau des mains) associée à une dystrophie



(dégénérescence atrophiante avec perte de force musculaire). L'atteinte des muscles de la face et du cou est souvent précoce, à l'origine d'un affaissement oblong des traits avec hypomimie (aspect figé, inexpressif du visage). Le ptôsis est fréquent. Les muscles masticateurs (temporaux et masséters) sont atrophiques et peuvent entraîner des troubles stomatologiques. Le déficit musculaire amyotrophiant des membres prédomine au niveau distal (contrairement à la DM2), de façon non sélective, bilatérale et symétrique. Elle entraîne des difficultés d'exécution des tâches nécessitant une dextérité fine. Aux membres inférieurs, ce déficit peut entraîner une difficulté à la marche due à une atrophie des muscles élévateurs du pied (steppage). La musculature cervicale est également touchée allant parfois jusqu'à une "tête tombante". Enfin, le muscle du diaphragme et des muscles oropharyngés peuvent également être atteints définissant des anomalies respiratoires pouvant entraîner des détresses respiratoires sévères et des pneumopathies infectieuses secondaires à l'encombrement broncho-pulmonaire.

- **les anomalies cardiaques** : elles sont présentes chez plus de 80% des malades et peuvent inclure une cardiomyopathie dilatée associée ou non à une dysfonction systolique ventriculaire et le plus souvent des anomalies de conduction auriculo-ventriculaire ou intraventriculaire objectivées sur l'électrocardiogramme par une prolongation de l'intervalle PR et un espacement du complexe QRS. Ces arythmies peuvent causer une mort subite dans 10 à 30% des cas (Bhakta et al., 2004; Cudia et al., 2009; Groh et al., 2008; Hiromasa et al., 1988; Pelargonio et al., 2002; Schara and Schoser, 2006).
- **l'atteinte endocrinienne** : elle inclue une atrophie testiculaire et un hypogonadisme primaire lié à une élévation de l'hormone folliculostimulante responsable d'une azoospermie fréquente, de l'ordre de 70% chez l'homme (Mastrogiamaco et al., 1996; Mastrogiamaco et al., 1994)(Mastrogiamaco, Pagani et al. 1994; Mastrogiamaco, Bonanni et al. 1996.) Les anomalies chez la femme sont moins fréquentes de l'ordre de 15 à 20 % et caractérisées par des dysménorrhées et une ménopause précoce. Les avortements spontanés sont fréquents de même que les accouchements prématurés avec des présentations dystociques d'où le recours le plus souvent à l'accouchement par césarienne. Une autre anomalie endocrinienne concerne les troubles du métabolisme des glucides avec souvent une intolérance aux sucres voir un diabète non insulino-dépendant, d'incidence 4 fois supérieure à la population générale (Matsumura et al., 2009)



- **l'atteinte oculaire et auditive** : elle est quasiment constante après 40 ans. Elle concerne l'apparition précoce d'une cataracte sous-capsulaire postérieure bilatérale caractérisée par des opacités cristalliniennes multicolores qui augmentent en nombre et en taille pour devenir diffuses. Par ailleurs, l'atrophie des muscles ciliaires de l'œil explique probablement l'hypotension intraoculaire et celle du muscle releveur des paupières, le ptosis. On observe aussi un blépharospasme du a une contraction spasmodique du muscle orbiculaire des paupières ainsi qu'une diplopie, des anomalies iridiennes et des lésions cornéennes. L'atteinte de l'appareil auditif est fréquente et probablement d'origine centrale.
- **l'atteinte digestive** : elle est parfois très gênante pour les malades et concerne une diminution de la motilité digestive se traduisant par une dysphagie, un reflux gastro-œsophagien, une constipation et une lithiase biliaire. L'atteinte des muscles du pharynx peut être responsable de fausses routes et d'une pneumopathie de déglutition.
- **l'atteinte osseuse** : elle concerne des déformations pouvant affecter le rachis (cyphoscoliose), le thorax (déformation en entonnoir ou en carène) et les mandibules (rétrognathisme).
- **l'atteinte du système nerveux** : elle est maintenant reconnue et commence à être bien documentée par des études psychiatriques des patients DM en particulier du type 1. Elle associe une fatigue et une hypersomnie diurne avec inversion du rythme nyctémérale (Laberge et al., 2009), des troubles cognitifs notamment de la mémoire immédiate, de l'abstraction et de l'orientation ainsi que des troubles de l'humeur comprenant apathie, indifférence, des troubles obsessionnel-compulsifs et parfois une agressivité voir des dépressions. Une atteinte des fonctions exécutives et des troubles visiospatiaux est également observée (Modoni et al., 2004; Modoni et al., 2008). L'imagerie cérébrale révèle dans certains cas des anomalies de la substance blanche et/ou une atrophie cortico sous-corticale. Au niveau histologique, des pertes neuronales dans certaines régions du cerveau ont été décrites et sont parfois associées à une dégénérescence neurofibrillaire due à l'accumulation intracellulaire de certaines formes anormalement phosphorylées de la protéine Tau (comme dans la maladie d'Alzheimer) (Maurage et al., 2005; Oyamada et al., 2006; Sergeant et al., 2001; Vermersch et al., 1996). De plus, une équipe a mis en évidence une augmentation de la forme totale de la protéine Tau dans le liquide céphalorachidien des malades DM1 ainsi qu'une diminution de la forme A $\beta$ 1-42, un produit de clivage de la protéine APP, également impliquée dans la



physiopathologie de la maladie d'Alzheimer (Winblad et al., 2008). L'atteinte du système nerveux périphérique autonome est discutée mais on peut observer chez ces

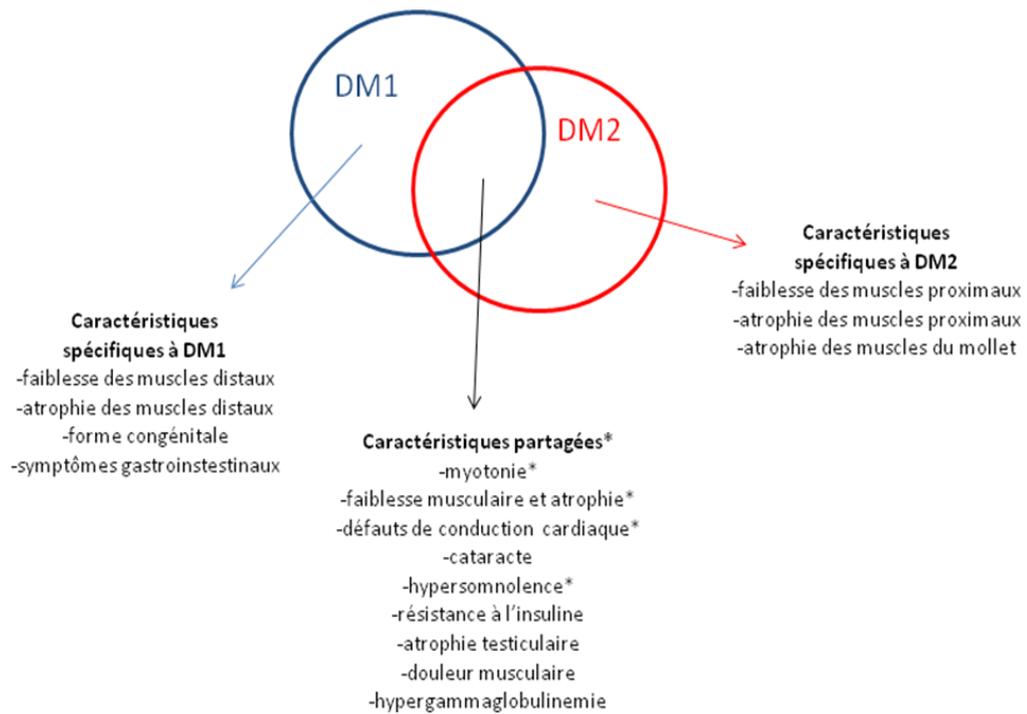
- patients une hypersudation, une hyper-salivation, une augmentation du larmoiement dans un tableau ressemblant à un syndrome cholinergique muscarinique. **l'atteinte cutanée** : elle concerne la calvitie frontale précoce qui est présente chez près de 80% des patients masculins et rarement chez la femme. Il a également été rapporté des cas de pilomatricome, tumeur cutanée bénigne et d'épithéliome pouvant apparaître sur le cuir chevelu (Geh, 1999; Baltogiannis, 2005).
- **anomalies biologiques** : on note parfois une hypogammaglobulinémie non expliquée spécifique des IgG. La glycémie à jeun ou après absorption de glucose peut révéler une intolérance aux sucres, voir un diabète de type II. Les gamma-GT et les phosphatases alcalines sont augmentées chez 50 % des patients sans lésion organique hépatique sous-jacente.

### **3.3 Formes juvéniles**

Le diagnostic est difficile car les symptômes sont souvent négligés par les enfants et les adolescents dans un contexte parfois sans antécédents familiaux. Il existe une faiblesse des muscles du visage, sans éversion de la lèvre supérieure. L'atteinte musculaire peut prendre la forme classique ou être paradoxalement plus discrète. En revanche, les troubles du comportement sont au premier plan avec des difficultés d'apprentissage, un retard scolaire constant et des problèmes d'insertion sociale. L'atteinte cardiaque représentée par des troubles rythmiques de conduction favorisés par l'effort peut être révélatrice dès l'âge de 10 ans de ces formes cliniques avec un risque de mort subite imposant un suivi cardiologique fréquent (Machuca-Tzili et al., 2005).

### **3.4 Formes congénitales**

La forme congénitale de la maladie n'est pas une forme sévère de la DM1 classique mais représente un phénotype clinique distinct avec des symptômes particuliers. Avant la naissance, il existe un polyhydramnios (présence excessive de liquide amniotique) et on observe des mouvements fœtaux réduits ainsi qu'une arthrogrypose (raideur articulaire). Les nourrissons sont hypotoniques et présentent une faiblesse musculaire généralisée. Au niveau du visage, on note souvent que la lèvre supérieure est éversée témoignant de la sévérité de la faiblesse des muscles du visage. Les problèmes respiratoires sont majeurs pendant la phase post-natale



**Figure 41 : Caractéristiques cliniques des myotonies dystrophiques.**

\* Symptômes présents dans les formes DM2 mais plus proéminents dans DM1.

(D'après Cho et al. 2007).

pouvant entraîner la mort dans 16 % des cas et les fonctions motrices sont très perturbées rendant l'alimentation difficile. Les nourrissons qui survivent à cette phase aiguë présentent ultérieurement une amélioration des fonctions motrices et ils peuvent avaler et respirer par eux-mêmes. Au cours de l'enfance, on constate un retard de la croissance et du développement cognitif et moteur mais la marche est acquise. Les malades présentent tous des difficultés d'apprentissage nécessitant des dispositions scolaires particulières. Une myopathie peut apparaître mais elle est tardive et d'évolution lente par contre, ce sont les problèmes cardiaques qui sont les plus graves en particulier à partir de la trentaine (Machuca-Tzili et al., 2005).

Les différences observées entre la DM1 et la DM2 permettent de déterminer les symptômes spécifiques associés à l'une ou à l'autre des 2 mutations (**Figure 41**).

#### **IV. Pronostic**

Comme nous l'avons vu, cette maladie présente un tableau clinique extrêmement varié, y compris au sein d'une même famille. Habituellement, l'évolution est progressive mais une dégradation rapide parfois à la faveur d'une infection ou d'une chirurgie peut être observée. La capacité de travail est limitée à terme chez 70 % des patients. L'espérance de vie est raccourcie due à une mortalité accrue par complications pulmonaires et cardiaques. Le pronostic, toutes formes confondues, dépend essentiellement du risque de mort subite (par trouble du rythme ou de conduction).

#### **V. Diagnostic**

Le diagnostic est suspecté sur les signes cliniques et/ou l'histoire familiale mais le diagnostic de certitude est apporté par la biologie moléculaire. La PCR est utilisée pour détecter des petites expansions (<300CTG) et la détection des expansions de plus grandes tailles se fait par Southern-Blot après digestion de l'ADN génomique par des enzymes de restriction ou par pool-PCR si l'on désire augmenter la précision sur la taille de l'expansion CTG. Ce diagnostic génétique est possible dans le cadre d'un diagnostic préimplantatoire, dans quelques centres spécialisés, ce qui permet en outre de procéder au transfert sélectif d'embryons dépourvus de l'anomalie génétique ou dans le cadre d'un diagnostic anténatal sur biopsie de trophoblaste réalisée à 12 semaines d'aménorrhée. Une procédure d'accompagnement de conseil génétique est nécessaire dans tous les cas.



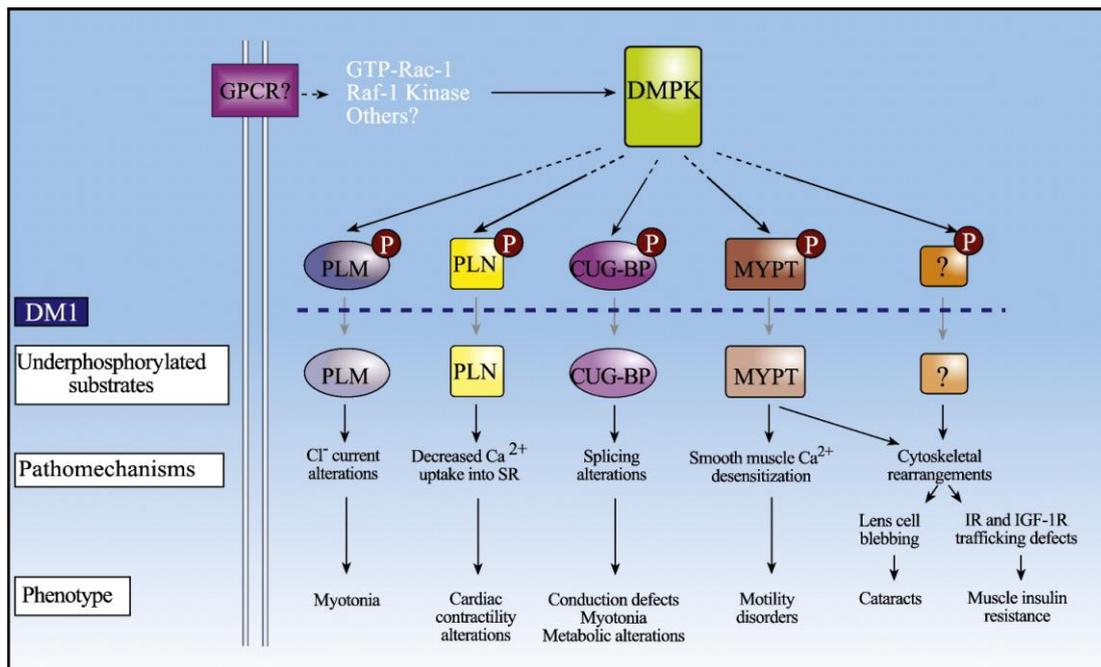
## **VI. Mécanismes physiopathologiques proposés dans DM1**

Trois modèles physiopathologiques reliant l'expansion des triplets aux manifestations cliniques de DM1 ont été proposés : (1) l'haploinsuffisance de la DMPK ; (2) la diminution d'expression des gènes proches de la DMPK ; (3) le gain de fonction toxique de l'ARNm mutant.

### **6.1 Haploinsuffisance de la DMPK**

Les premières études qui ont tenté de relier l'extension de triplets à la pathologie révélèrent une diminution de la quantité d'ARNm de la *DMPK* dans différents tissus provenant de patients DM1 (Carango et al., 1993; Fu et al., 1993; Hofmann-Radvanyi et al., 1993; Koga et al., 1994; Novelli et al., 1993; Wang et al., 1995). La quantité de la protéine DMPK était également diminuée dans le tissu musculaire squelettique et le myocarde mais cette diminution semblait indépendante de la taille des expansions (Maeda, 1995 ; Salvatori, 2005; Salvatori, 2005; Salvatori, 2005). Dans ce modèle, l'allèle contenant la répétition CTG empêche l'export de l'ARNm hors du noyau ce qui conduit à la diminution de la quantité d'ARNm et de la protéine entraînant une perte de fonction (Salvatori et al., 2005). Afin d'explorer cette hypothèse, des souris dont le gène *DMPK* a été invalidé ont été générées. Elles présentent des anomalies de conduction des canaux sodiques et calciques dans les muscles squelettiques et cardiaques et une myopathie mais celle-ci est d'intensité modérée. Elle apparaît tardivement et il n'y a pas de myotonie (Berul et al., 1999; Jansen et al., 1996; Reddy et al., 1996).

D'autres études ont tenté de mieux comprendre la fonction de la DMPK afin d'associer sa perte de fonction partielle due à l'haploinsuffisance, aux éventuels mécanismes participant à la physiopathologie de la DM1. La voie de signalisation de la DMPK est encore très peu connue mais on sait que cette protéine kinase est activée par la voie des Rho-GTPase (Rac-1 et Raf-1) (Shimizu et al., 2000). Récemment, une étude par la spectrométrie de masse a identifié différentes protéines interagissant avec la DMPK du muscle squelettique de rat dont des petites molécules de choc thermique comme HSB5, HSP25/HSPB1 et l' $\alpha$ -B cristallin mais le rôle de ces protéines dans la fonction de la DMPK reste inconnu (Forner et al.). Par ailleurs, en aval de la DMPK, certains de ses substrats dont plusieurs sont communs avec la protéine kinase C



**Figure 42 : Mécanisme physiopathologique proposé dans la DM1 impliquant la DMPK.**

L'activité kinase de la DMPK est induite par la liaison des GTPase Rac-1 et de la kinase Raf-1. Les récepteurs membranaires couplés aux protéines G (GPCR) sont impliqués dans cette signalisation mais sont encore inconnus. La DMPK est connue pour phosphoryler plusieurs cibles qui incluent le phospholemnan (PLM); le phospholamban (PLN); la protéine d'épissage CUG-binding protein (CUGBP) ; la Myosin Phosphatase-1 (MYPT1). Dans l'hypothèse de l'haplo-insuffisance de la DMPK, ces cibles sont hypo-phosphorylées ce qui entrainerait des dérégulations multiples qui expliqueraient une partie des symptômes observés dans la DM1.

(D'après Kaliman, 2008).

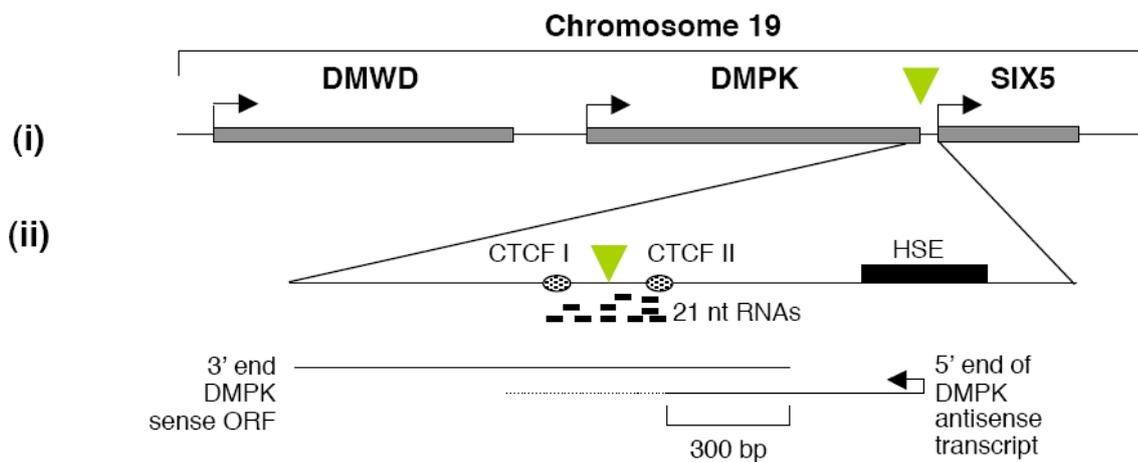
(PKC) ou la calmoduline kinase II (CaMKII) (Wansink et al., 2003) ont été identifiés (**Figure 42**).

Ces substrats sont :

- **le phospholemman** : il s'agit d'une protéine dont la phosphorylation dépend des protéines kinase A et C et est impliqué dans la conductance électrique des canaux chlores (Adrian and Bryant, 1974; Mounsey et al., 2000).
- **le phospholambdan** : cette protéine est retrouvée hyperphosphorylée dans le cœur et serait impliquée dans des défauts de contractibilité et de conductivité cardiaque (Pall et al., 2003).
- **le facteur d'épissage CUGBP** (CUG-binding protein) : ce facteur présente un défaut de phosphorylation chez les patients DM1 homozygotes et dans le modèle des souris KO pour la DMPK. (Timchenko et al., 1996).
- **la sous-unité myosine phosphatase (MYPT1)** : la phosphorylation de cette enzyme inhibe son activité (Muranyi et al., 2001). En cas d'haploinsuffisance de la DMPK, la phosphorylation de MYPT1 diminue conduisant à une augmentation de son activité et à une hyperphosphorylation de la chaîne légère de la myosine. Ce mécanisme entraîne une sensibilisation Ca<sup>2+</sup> dépendante du muscle lisse (Hartshorne et al., 1998) et une réorganisation du cytosquelette (Kaibuchi et al., 1999).

Beaucoup plus récemment, un groupe espagnol de l'université de Barcelone a proposé un rôle de l'haploinsuffisance de la DMPK dans la régulation de l'homéostasie du glucose. Ces auteurs ont mis en évidence des défauts d'assimilation des sucres associés à un défaut de translocation du récepteur de l'insuline (Llagostera et al., 2009; Llagostera et al., 2007). Ces résultats suggèrent l'implication de la DMPK dans le métabolisme du glucose mais ils ne permettent pas d'affirmer que ce mécanisme est responsable de l'intolérance aux sucres observée dans la DM1.

En conclusion, les informations provenant de l'étude des souris KO *dmpk*<sup>-/-</sup> et les études effectuées sur la protéine DMPK indiquent que le produit du gène muté ne joue probablement pas un rôle majeur dans la physiopathologie de la DM1 et que d'autres mécanismes sont en jeu.



**Figure 43 : Représentation schématique de l'environnement génomique de la DMPK.**

(i) Région du chromosome 19 au locus de la DMPK

(ii) La région comprise entre l'exon 15 et le début du gène SIX5 est montrée en détail. La présence des répétitions CTG est indiquée par une flèche verte. Les deux sites CTCF sont montrés par des ovaes et la boîte noire indique la région hypersensible à la DNAase I qui contient le promoteur de l'antisens.

(D'après Kumari 2008).

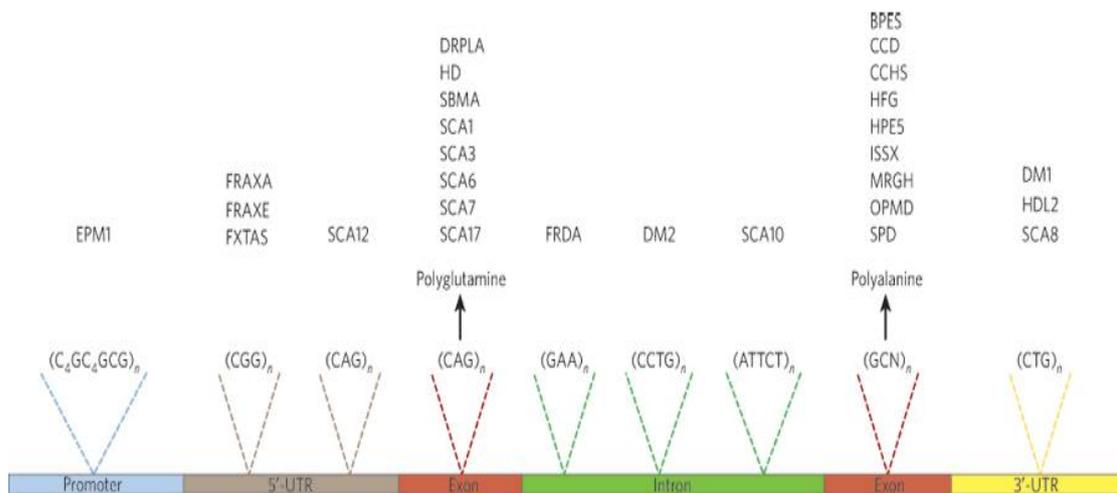
## 6.2 Altération de l'expression des gènes proches de la DMPK et modifications épigénétiques

Cette hypothèse concerne les gènes directement adjacents à la *DMPK* sur le chromosome 19 c'est à dire le gène *DMWD* en amont et le gène *SIX5* en aval (Frisch et al., 2001) (**Figure 43**).

Bien que certaines études aient révélé des résultats contradictoires quant à la variation quantitative de l'expression de ces gènes, leurs fonctions permettaient d'avancer une explication étiologique concernant certains symptômes de la DM1 (Alwazzan et al., 1999; Frisch et al., 2001). Ainsi, des anomalies touchant les gènes *DMWD* et *SIX5* permettaient d'expliquer l'atrophie testiculaire et les problèmes d'infertilité observés dans la DM1 (Jansen et al., 1995; Sarkar et al., 2004). Par ailleurs, une variation de l'expression du gène *SIX5*, impliqué dans le développement de l'œil chez la drosophile, pouvait expliquer les anomalies oculaires, d'autant que les souris déficientes pour ce gène présentent effectivement une cataracte sous leurs formes hétéro ou homozygotes (Klesert et al., 2000; Sarkar et al., 2000).

Toutefois, celle-ci est assez différente de celle observée chez les patients DM1 et ne présente ni opacité iridescente, ni localisation sous-capsulaire postérieure. Certaines explications physiopathologiques qui ont été proposées pour expliquer la dérégulation de l'expression de *SIX5* proviennent de l'analyse du contexte génomique entre la partie 3' du gène de la *DMPK* et le promoteur du gène *SIX5* (**Figure 43**).

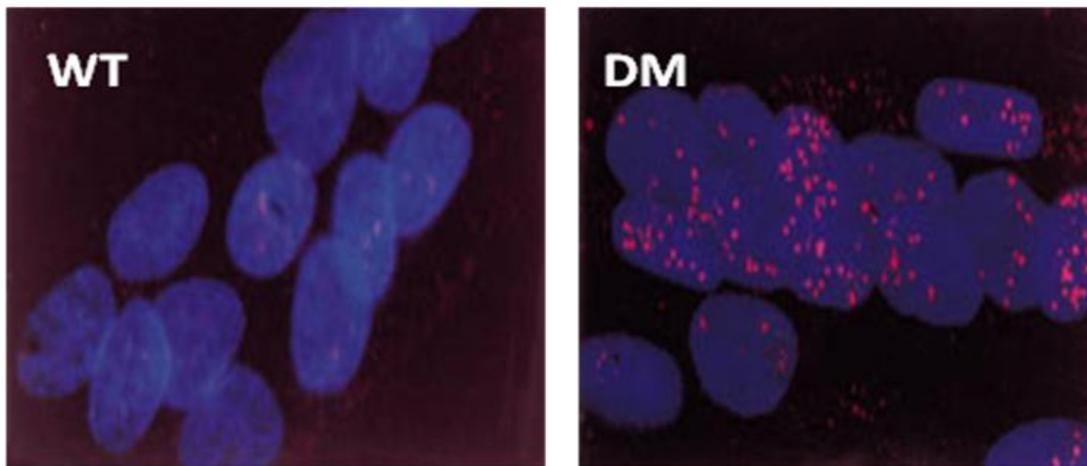
Il a été montré qu'il existait dans cette région un gène antisens avec son propre promoteur qui chevauche la région contenant les répétitions CTG et que cette région est encadrée par deux sites de reconnaissance pour la protéine à doigt de zinc CTCF (Cho et al., 2005). Lorsque cette région n'est pas méthylée, la protéine CTCF se fixe sur son domaine de reconnaissance et constitue une barrière physique (insulateur) isolant les gènes *DMPK* et *SIX5*. Ceci permet leur régulation propre *via* leur promoteur spécifique. Lorsque cette région est méthylée comme c'est le cas pour les patients souffrant de la forme congénitale de la DM1, la protéine CTCF ne peut pas se fixer conduisant à l'inefficacité de l'insulateur et donc à des anomalies d'expression génique. De plus, il existe dans les formes congénitales de la DM1 une compaction de la chromatine dans la région contenant les expansions de triplets qui suggère un possible mécanisme de remodelage de la chromatine et des anomalies épigénétiques (Wang, 2007). Le rôle du remodelage de la chromatine médié par les répétitions CTG n'a pas entièrement été démontré mais ce mécanisme pourrait participer à la physiopathologie des formes congénitales de la DM1. Ce mécanisme pourrait également être commun à d'autres pathologies à triplets comme l'ataxie de Friedreich, et le syndrome de l'X fragile (Kumari and Usdin, 2009).



**Figure 44 : Localisation des répétitions anormales dans le gène mutant de pathologies à expansions de triplets.**

BPES, blepharophimosis, ptosis and epicanthus inversus; CCD, cleidocranial dysplasia; CCHS, congenital central hypoventilation syndrome; DM, myotonic dystrophy; DRPLA, dentatorubral–pallidolusian atrophy; EPM1, progressive myoclonic epilepsy 1; FRAXA, fragile X syndrome; FRAXE, fragile X mental retardation associated with *FRAXE* site; FRDA, Friedreich's ataxia; FXTAS, fragile X tremor and ataxia syndrome; HD, Huntington's disease; HDL2, Huntington's-disease-like 2; HFG, hand–foot–genital syndrome; HPE5, holoprosencephaly 5; ISSX, X-linked infantile spasm syndrome; MRGH, mental retardation with isolated growth hormone deficiency; OPMD, oculopharyngeal muscular dystrophy; SBMA, spinal and bulbar muscular atrophy; SCA, spinocerebellar ataxia; SPD, synpolydactyly.

(D'après Mirkin, 2007).



**Figure 45 : Visualisation des foci constitués par l'accumulation nucléaire de l'ARN mutant.**

Myoblastes provenant de culture primaire de patient DM1 (DM) et leur contrôle (WT) après hybridation *in situ* d'une sonde complémentaire (CAG)30 couplée à un fluorochrome rouge. Les noyaux sont marqués en bleu par le DAPI qui reconnaît l'ADN.

(D'après Davis, 1997).

Les deux mécanismes présentés ci-dessus peuvent contribuer à la physiopathologie de la DM1 mais ils sont assez largement discutés. L'hypothèse qui prévaut actuellement est celle du gain de fonction de l'ARNm mutant.

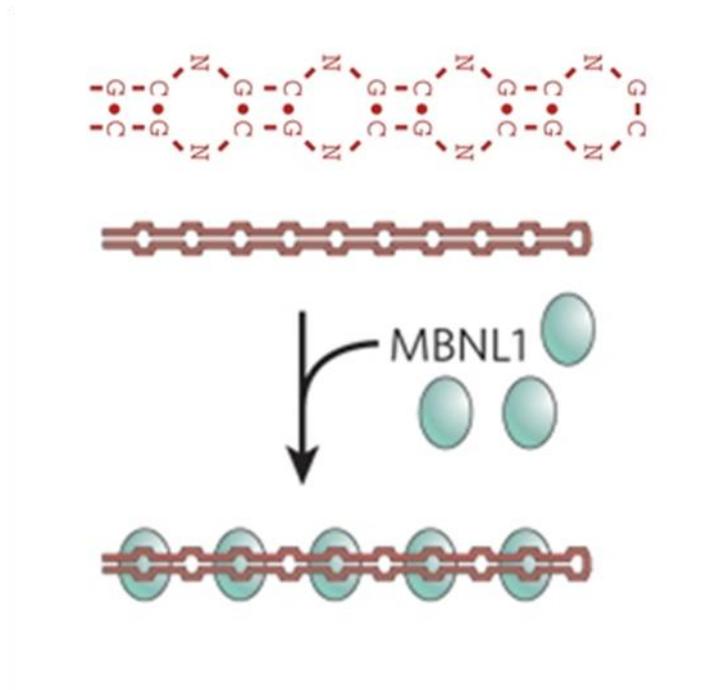
### 6.3 Gain de fonction de l'ARNm mutant

Comme nous l'avons mentionné au début de cette revue, la mutation de la dystrophie DM1 est située, contrairement à beaucoup d'autres maladies à mutations instables, dans la partie non codante de l'exon 15 du gène *DMPK* (**Figure 44**). Le gène est transcrit et des ARNm mutants portant des répétitions CUG sont générés. L'hypothèse physiopathologique qui prévaut actuellement consiste à considérer que cet ARNm serait toxique. Deux arguments majeurs soutiennent cette théorie. Tout d'abord, les patients DM2 qui présentent un tableau clinique proche de la DM1 possèdent une répétition du quadruplet CCTG mais dans un autre gène suggérant que la majorité des symptômes de la maladie serait causée par la répétition nucléotidique indépendamment du gène qui les supporte. Le deuxième argument concerne le modèle de souris transgéniques (HSA<sup>LR</sup>) développé par l'équipe de Charles Thornton, à l'Université de Rochester à New York. Ces auteurs ont montré que des souris qui expriment une construction de 250 répétitions CTG incluses dans un autre gène que celui de la *DMPK*, le gène de la  $\alpha$ -actine humaine, présentaient les principaux symptômes de la DM1 (Mankodi et al., 2000). Ces données sont très en faveur d'un effet *trans* dominant toxique des répétitions nucléotidiques.

#### 6.3.1 Réention nucléaire et toxicité de l'ARN messenger mutant

L'une des premières indications révélant un effet « gain de fonction » de l'ARN mutant fut apporté par l'observation de l'accumulation nucléaire de ces transcrits sous la forme de structures ponctiformes appelées « foci » dans des fibroblastes et des myoblastes de patients. Elles sont identifiables par hybridation *in situ* (FISH) en utilisant une sonde fluorescente complémentaire aux répétitions (Davis et al., 1997; Taneja et al., 1995) (**Figure 45**).

Le mécanisme par lequel l'ARNm est retenu dans le noyau n'est pas entièrement connu, mais il n'implique pas, *a priori*, un problème d'encombrement stérique au niveau du pore nucléaire. Des études plus récentes ont permis de préciser que ces foci étaient associés à des structures nucléaires que l'on appelle « speckle », connues pour être des sites de stockage des petits ARNs et un site d'épissage des pré-ARN (Holt et al., 2007). Les auteurs ont montré que les pré-ARNm mutant étaient exclus de ces structures contrairement à ceux transcrits à partir de



**Figure 46 : Structure secondaire formée par l'ARN contenant des répétitions (CNG) $n$  et reconnaissance des protéines de liaison à l'ARN de la protéine MBNL1.**

Dans la DM1, N=U.

(D'après Mirkin, 2007).

l'allèle normal ce qui suggère leur rôle dans la rétention nucléaire, possiblement médiée par l'intermédiaire du facteur hnRNP H (Kim et al., 2005a).

La première étude confirmant l'implication de ces foci dans la physiopathologie de la maladie fut apportée par une expérience dans laquelle une construction de 200 CTG, incluse dans la séquence 3'UTR de la DMPK, a été introduite dans des myoblastes sains. Celle-ci est suffisante pour induire l'apparition de ces foci et son effet toxique se manifeste par un effet inhibiteur de la myogenèse, empêchant la fusion des myoblastes en myotubes (Amack et al., 1999). Par la suite, plusieurs modèles de souris transgéniques ont été générés afin de mieux comprendre les anomalies fonctionnelles impliquant la toxicité par gain de fonction des ARNm mutants (Voir chapitre 6.3.3). Chez la plupart des souris affectées, plusieurs de leurs tissus dont le muscle et le cœur présentent des foci nucléaires.

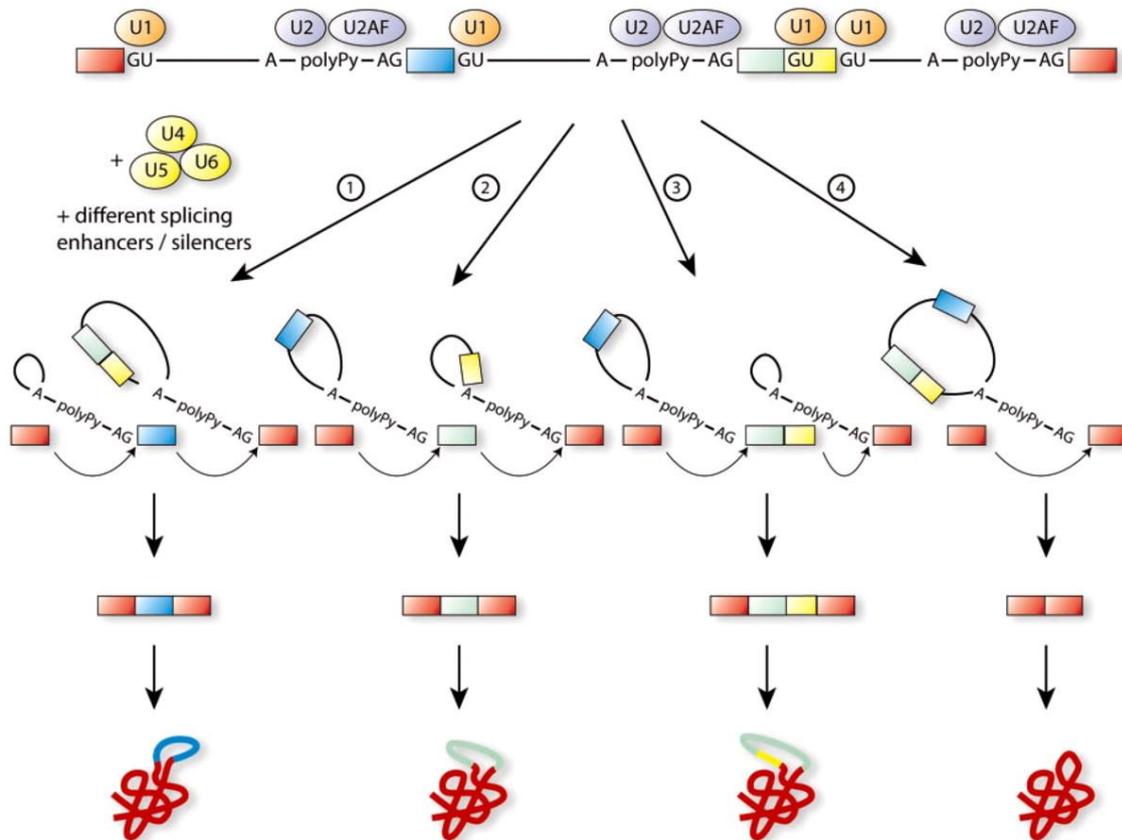
En parallèle, la nature de ces foci a également été investiguée par des analyses biochimiques. Elles ont montré qu'ils étaient résistants aux traitements chimiques par les sels, les détergents et la DNase I. Ceci suggérait que les foci n'étaient probablement pas constitués uniquement d'acide nucléique mais plutôt d'un complexe nucléoprotéique (Davis et al., 1997). Il existe de nombreuses protéines qui sont capables de se fixer à l'ARN et pourraient ainsi contribuer à la physiopathologie de la maladie. Parmi celles-ci, les protéines CUGBP1 (*CUG-binding protein*) et MBNL1 (*Muscleblind-1*) ont été identifiées. MBNL1 est capable de reconnaître des structures secondaires en épingle à cheveux de l'ARN formées par les répétitions de CUG (Mirkin, 2007) (**Figure 46**). A partir de 50 répétitions, ces structures seraient particulièrement stables d'un point de vue thermodynamique (Wheeler et al., 2007a).

La protéine CUGBP1, quant à elle, est capable de fixer les motifs CUG dans l'ARN simple brin et elle n'est pas capable de reconnaître la structure secondaire des ARN contenant les expansions CUG (Ladd et al., 2001; Timchenko et al., 1996).

### **6.3.2 Implications des protéines CUGBP1 et MBNL1 dans DM1**

#### **6.3.2.1 CUGBP1**

Cette protéine de la famille des CELF/BRUNOL contient des domaines RRM de reconnaissance à l'ARN. Elle est impliquée dans la régulation de l'épissage alternatif, l'édition et la stabilité des ARNs ainsi que dans l'initiation de la traduction. Dans la DM1, cette protéine est normalement présente dans le noyau et dans le cytoplasme, mais elle s'accumule sous une forme phosphorylée aux niveaux des noyaux des cellules musculaires et cardiaques des



**Figure 47 : L'épissage alternatif génère de nombreuses isoformes de protéines par inclusion ou exclusion des exons.**

Le processus d'épissage est un mécanisme dynamique qui suit une succession précise d'évènements au cours de laquelle les différents snRNP (U1, U2, U4, U5 et U6) s'assemblent et se désassemblent du spliceosome. Tout d'abord, U1 s'associe à la jonction 5' de l'intron alors qu'U2 s'associe à la boîte de branchement. Le complexe U4-U6-U5 rapproche U1 et U2, réalisant ainsi un pont entre la jonction 5' de l'intron et la boîte de branchement (bords 3'). U4 et U1 quittent alors le complexe. Le 2'-OH du A de la boîte de branchement coupe la jonction 5' de l'intron, et le 3'-OH du nucléotide en 3' de l'exon en amont coupe l'autre jonction. L'ARNm épissé est ainsi libéré avec l'intron en "lasso".

(D'après Wood, 2010).

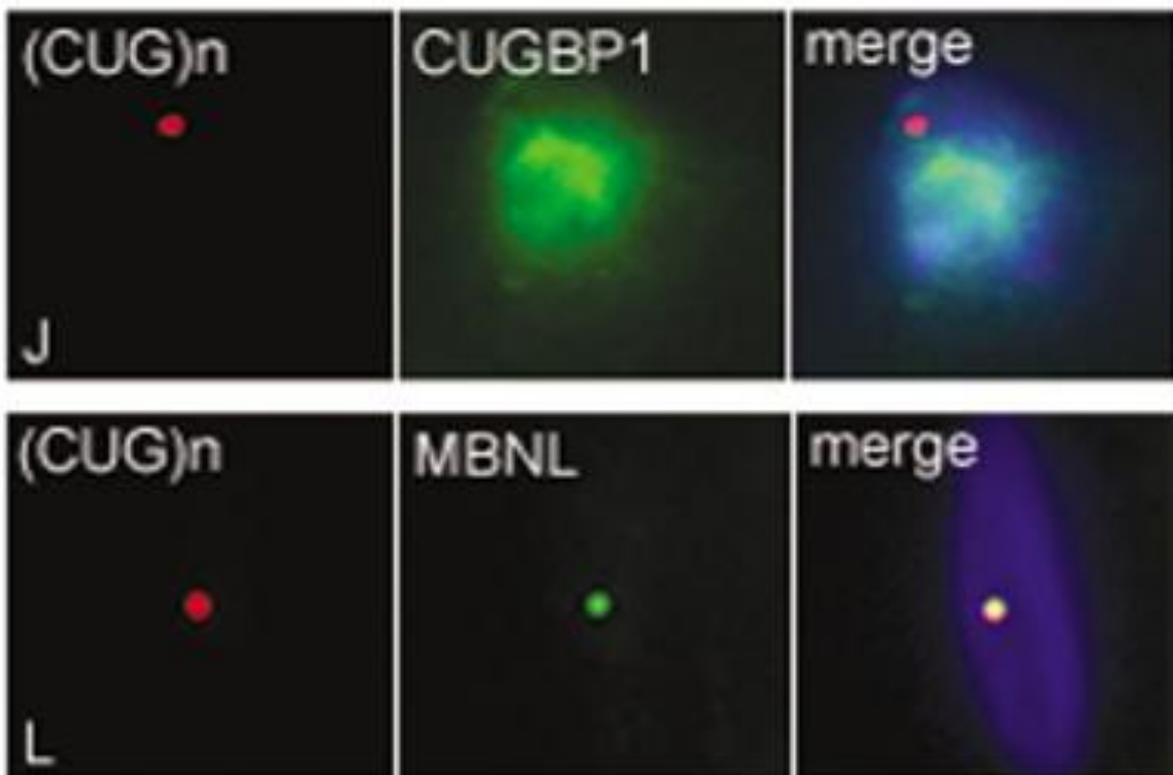
malades (Timchenko et al., 2001). C'est la protéine kinase C qui semble réguler sa phosphorylation en particulier dans le muscle cardiaque, ce qui induit son accumulation nucléaire. Cependant, il n'y a pas de co-localisation entre cette protéine et les foci dans les cellules malades (Mankodi, 2003). La participation de CUGBP1 aux mécanismes physiopathologiques de la DM1 s'explique en partie par son rôle régulateur de l'épissage alternatif.

Le profil d'épissage alternatif de nombreux gènes varie au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte. Ces modifications permettent à la cellule de s'adapter aux différentes contraintes propres aux stades embryonnaire et adulte en augmentant de manière considérable, à partir de la même information génique, les possibilités de synthèse d'isoformes protéiques différentes qui peuvent posséder entre elles des affinités ou des fonctions variées (**Figure 47**).

La protéine CUGBP1 intervient dans le maintien du profil d'épissage fœtal de plusieurs gènes et son activité diminue à la naissance. Aussi, la persistance d'une forte activité de CUGBP1 dans des cellules adultes entraîne une dérégulation de l'épissage de plusieurs gènes dont la troponine cardiaque (*cTNT*), du récepteur de l'insuline (*IR*) et du canal chlore musculaire (*CLCN1*) (Charlet et al., 2002; Philips et al., 1998; Savkur et al., 2001). Comme corolaire à l'accumulation de CUGBP1 dans le noyau des cellules malades, sa concentration cytoplasmique diminue ce qui entraîne d'autres anomalies. Par exemple, CUGBP1 se fixe sur la partie 5' de l'ARNm codant la protéine p21, une protéine impliquée dans cycle cellulaire (Timchenko, 2004; Timchenko, 2001), ainsi que sur l'ARNm du facteur de transcription *MEF2A* (myocyte enhancer factor) (Timchenko et al., 2004). Ceci entraîne la diminution de sa traduction et une diminution et/ou un retard de la différenciation myogénique (Harris et al., 2001).

D'autre part, il a également été montré que la déplétion de CUGBP1 par une approche par ARN interférence (siARN) dans des myoblastes de souris (ce qui mime la déplétion de CUGBP1 du cytoplasme) ou l'action pharmacologique d'esters de phorbol reproduisant la phosphorylation pathologique de CUGBP1 induisait une stabilisation de l'ARNm du TNF $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor*) qui code une puissante cytokine proinflammatoire (Zhang et al., 2008).

L'accumulation de l'ARNm du TNF $\alpha$  dans les cellules malades pourrait être impliquée dans la dégénérescence musculaire ou dans la résistance à l'insuline dans la mesure où il a été trouvé une augmentation des concentrations sériques de TNF chez les malades.



**Figure 48 : Etude de la localisation de l'ARN mutant et des protéines MBNL1 et CUGBP1.**

(J) Co-localisation de la protéine MBNL1 avec les foci (L). Absence de co-localisation entre la protéine CUGBP1 et les foci (K).

(D'après Mankodi, 2005).

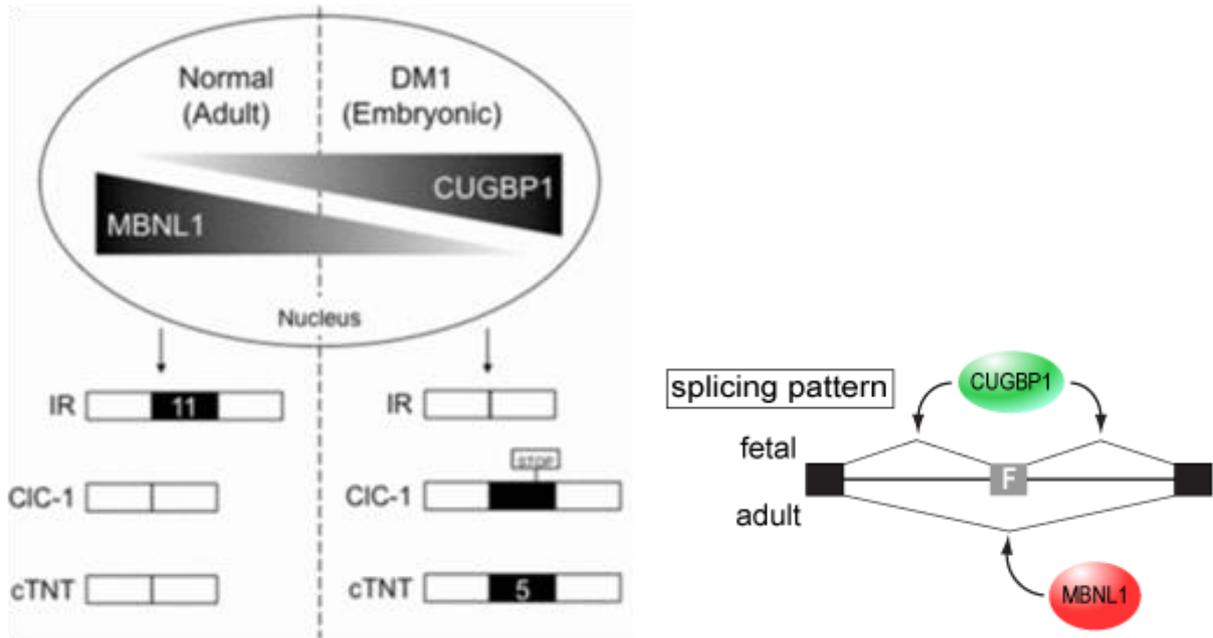
De manière plus générale, CUGBP1 se fixe sur des séquences GREs (*GU rich-element*) présentes dans les régions 3'-UTR de nombreux gènes à demi-vie courte (Rattenbacher, 2010). Une étude très récente réalisée dans des myoblastes C2C12 de souris en utilisant des puces d'immunoprécipitation des ARNs (RIP-Chip) a identifié un certain nombre de cibles de CUGBP1 dont des ARNs intervenant dans le développement musculaire. Ainsi, l'augmentation pathologique de CUGBP1 pourrait agir en déstabilisant de nombreuses cibles d'ARNm (Lee, 2010) comme c-Fos (Moraes et al., 2006).

Une protéine de la même famille, la protéine ETR3 (CUGBP2), est également augmentée dans le noyau des cellules cardiaques dans un modèle de souris transgénique inductible pour les répétitions CTG. Elle régulerait des gènes dont l'épissage est altéré dans la maladie comme cTNT, l'homologue de la myotubularine MTMR1, le récepteur de l'insuline, le N-méthyl-D-aspartate (NMDAR1) (Faustino and Cooper, 2005) et Tau (Leroy et al., 2006a).

### **6.3.2.2 MBNL1**

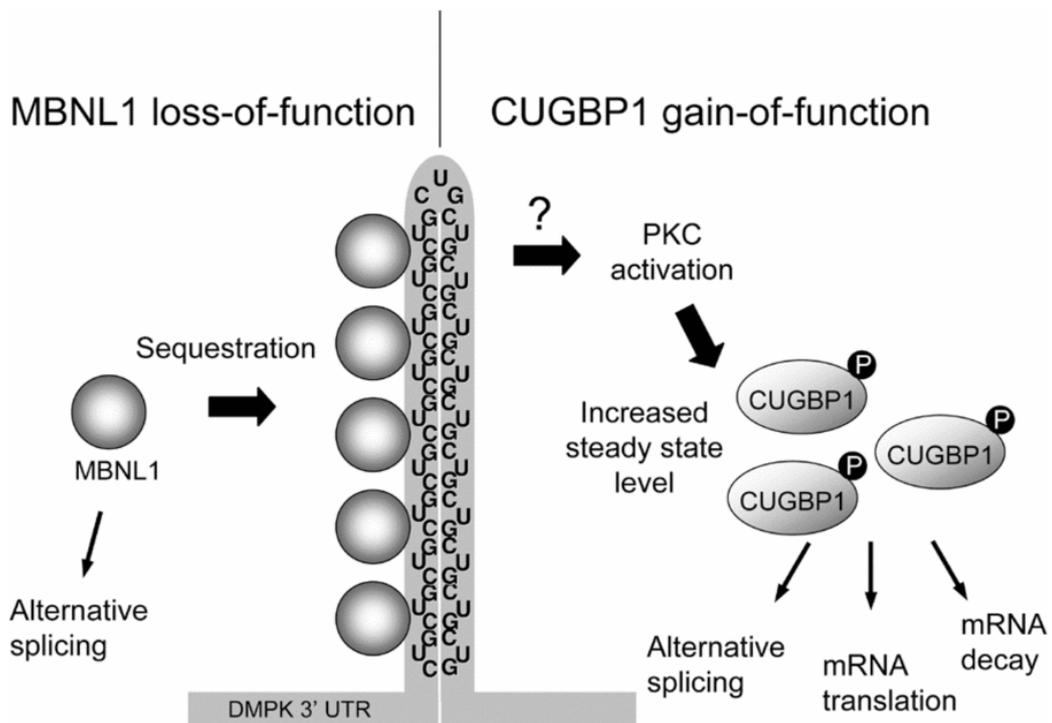
En 2000, le groupes de Charles Thornton a identifié un autre facteur d'épissage Muscleblind-1 (MBNL1) comme reconnaissant les expansions CUG grâce à des expériences d'immunoprécipitation à partir d'extraits fractionnés de cellules HeLA transfectées par des constructions contenant plusieurs tailles de répétitions (CUG)<sub>n</sub> (Miller et al., 2000).

Parmi les protéines de la famille MBNL, MBNL1 est la plus abondante (Pascual et al., 2006 ; Holt, 2009). Les isoformes qui contiennent l'exon 3 sont capables de reconnaître la structure en épingle à cheveux des ARNm mutants contenant des expansions CUG (Miller et al., 2000) et contrairement à CUGBP1, elles sont co-localisées avec les foci dans les noyaux des cellules malades (Mankodi et al., 2001) (**Figure 48**). Le fait que cette protéine soit impliquée dans la différenciation myogénique dans un modèle de drosophile, suggérait un rôle de cette protéine dans la physiopathologie musculaire. Le mécanisme mis en jeu proposé était alors une captation de MBNL1 dans les foci entraînant la diminution de sa concentration libre et finalement une perte de fonction potentiellement responsable d'effet sur le muscle (Fardaei et al., 2001; Fardaei et al., 2002). Par la suite, il fut confirmé que cette protéine jouait un rôle central dans la physiopathologie de la maladie et que sa séquestration par les ARNs entraînait une dérégulation multiple de l'épissage alternatif. L'étude de la régulation de l'épissage



**Figure 49 : Effet antagoniste des protéines CUGBP1 et MBNL1 dans la régulation de l'épissage de 3 gènes altéré dans la DM1.** IR Insuline receptor ; CIC-1 canal chlore 1 ; cTNT : Troponine cardiaque.

(D'après Lee, 2009).



**Figure 50 : Mécanisme physiopathologique médié par les protéines MBNL1 et CUGBP1.**

(D'après Lee, 2009).

alternatif des gènes cités précédemment pour la CUGBP1, c'est-à-dire la troponine cardiaque (*cTNT*), le récepteur de l'insuline (*IR*) et le canal chlore musculaire (*CLCN1*) a permis de

montrer que MBNL1 se comportait de manière antagoniste à CUGBP1 et régulait la transition du profil fœtal vers le profil adulte (**Figure 49**). En résumé, ces résultats ont permis d'impliquer ces deux protéines, CUGBP1 et MBNL1, dans les anomalies d'épissages observées dans la DM1. Dans le cas de la protéine MBNL1, c'est sa fixation sur les ARNm mutant qui entraîne une diminution de sa concentration libre efficace et les anomalies d'épissage qui en résultent alors que pour la CUGBP1 c'est l'augmentation de sa stabilité médiée par la phosphorylation PKC dépendante qui est impliquée (**Figure 50**).

Les protéines MBNL1 et CUGBP1 contribuent en grande partie aux nombreuses anomalies d'épissage observées dans la DM1 (**Tableau 7**), voir page suivante.



<b>Tissus</b>	<b>Gènes</b>	<b>Exon/intron</b>	<b>Inclusion/exclusion</b>	<b>Références</b>	
muscle squelettique	<i>insulin receptor (INSR)</i>	exon 11	exclusion	Savkur <i>et al.</i> , 2001	
	<i>chloride channel (CLCN-1)</i>	intron 2	inclusion	Charlet <i>et al.</i> , 2002; Mankodi <i>et al.</i> , 2002	
		exon 7a	inclusion		
	<i>fast skeletal troponin T (TNNT3)</i>	fœtal exon	inclusion	Kanadia <i>et al.</i> , 2003	
	<i>ryanodine receptor (RyR)</i>	exon 70 (AS I)	exclusion	Kimura <i>et al.</i> , 2005	
	<i>sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca2+ ATPase 1 (SERCA1)</i>	exon 22	exclusion	Kimura <i>et al.</i> , 2005	
	<i>sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca2+ ATPase 2 (SERCA2)</i>	intron 19	inclusion	Kimura <i>et al.</i> , 2005	
	<i>LIM domain binding 3 (LBB3, ZASP)</i>	11	inclusion	Lin <i>et al.</i> , 2006	
	<i>titin (TTN)</i>	Zr4	inclusion		
		Zr5	inclusion		
	<i>nebulin-related anchoring protein (NRAP)</i>	12	inclusion		
	<i>calpain 3, CAPN3</i>	16	exclusion		
	<i>attractin-like 1 (ATRNL1, ALP)</i>	5a	exclusion		
		5b	exclusion		
	<i>formin homology 2 domain containing 1 (FHOD1, FHOS)</i>	11a	exclusion		
	<i>glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1 (GFPT1, GFAT1)</i>	10	exclusion		
	<i>muscleblind 1 (MBNL1)</i>	7	inclusion		
	<i>muscleblind 2 (MBNL2)</i>	7	inclusion		
	cœur	<i>nuclear factor I/X (CCAAT-binding transcription factor (NFIX))</i>	123	inclusion	Du <i>et al.</i> , 2010
		<i>SET and MYND domain containing 1 (SMYD1)</i>	39	inclusion	
<i>sperm associated antigen 9 (SPAG9)</i>		39	exclusion		
<i>gènes de la matrice extracellulaire</i>					
muscle squelettique et cœur	<i>myotubularin-related protein 1 (MTMR1)</i>	exon 2.1	exclusion	Buj-Bello <i>et al.</i> , 2002; Ho <i>et al.</i> , 2005a	
		exon 2.3	exclusion		
	<i>α-dystrobrevin (DTNA)</i>	exon 11a	inclusion	Nakamori <i>et al.</i> , 2008	
		exon 12	inclusion		
cœur	<i>cardiac troponin T (TNNT2)</i>	exon 5	inclusion	Philips <i>et al.</i> , 1998	
cerveau	<i>tau (MAPT)</i>	exon 2	exclusion	Sergeant <i>et al.</i> , 2001	
		exon 3	exclusion		
		exon 10	exclusion	Jiang <i>et al.</i> , 2004	
	<i>N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR1)</i>	exon 5	inclusion	Jiang <i>et al.</i> , 2004	
	<i>amyloid precursor protein (APP)</i>	exon 7	exclusion	Jiang <i>et al.</i> , 2004	

**Tableau 7 : Principales anomalies d'épissages dans différents tissus de patients DM1.**

Gène	promoteur	Répétitions	tissu	Foci	MBNL1/Foci	Elevation de CUGBP1	Epissages	Symptomes	Ref
skeletal $\alpha$ -actin-CTG-3'UTR (HSA <sup>LS</sup> )	HSA	250	muscle squelettique	++	+		Serca1, ZASP, Mbnl1, Mbnl2, z-Tin, m-Tin, Nrap, Capn3, Alp	→ Myotonie → Surexpression de Mbnl1 via AAV restaure les défauts d'épissage et la myotonie	Kanadia et al., 2006; Lin et al., 2006; Mankodi et al., 2000
DMPK (45kb cloné à partir d'un patient)-CTG-3'UTR	dmpk	300		++			tau (cerveau)	→ Anomalies histologiques muscles, myotonie Anomalies histologiques muscles, myotonie → Phénotype Homozygote plus marqué que les hétérozygotes	Seznec et al., 2001
		550						→ Diminution force musculaire à 10 mois	Vignaud et al., 2010
		700 homozygotes					Insr, Clcn1, Mapt, Mbnl1, Mbnl2, Grin1	→ petite taille	Gomez-Pereira et al., 2007;
		1000 à >1700 modèle DMSXL					muscle, cœur, cerveau, cervelet,	→ retard de croissance → Forte mortalité → Diminution de la force musculaire → Troubles de conduction cardiaque	Gomez-Pereira et al., 2007;
LacZ-CTG400	$\alpha$ -myosine heavy chain	400	cœur	++ CYTOPLASMIQUE	+	±	Non testé Tnnt2, m-Titin, Zasp	→ dysfonctionnement cardiaque	Dansithong et al., 2008

**Tableau 8 : Modèle non inductible des expansions nucléotidiques chez la souris.**

(D'après Marteyn, 2010).

Gène	promoteur	Répétitions	tissu	Foci	MBNL1/Foci	Elevation de CUGBP1	Epissages	Symptomes	Ref
dmpk exon15	CMV	960 CTG discontinus	muscle (CRE)	++	+	+	Ank2, Capzb, Fxrf	→ Phénotypes DM1 sévères	Orengo et al., 2008
			Cœur (CRE)	++	+	+	Tnnt2	→ Cardiomyopathie sévère	Wang et al., 2007
dmpk5'UTR+GFP-dmpk3'UTR (CTG) <sub>n</sub>	dmpk	200	tt tissus (cre sous promoteur CMV)	++	+	+	Clcn1, Tnnt3, Tnnt2	→ Atteinte sévère des muscles squelettiques et cardiaques	Mahadevan et al., 2006; Yadava et al., 2008
		5		NO	NO	NO	NO		

**Tableau 8 bis : Modèle inductible des expansions nucléotidiques chez la souris.**

(D'après Marteyn, 2010).

### 6.3.3. Modèles animaux de la DM1

Il existe de nombreux modèles animaux de la DM1, principalement des souris transgéniques, mais il existe aussi un modèle de drosophile (de Haro et al., 2006), un modèle de poisson zèbre et un modèle de nématode *Caenorabditis elegans* (Chen, 2007).

Ces modèles ont été et sont encore indispensables pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques intervenant dans la DM1. Ils permettent de mettre en relation des mécanismes moléculaires comme les anomalies d'épissage que nous avons décrites précédemment avec un phénotype permettant d'établir une corrélation avec les symptômes observés chez le patient. Ils permettent aussi de tester l'effet des stratégies thérapeutiques dont nous reparlerons dans le chapitre suivant.

Trois types de souris transgéniques ont été générés qui visent à reproduire les 3 événements moléculaires pathologiques identifiés dans le modèle « gain de fonction de l'ARNm mutant » présenté ci-dessus : la toxicité de l'expansion de triplets, la perte de fonction de MBNL1 et la surexpression nucléaire de CUGBP1.

#### 6.3.3.1. Modèle murin d'expression des expansions nucléotidiques :

Les deux premières lignées de souris transgéniques contenant des répétitions CTG au niveau du gène *DMPK* avaient été développées de manière indépendante (Gourdon, 1997; Monckton, 1997). Ces deux modèles différaient par la taille de la séquence humaine et le nombre de répétitions insérées. Dans le premier cas, un fragment de la région 3'UTR de la *DMPK* humaine contenant 162 répétitions avait été utilisé alors que dans le deuxième cas, c'était l'ensemble du locus DM (45 kb) avec 55 CTG et les deux gènes adjacents à la *DMPK* (*DMWD* et *SIX5*) qui avait été transféré dans les souris développées par l'équipe du Dr. Gourdon. Ces deux études avaient révélé une instabilité méiotique et mitotique de ces répétitions CTG sur plusieurs générations, l'augmentation du mosaïcisme étant corrélée à la longueur des répétitions avec l'âge des souris. Contrairement à ces modèles, seules les souris générées avec un cosmide contenant plus de 300 répétitions ont acquis un profil phénotypique pathologique similaire à celui observé chez les patients DM1, c'est-à-dire une forte instabilité des ARNs augmentant avec l'âge dans les tissus et le sperme, l'apparition des foci, de la myotonie et des défauts musculaires (Seznec, 2000).



Bien que 300 répétitions soient insuffisantes pour induire des troubles neuronaux ou des axonopathies comme la démyélinisation dans ces souris transgéniques (Gantelet, 2007), ce modèle a permis d'étudier et de mettre en évidence les mécanismes impliqués dans les phénomènes d'expansion intergénérationnelle des répétitions et d'anticipation génétique. En effet, à partir de ces souris présentant 300 CTG (Gomes-Pereira, 2007), les souris de la génération suivante étaient porteuses de plus de 700 CTG. L'analyse de ce « saut » de répétitions a permis de comprendre les mécanismes d'instabilité génétique associés à l'expression de la mutation, comme l'implication de MSH2 dont nous reparlerons plus loin.

Par ailleurs, l'un des premiers modèles évoqué plus haut, celui des souris HSA<sup>LR</sup> de l'équipe de Charles Thornton, a contribué de manière significative à la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la DM1. Ces animaux portaient des répétitions de 250 CTG au niveau du dernier exon 3'UTR de l'alpha-actine spécifique du muscle squelettique ACTA1 (Mankodi et al., 2000). Ces souris présentaient une myotonie sans faiblesse musculaire associée à des anomalies histologiques comme les fibres musculaires en anneaux, la présence de noyaux centraux, la formation de foci dans les cellules musculaires ainsi que de nombreuses anomalies d'épissage parmi celle décrites chez les patients DM1.

Enfin, d'autres modèles murins basés sur des systèmes inductibles ont également été développés permettant d'induire l'expression de répétitions CTG, de tailles variables, dans des tissus cibles tels que le muscle ou le cœur (Orengo, 2008 ; Wang, 2007; 2006, Yadava, 2008).

Equipe	Modèle	Stratégie	Tissu	Épissage	Principaux résultats	Référence
Thornton	Souris MBNL1 $\Delta 3/\Delta 3$	Délétion de l'exon 3 = extinction des isoformes 41 et 42kDa	Muscle squelettique	Cttnl1 Serca1, ZASP z-Ttn, m-Ttn Nrap, Capn3 Alp, Fhos Gfa, Mbnl1, Mbnl2	- Myotonie débutant vers 6 semaine - Dyscharge myotonique - Retard à la relaxation musculaire - Pas de dégénération du muscle à 11 semaines mais anomalies histologiques uniquement dans les anneaux homozygotes ; augmentation du nombre de noyau centraux, scission de myofibrilles - Cataracte sous capsulaire - Fonction cognitive normale - Signe de diminution de la motivation et anhédonie - Surexpression des cibles p21 et MEF2A par régulation de la traduction - Augmentation de la conversion myogénique dépendant de MEF2A. - Augmentation de la létalité si surexpression >4 - Quelques noyaux centraux - Augmentation de la distance entre les myofibrilles	Kanadia, 2003 Matyina, 2010
Timchenko	Souris	Surexpression	Muscle Coeur	NT		Timchenko, 2004
Cooper	Souris MCKCUGBP1 Promoteur MCK	Surexpression de CUGBP1	Muscle Coeur	Cttnl1, Tnni2, Mtnr1	Anomalies histologiques : noyaux centraux, dégénérescence des myofibrilles, anomalies enzymatiques	Ho, 2005
	Souris TRE CUGBP1	Augmentation inducible de CUGBP1 (spécifique cœur)	Coeur	C10orf97, Mfn2, capzb, Ppfibp1	- Cardiomyopathie dilatée - Augmentation de la létalité - Anomalies de conduction	Sohal, 2001 Wang 2007 Koshelev, 2010

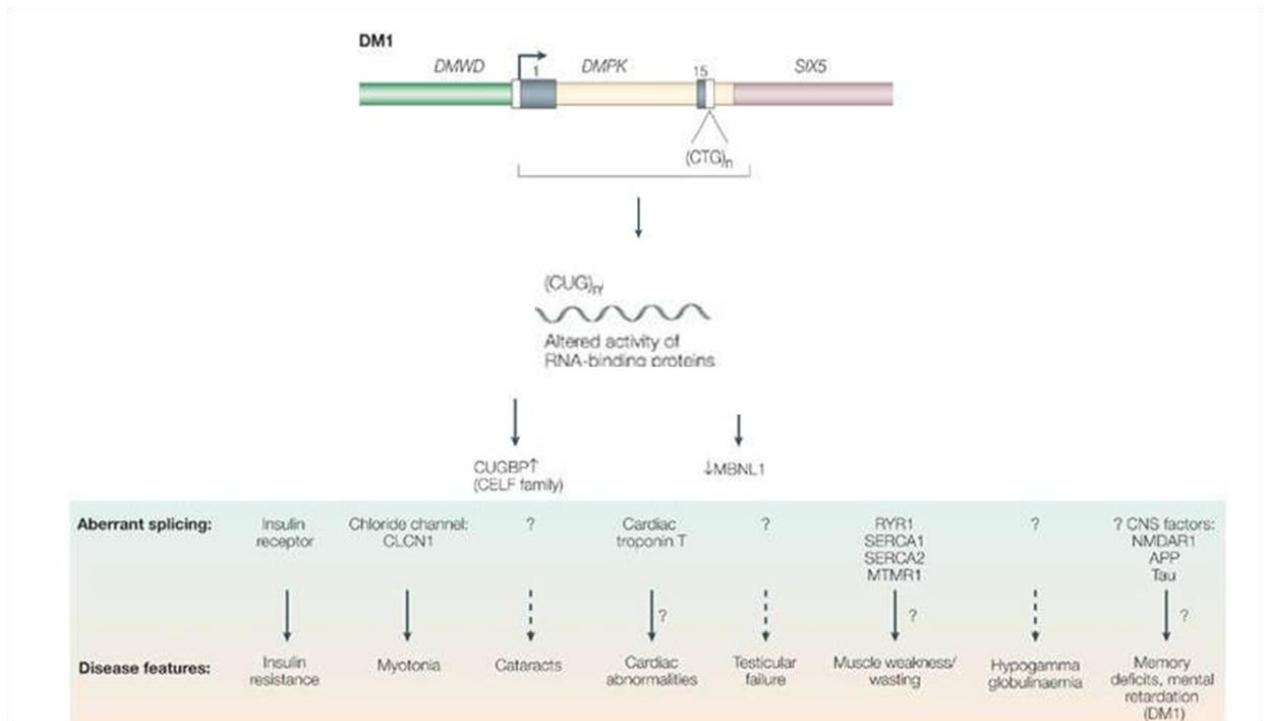
Tableau 9 : Modèle animaux de perte de fonction de *mbnl1* (Thornton) et de surexpression de *cugbp1* (Timchenko et Cooper).

### **6.3.3.2. Modèle murin KO *mbnl1* -/- :**

Les conséquences de la perte de fonction de la protéine MBNL1 ont été étudiées grâce un modèle de souris ( $MBNL1^{\Delta 3/\Delta 3}$ ) exempt de l'exon 3 du gène (Kanadia et al., 2003) (**Tableau 9**). Cette ablation génique permet d'éliminer toutes les isoformes capables de se lier aux répétitions et inactive la protéine. Dans ce travail, les auteurs ont montré que ces souris reproduisaient des symptômes ressemblants à la DM1 qui apparaissaient chez les animaux vers 6 semaines. Ces souris présentent une myotonie et des anomalies histologiques au niveau du muscle mais sans signe de dégénération et ce phénotype peut être reversé par la surexpression de MBNL1 dans le muscle après injection d'un virus AVV. Les animaux présentent aussi une cataracte sous-capsulaire, des troubles du comportement et de la motivation mais pas d'atteinte cognitive.

### **6.3.3.3. Modèle de surexpression de *CUGBP1* :**

Plusieurs modèles de souris transgéniques surexprimant CUGBP1 ont été rapportés (**Tableau 9**). Les souris qui sur-expriment plus de 4 fois la protéine meurent rapidement. En revanche, celles qui la sur-exprime seulement de l'ordre de 2-3 fois reproduisent certains symptômes DM1 incluant un déficit musculaire, une myotonie mais surtout des signes cardiaques très proches de ceux présents chez les malades avec notamment une cardiomyopathie dilatée et des anomalies de conduction cardiaques (Timchenko et al., 2004; Wang et al., 2007). Dans la mesure où le niveau d'expression du gène est important, des stratégies utilisant des constructions inductibles ont été choisies. Certains utilisent la technologie cre permettant l'établissement de modèle d'induction spécifique du tissu du muscle ou du cœur.



**Figure 51 : Relation entre les défauts d'épissage et les symptômes observés chez les malades DM1.**

## **6.4 Relation génotype-phénotype :**

L'étude de ces modèles animaux a permis d'établir qu'il existe des arguments solides en faveur de l'association entre les défauts d'épissage et les symptômes développés par les patients (**Figure 51**).

### **6.4.1. Canal chlore et myotonie :**

Cette relation est clairement établie dans le cas de l'anomalie d'épissage du canal chlore qui est aujourd'hui reconnue comme responsable de la myotonie.

En effet, la myotonie est un symptôme commun aux souris déficientes en MBNL1 et aux animaux transgéniques présentant des CUG longs. La mise en évidence du défaut d'épissage dans le gène *CLCN1* codant un canal chlore spécifique du muscle dans ces deux animaux modèles, a permis de proposer une hypothèse selon laquelle la perte de MBNL1 médiée par les ARN mutants était la cause de la myotonie. Depuis, le mécanisme a été précisé. C'est le maintien de l'inclusion de l'exon 7a dans le gène *CLCN1* qui conduit à l'apparition d'un codon stop dans le cadre de lecture de l'exon suivant qui entraîne la formation d'une isoforme tronquée non fonctionnelle causant la myotonie (Charlet et al., 2002; Lueck et al., 2007a; Lueck et al., 2007b; Mankodi et al., 2002; Wheeler et al., 2007b).

### **6.4.2 Insuline récepteur et résistance à l'insuline/diabète :**

Les patients DM1 présentent de nombreuses atteintes endocriniennes incluant une résistance à l'insuline pouvant conduire au diabète de type II. De ce fait, une relation entre ces symptômes et les anomalies du récepteur à l'insuline (IR) a été suggérée.

Il existe deux isoformes de l'IR produites à partir de l'épissage alternatif du gène. Ces deux isoformes sont spécifiques de tissus et diffèrent par l'inclusion ou non de l'exon 11 composé de 36 nucléotides (Moller, 1989; Seino, 1989). L'IR-B, l'isoforme incluant l'exon 11, est principalement exprimée au niveau des tissus responsables de l'homéostasie du glucose tels que le foie, les tissus adipeux ou les muscles squelettiques et présente une forte réponse à l'insuline. En revanche, l'isoforme non musculaire, l'IR-A (absence de l'exon 11), présente deux fois plus d'affinité pour l'insuline, un temps d'internalisation et de recyclage plus rapide que l'IR-B (McClain, 1991; Mosthaf, 1990; Vogt, 1991) mais possède une plus faible activité (Kellerer, 1992). Du fait de l'altération de la régulation de l'épissage alternatif de l'IR dans la



DM1, l'exclusion de l'exon 11 est favorisée et l'isoforme IR-A se retrouve majoritairement exprimée dans les muscles squelettiques adultes. La prédominance de cette isoforme dans ces tissus ou dans des cultures primaires de muscles DM1 (Furling, 2001 #105; Savkur, 2001), pourrait être responsable de la résistance à l'insuline.

#### **6.4.3. *Tau, APP et NMDAR1 et anomalies neurales :***

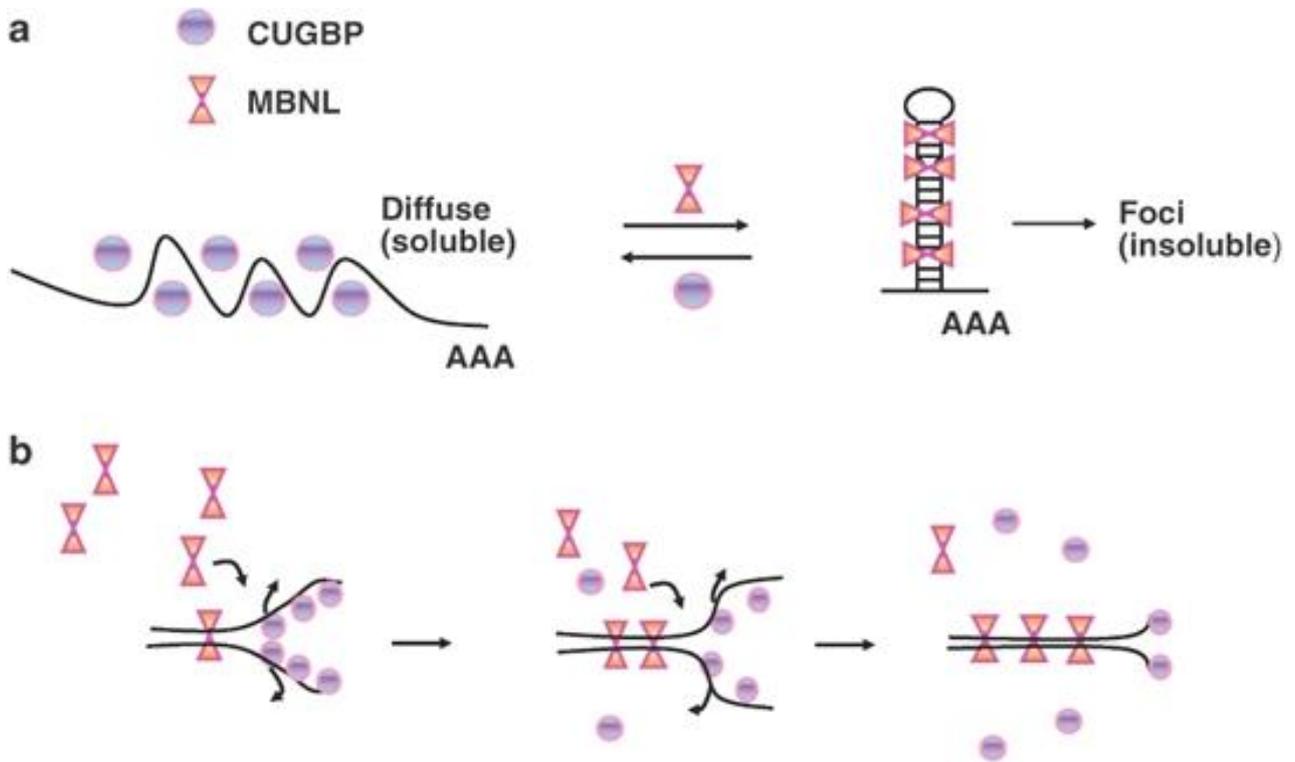
En ce qui concerne les gènes neuraux, leurs anomalies d'épissage pourraient, du moins en partie, expliquer certaines anomalies du système nerveux central (Dhaenens et al., 2008; Ghanem et al., 2009; Jiang et al., 2004; Leroy et al., 2006a; Leroy et al., 2006b; Seznec et al., 2001). Nous en reparlerons dans l'introduction des résultats relatifs à l'étude de la protéine Tau que nous avons mené dans le cadre de cette thèse.

#### **6.4.4 *Gènes musculaires, troponine et anomalies musculaires/cardiaques :***

Il existe également des anomalies d'épissage concernant les gènes musculaires et cardiaques comme le récepteur à la Ryanodine RYR1, les récepteurs calciques SERCA1, SERCA2, la myotubularine MTMR1 ou les gènes codant des troponines TNNT2 ou TNNT3. Ceux-ci sont proposés comme intervenant dans la physiopathologie DM1 soit dans l'atrophie/faiblesse musculaire soit dans des anomalies de conductions cardiaques.

L'ensemble de ces données montrent que des gènes dont l'épissage est dérégulé jouent un rôle majeur dans le mécanisme physiopathologique de la DM1. Cependant, on ignore précisément le nombre de gènes impliqué et combien d'entre eux sont médiés par la perte de fonction de MBNL1 ou par l'effet *trans* dominant toxique de l'ARNm mutant indépendamment de cette protéine.

Afin d'apporter des éléments de réponse, une étude très récente utilisant des puces à exons a comparé les profils d'épissage entre les tissus musculaires de souris HSA<sup>LR</sup> et des souris Mbn11<sup>Δ3/Δ3</sup> (Du et al. 2010). Plus de 200 anomalies d'épissages et plus de 100 anomalies d'expression de gènes ont été trouvées dans les deux modèles de souris. Les auteurs estiment que les anomalies d'épissages dues à la perte de fonction de MBNL1 expliquent plus de 80% des anomalies d'épissage trouvées dans le tissu musculaire du modèle de souris HSA<sup>LR</sup> mais à l'inverse de nombreuses différences ne sont pas expliquées par la seule diminution de MBNL1.



**Figure 52 : Modèle physiopathologique proposé par R.P. Junghans.**

(a) Selon ce modèle, la protéine CUGBP1 se fixe à l'ARNm mutant sous sa forme « soluble », c'est-à-dire non organisée en foci alors que la protéine MBNL1 se fixe à l'ARNm mutant sous sa forme « insoluble », c'est-à-dire celle qui forme les foci. (b) En se fixant sur la forme soluble de l'ARNm mutant, la protéine MBNL1 déplacerait la protéine CUGBP1 et favoriserait la transition vers la forme insoluble de l'ARNm mutant entraînant la formation des foci.

(D'après Junghans, 2009).

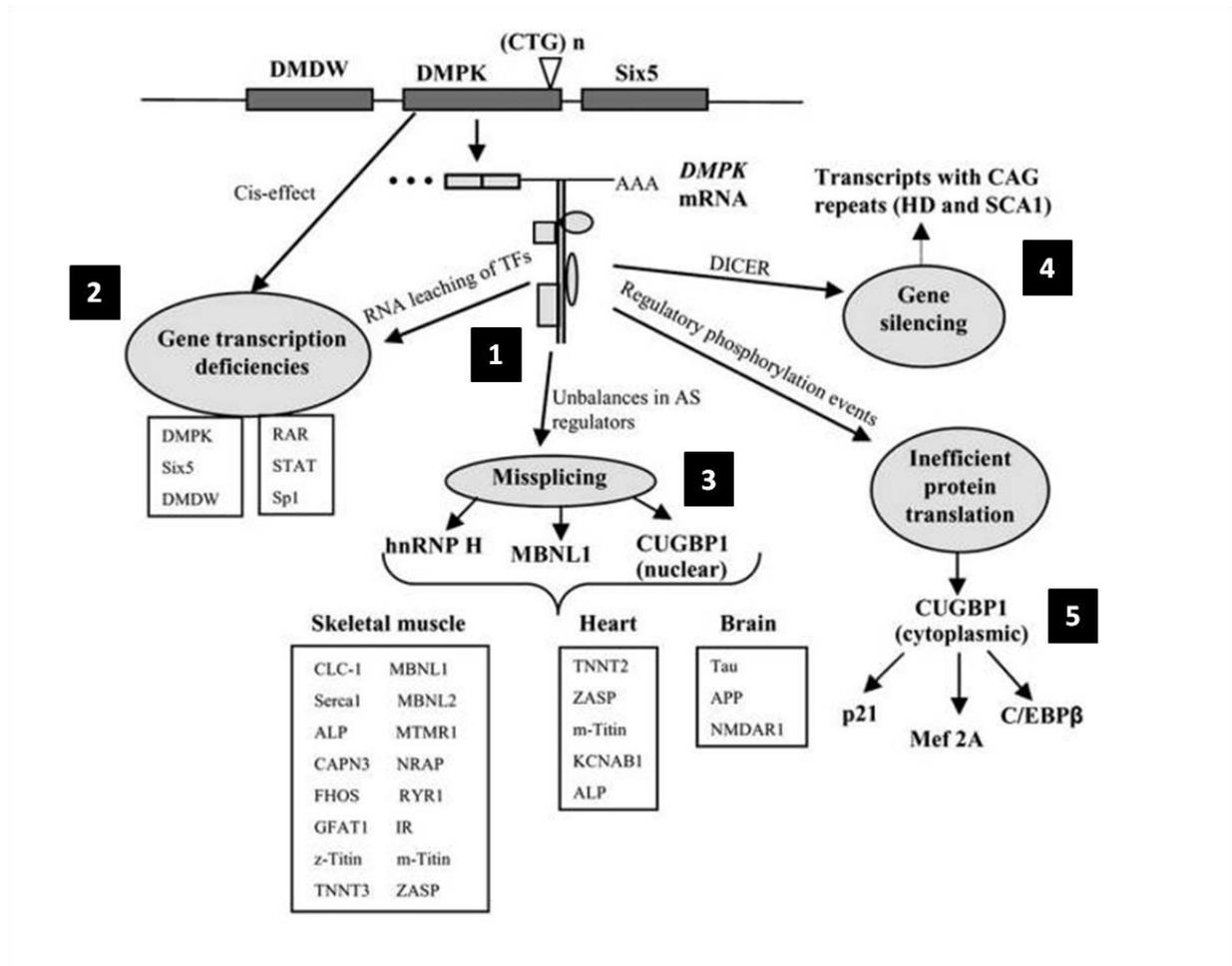
## 6.5. Autres modèles de mécanismes physiopathologiques

Le modèle présenté ci-dessus selon lequel les foci jouent un rôle central dans la maladie est aujourd'hui bien accepté par la communauté scientifique. Cependant, l'équipe de Mani S. Mahadevan a montré que des souris transgéniques sur-exprimant à un haut niveau d'expression et de manière réversible des séquences CTG de taille normale (CTG<sub>5</sub>) présentent elles aussi des anomalies cardiaques et une myotonie ressemblant au phénotype DM1 (Mahadevan et al., 2006). Dans ce modèle, il n'y a pas de formation de foci suggérant la possibilité d'un effet toxique de l'ARN mutant indépendant de sa séquestration nucléaire. Dans ce cas, c'est la surexpression à haut niveau de CTG sans expansion qui reproduirait le même effet que la séquence répétée exprimée plus faiblement.

Par ailleurs, l'apparente contradiction existant entre les données biochimiques indiquant que CUGBP1 puisse se fixer *in vitro* sur les répétitions (CUG)<sub>n</sub> et l'absence de co-localisation de cette protéine avec les foci a mené certains auteurs comme Richard Junghans, de l'université de Boston à proposer de nouveaux modèles (Junghans, 2009). Ce dernier émet l'hypothèse que l'ARNm mutant contenu dans les foci ne représente en fait qu'une fraction (dite insoluble) de l'ARNm mutant total et qu'une autre fraction (dite soluble) ne s'agrège pas en foci mais reste libre avec éventuellement d'autres propriétés physiques permettant l'interaction avec d'autres protéines. Ce modèle a le mérite de proposer une explication à certaines données qui semblent contradictoires sans remettre en cause le modèle actuel (**Figure 52**).

Par ailleurs, la même équipe propose l'existence d'autres conséquences de la toxicité en *trans* des ARNm mutants. L'une d'entre elles concerne les différences d'expression génique existant entre les échantillons DM et leur contrôle dont les modulations ne peuvent pas toutes être expliquées par les défauts d'épissage médiés par MBNL1 et CUGBP1. Dans son modèle, il démontre que les ARNm mutants sont capables de fixer, en plus des facteurs d'épissage, des facteurs de transcription qui seraient ainsi déplétés de leur structure chromatinienne avec comme conséquence, une dérégulation de l'expression de nombreux gènes. Plusieurs facteurs de transcription impliqués dans les voies de transduction du signal comme Stat1 ou Stat3 ou dans la maintenance cellulaire comme Sp1 et Sp3 ou encore dans la différenciation comme Rary, suivent ce mécanisme. Par exemple, il a été montré que le facteur Sp1 pouvait lorsqu'il était surexprimé rétablir une expression normale du gène *CLCN1* codant le canal chlore (Ebralidze et al., 2004).

Récemment, l'équipe de Mahadevan a trouvé dans leur modèle de souris transgénique inductible une augmentation d'un autre facteur de transcription, *Nkx2.5*, qui est impliqué



**Figure 53 : Résumé des mécanismes physiopathologiques de la DM1.**

La toxicité médiée par les répétitions entraîne de nombreuses anomalies incluant : (1) la séquestration de facteurs d'épissages et de divers facteurs de transcription; (2) des anomalies d'expression de certains gènes. (3) des anomalies d'épissages causées par les facteurs d'épissage MBNL1, CUGBP1 ou hnRNP H ; (4) des anomalies épigénétiques responsables de l'inhibition génique de certains gènes ; ce mécanisme serait commun avec d'autres pathologie comme la maladie de Huntington ou l'ataxie SCA1 ; (5) des anomalies de la traduction causées par la protéine CUGBP1.

(D'après Llamusi, 2008).

notamment dans le développement cardiaque (Yadava et al., 2008). Ces auteurs montrent que cette augmentation entraîne une forte diminution des connexines 40 et 43, qui sont des jonctions communicantes nécessaires à la conduction cardiaque. Ils observent aussi de manière réversible après l'induction du transgène des anomalies de conduction cardiaques (Lo, 2000). Ces deux études montrent que l'effet toxique de l'ARNm peut entraîner la modulation de la transcription qui mène en aval à un phénotype pathologique cohérent avec la maladie. On ignore pour l'instant s'il existe des relations avec les facteurs d'épissage et s'il s'agit réellement d'un nouveau mécanisme pathologique.

En conclusion, la DM1 est une maladie multisystémique associant des symptômes variés dans de nombreux tissus. Les hypothèses et mécanismes qui ont été décrits dans cette partie montrent qu'il s'agit d'une maladie particulièrement complexe (**Figure 53**). Toutefois, même s'il reste des questions à résoudre, les mécanismes physiopathologiques majeurs -au moins pour le muscle et le cœur- ont été identifiés. Bien qu'il n'existe toujours pas à l'heure actuelle de traitement curatif, la quantité de connaissance accumulée sur la physiopathologie de cette maladie laisse entrevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques dont le développement s'est accéléré depuis quelques années (Wheeler, 2008).

## **VII. Stratégies thérapeutiques**

### **7.1. Prise en charge médicale des patients DM1**

La DM1 est une maladie d'évolution progressive. Aussi, la surveillance médicale de ces malades est tout à fait essentielle. Elle nécessite un suivi multidisciplinaire régulier dans un centre de référence pour maladies neuromusculaires. Ce suivi inclut notamment un examen clinique de la force musculaire afin de rechercher des signes d'aggravation de l'atrophie du muscle et la réalisation d'un électrocardiogramme tous les ans à la recherche d'anomalies de conduction -notamment de signes de tachyarrhythmie ventriculaire- qui constituent un facteur majeur de risque de mort subite. Il est également important de réaliser un examen pneumologique régulier à la recherche de signes de détresse respiratoire et d'infections. L'examen ophtalmologique recherchera la présence d'une cataracte et d'un trouble de l'acuité visuelle. Un bilan psychiatrique et psychologique peut se révéler nécessaire mais il n'est pas systématique. Enfin, un bilan biologique régulier est indispensable. Il inclut au minimum une



glycémie à jeun complétée, le cas échéant, par une hyperglycémie provoquée par voie orale ainsi qu'un bilan lipidique afin de détecter et prévenir les conséquences d'un diabète de type II.

- **la prise en charge médicamenteuse de la myotonie :**

Elle se fait essentiellement par l'utilisation d'antiarythmiques dont l'efficacité résulte probablement de leur effet stabilisant des membranes. Le Mexitil® (mexilitine) figure parmi les médicaments prescrits en première intention. Il s'agit d'un antiarythmique de classe Ib dont l'indication usuelle est la prise en charge des troubles du rythme tels que des extrasystoles ventriculaires et la prévention des tachycardies. Le Dihydan® (diphénylhydantoïne) peut également être utilisé. Il s'agit d'un anticonvulsivant indiqué pour la prise en charge de l'épilepsie, des névralgies faciales essentielles ainsi que des troubles du rythme cardiaque. En seconde intention, il est possible d'administrer de la quinine (ou de la procainamide) qui, bien que non commercialisée en France, peut être disponible via la Pharmacie Centrale des Hôpitaux.

- **la prise en charge médicamenteuse de l'atrophie/faiblesse musculaire :**

Il n'existe pas actuellement de molécules ayant prouvées leur efficacité mais plusieurs molécules, probablement non spécifiques de la DM1, ont été testées ou sont en cours d'évaluation. L'atrophie musculaire des malades DM1 résulte plutôt d'un défaut de l'anabolisme que d'une dégénérescence musculaire fibro-nécrotique comme observée dans d'autres pathologies (Griggs et al., 1990; Halliday et al., 1985). Cette observation conduit à l'idée qu'un fort stimulus anabolisant pourrait apporter une solution thérapeutique. Les essais cliniques utilisant le monohydrate de créatine ou de la testostérone n'ont montré aucun effet thérapeutique (Griggs et al., 1990; Walter et al., 2002). En revanche les résultats d'une étude pilote concernant l'utilisation de la DHEA (Déhydroandrosténédione) dont les taux circulants semblent être diminués chez les patients (Buyalos et al., 1998), ont révélé un possible effet thérapeutique chez un petit nombre de malades (Sugino et al., 1998). Par contre, les résultats d'une étude clinique multicentrique incluant 75 adultes DM1, traités contre placebo, n'a pas démontré de différence entre les groupes sur l'augmentation de la force musculaire (Penisson-Besnier et al., 2008). Par ailleurs, l'IGF-1 (insulin-like growth factor-1) est connu pour avoir l'effet anabolisant le plus fort et des arguments sont en faveur de son utilisation thérapeutique (Barton et al., 2002; Musaro et al., 2001; Musaro et al., 1999). Une étude préliminaire utilisant



l'IGF recombinant (rhIGF) a montré un effet sur la force et la fonction musculaire chez les patients DM1 (Vlachopapadopoulou et al., 1995). Aujourd'hui, une étude clinique a étudié l'effet sur la masse musculaire d'une injection journalière sous-cutanée de l'association de rhIGF complexé à l'IGFBP3 (insulin-like growth factor-binding protein 3) formulée sous le nom commercial d'iPLEX<sup>TM</sup>. L'analyse des résultats montre l'innocuité du traitement et un effet notamment sur la sensibilité à l'insuline mais pas d'effet significatif sur l'endurance, la fonction et la force musculaire ou sur la qualité de vie des patients. Une dernière option thérapeutique concerne l'inhibition de la myostatine, une protéine circulante sécrétée par le muscle, qui agit comme un inhibiteur de la croissance et de la fonction musculaire. L'action anabolisante d'un inhibiteur de cette protéine, le MYO-029, est actuellement à l'étude dans DM1 ainsi que d'autres stratégies visant à intervenir sur le métabolisme de la myostatine. Cependant, son effet thérapeutique dans d'autres maladies musculaires n'a pas pu être démontré (Wagner et al., 2008).

- **la prise en charge médicamenteuse des troubles cardiaques :**

La prise en charge des troubles du rythme et de la conduction cardiaque inclut l'utilisation de quinine ou de  $\beta$ -bloquant. Les médicaments tels que les bronchodilatateurs ou les agonistes adrénergiques sont à éviter en raison du risque arythmogène. En cas de troubles importants, il est possible de recourir à un pacemaker.

- **la prise en charge des autres symptômes et recommandations générales :**

Parmi les autres symptômes, la prise en charge des troubles de l'humeur peut nécessiter l'utilisation d'un traitement par un antidépresseur, l'imipramine et l'hypersomnie nécessite l'administration de méthylphénydate. Parmi les recommandations générales, il faut noter une prudence particulière vis-à-vis de la prise de certains médicaments notamment les analgésiques morphiniques qui sont déconseillés en raison des risques d'exacerbation des symptômes respiratoires. Enfin, l'utilisation complémentaire de décontractant musculaire tel que le Decontractyl® (méphénésine) ou le Myolastan® (tétrazépam) et le recours à la kinésithérapie permettent d'améliorer la prise en charge de la douleur. La pratique de sport est à considérer en fonction des résultats des examens cardiologiques.

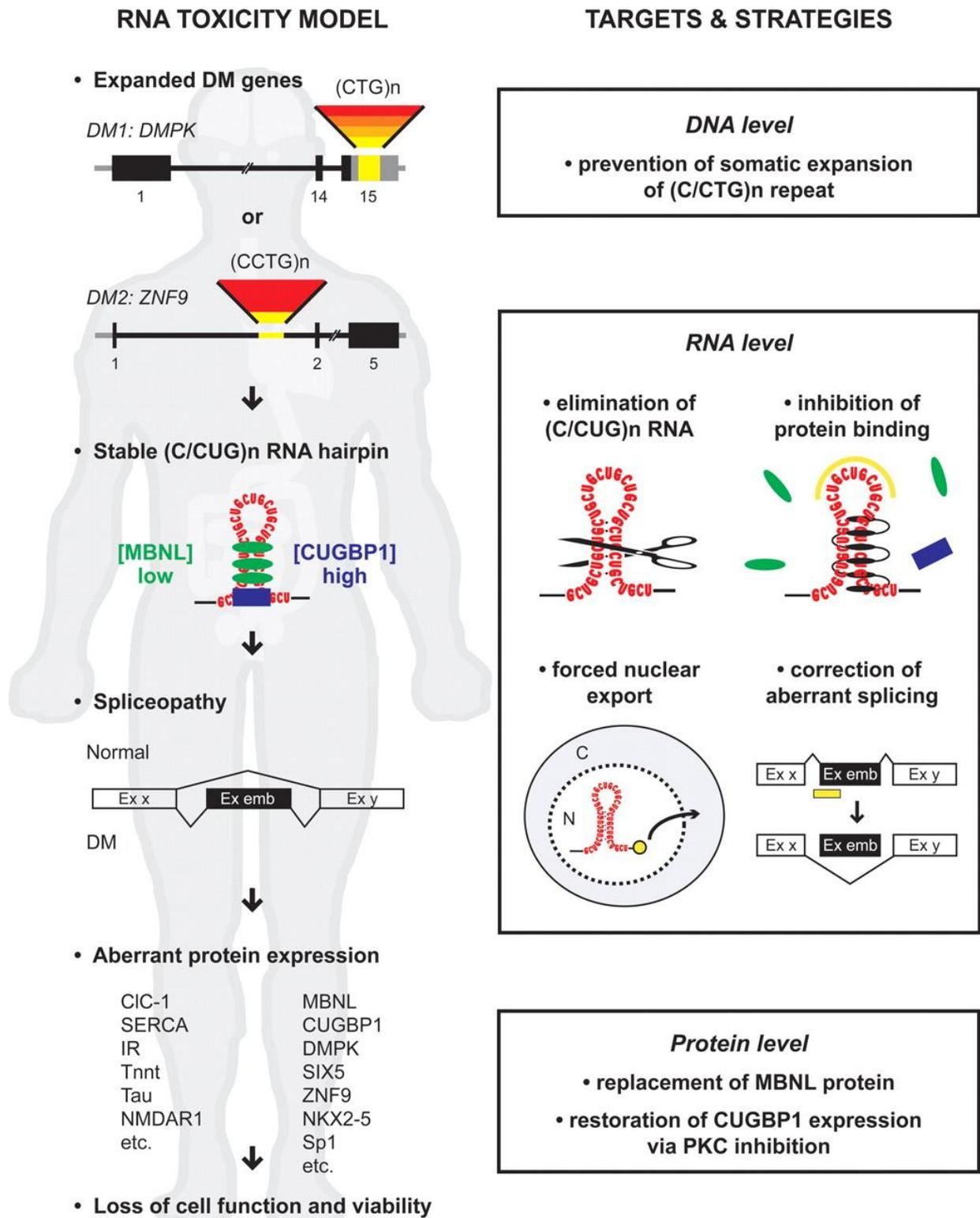


Figure 54 : Présentation des stratégies thérapeutiques basées sur les différentes cibles impliquées dans la physiopathologie de la DM1.

(D'après Mulders 2010).

## 7.2. Stratégies de recherche pour le développement de nouvelles thérapeutiques

Les connaissances accumulées sur les mécanismes physiopathologiques de la DM1 ont conduit à proposer de nouvelles thérapeutiques basées sur des cibles bien définies incluant (**Figure 54**) : (1) l'ADN, en diminuant l'instabilité dynamique des séquences porteuses des expansions CTG ; (2) l'ARNm toxique, soit en induisant sa déstabilisation et finalement sa destruction, soit en levant sa rétention nucléaire afin qu'il soit « normalement » transporté hors du noyau empêchant ainsi sa toxicité par gain de fonction ; (3) la protéine MBNL1 qui, comme nous l'avons vu joue un rôle tout à fait central. L'induction de sa surexpression ou le fait d'empêcher sa fixation sur les foci permettrait de restaurer un pool libre efficace dans le noyau suffisant pour rétablir sa fonction normale d'épissage. ; (4) la protéine CUGBP dont la surexpression induit l'activation de la voie de signalisation des PKC et qui peut être prévenue par l'utilisation d'inhibiteur ; (5) le mécanisme de l'épissage concernant les gènes dont l'anomalie est majeure comme l'épissage du canal chlore responsable de la myotonie.

### 7.2.1. Cibler la mutation au niveau de l'ADN en modulant la taille des expansions

Dans la DM1, et de manière plus générale dans les maladies génétiques à répétitions, une opportunité thérapeutique, au plus près de la mutation, serait de pouvoir moduler la taille de ces expansions. Plusieurs études réalisées notamment sur la levure ont montré que la modulation de l'instabilité génétique pouvaient être causée par des protéines intervenant dans la réplication, la réparation des mésappariements, la transcription ou la recombinaison (Lopez Castel et al . 2010). Une autre étude réalisée chez la souris a impliqué des enzymes du complexe de réparation des mésappariements de l'ADN, le complexe MutSbeta (*MSH2* et *MSH3*), dans l'instabilité des triplets CTG. Les souris transgéniques de l'équipe de Geneviève Gourdon à l'Hôpital Necker à Paris, portant de larges expansions CTG, ont été croisées avec des souris *MSH2*<sup>-/-</sup> ou *MSH3*<sup>-/-</sup> (Foiry et al., 2006; Savouret et al., 2003; Savouret et al., 2004) ou avec des souris portant la mutation G674A dans le domaine ATPase de *MSH2* (Tome et al., 2009). Dans les deux cas, une contraction des répétitions CTG a été observée impliquant l'activité de ce complexe dans la génération de l'instabilité génétique. Des études complémentaires restent néanmoins nécessaires pour préciser le mécanisme en jeu et envisager d'éventuelles pistes thérapeutiques. D'autres gènes candidats ayant une action protectrice sur l'instabilité génétique ont été découverts chez la levure comme *Mrc1* (*replication checkpoint protein*) , *Tof1*

<b>Equipe</b>	<b>Stratégie</b>	<b>Modèle(s)</b>	<b>Résultats</b>	<b>Références</b>
Puymirat	ARN antisens de 149 pb complémentaire de (CUG) <sup>13</sup> et de la région de 110 pb adjacente	rétrovirus dans myoblastes de patient	- diminution de 80 et 50% de l'ARNm muté et non muté - restauration de la fusion des myoblastes et de la capture du glucose - normalisation de la quantité de CUGBP1	Furling <i>et al.</i> , 2003
Puymirat	"hammerhead" ribozymes nucléaires	myoblastes de patient	- diminution de 63 et 50% de l'ARNm muté et non muté - diminution du nombre de foci - amélioration de l'épissage de l' <i>INSR</i>	Langlois <i>et al.</i> , 2003
Puymirat	shARN ciblant la DMPK	lentivirus dans myoblastes de patient (3200 répétitions)	diminution d'environ 50% de l'ARNm muté nucléaire et d'au moins 70% de l'ARNm non muté nucléaire et cytoplasmique respectivement	Langlois <i>et al.</i> , 2005
Krzyzosiak	siRNA (CAG) <sup>7</sup>	fibroblastes de patients	réduction marquée de la quantité d'ARNm muté avec très peu d'effet sur l'allèle non muté	Krol <i>et al.</i> , 2007
Thornton	siRNA ciblant (CUG) <sup>n</sup>	injection intramusculaire dans souris HSALR	- diminution de 70-80% de l'ARNm muté - très peu d'effet sur transcrit portant CUG non répétés - diminution marquée foci nucléaires (nombre et intensité) et diminution séquestration MBNL1 - amélioration épissages : <i>INSR</i> , <i>cTNT</i> , <i>CLCN1</i> - amélioration myotonie	Sobczak <i>et al.</i> , 2009
Wansink	AONs (antisens oligonucleotides)	- screening dans modèles myoblastes/myotubes de souris (500 CTG) et patients - validation dans modèles souris DM500 (Gourdon G) et HSALR	- identification 2 -O-methyl-phosphorothioatemoifid (CAG) <sup>7</sup> AON - extinction ARMm muté (90% <i>in vitro</i> , 30 à 80% <i>in vivo</i> ) - diminution foci - souris : administration musculaire : diminution ARNm muté et amélioration d'épissages ( <i>Serca1</i> , <i>Mbn11</i> , <i>Ttn</i> , <i>Cln1</i> , <i>Tnnt3</i> ) - en cours : optimisation en faisant varier tailles et modifications chimiques au niveau AONs	Mulders <i>et al.</i> , 2009a; Mulders <i>et al.</i> , 2009b
Furling	antisens au sein d'un gène sU7-snRNA	transduction lentivirus dans myoblastes de patient	- diminution de 70-80% ARNm muté - diminution du nombre de cellules ayant des foci et libération de MBNL1 - correction de défauts d'épissages dans les myotubes - restauration de la différenciation myogénique	François <i>et al.</i> , 2009

**Tableau 10 : Stratégies anti-sens utilisées dans le but de dégrader l'ARNm DMPK muté.**

(D'après Laustriat, 2010).

(*topoisomérase associated factor*), Csm1 (*segregation in meiosis protein 1*) (Razidlo and Lahue, 2008) ou les protéines de recombinaison Rec ou Srs2 (Dhar and Lahue, 2008). A l'inverse, la diminution d'autres protéines impliquées dans la réplication, comme Fen-1 (*replicative flap endonuclease*) (Moe et al., 2008) ou Lig-1 (*ligase-1*) sont impliquées dans l'augmentation de l'instabilité (Lopez Castel, 2009). Enfin, une dernière étude a montré un effet contractant de certaines drogues anticancéreuses sur les répétitions (CTG)<sub>n</sub> au niveau de l'ADN de lymphoblastes dérivés de patients DM1 mais le mécanisme d'action n'est pas connu (Hashem et al., 2004).

En conclusion, et en l'état actuel des connaissances, il n'est pas certain que cette approche puisse ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques.

### ***7.2.2 Cibler l'ARNm mutant en induisant sa dégradation, sa réparation ou son expulsion hors du noyau***

Dans la mesure où les ARNs mutants sont au centre de la plupart des mécanismes physiopathologiques de la DM1, ils constituent une cible thérapeutique privilégiée. On peut envisager de les dégrader, de les réparer en éliminant les répétitions CTG ou d'induire leur expulsion hors du noyau.

- **Dégrader l'ARNm muté**

Les premiers travaux visant à dégrader les ARN mutants ont été publiés en 2003 par l'équipe de Jack Puymirat au CHU de Laval au Québec (**Tableau 10**). Dans ce but, ces chercheurs ont utilisé différents outils d'inhibition génique incluant des ARN antisens ou des shARN ainsi que des ribozymes nucléaires. Ces approches ont montré qu'il était possible de diminuer les quantités d'ARNm mutants jusqu'à 80% mais que cet effet n'était pas spécifique et qu'environ la moitié des ARNm non mutants étaient aussi dégradés (Furling et al., 2003; Langlois et al., 2005; Langlois et al., 2003). Ces résultats sont intéressants dans la mesure où ils proposent un concept innovant mais ils ne permettent pas d'envisager une utilisation thérapeutique tant que le problème de spécificité n'est pas réglé.

D'autres approches plus récentes, basées sur une réduction spécifique de l'ARN mutant, ont été développées et semblent apporter de meilleurs résultats.

La première stratégie consiste à utiliser de petits ARNs (siRNA) dirigés contre les répétitions (CUG)<sub>n</sub>. Le mécanisme d'action mis en jeu est celui de l'interférence à l'ARN



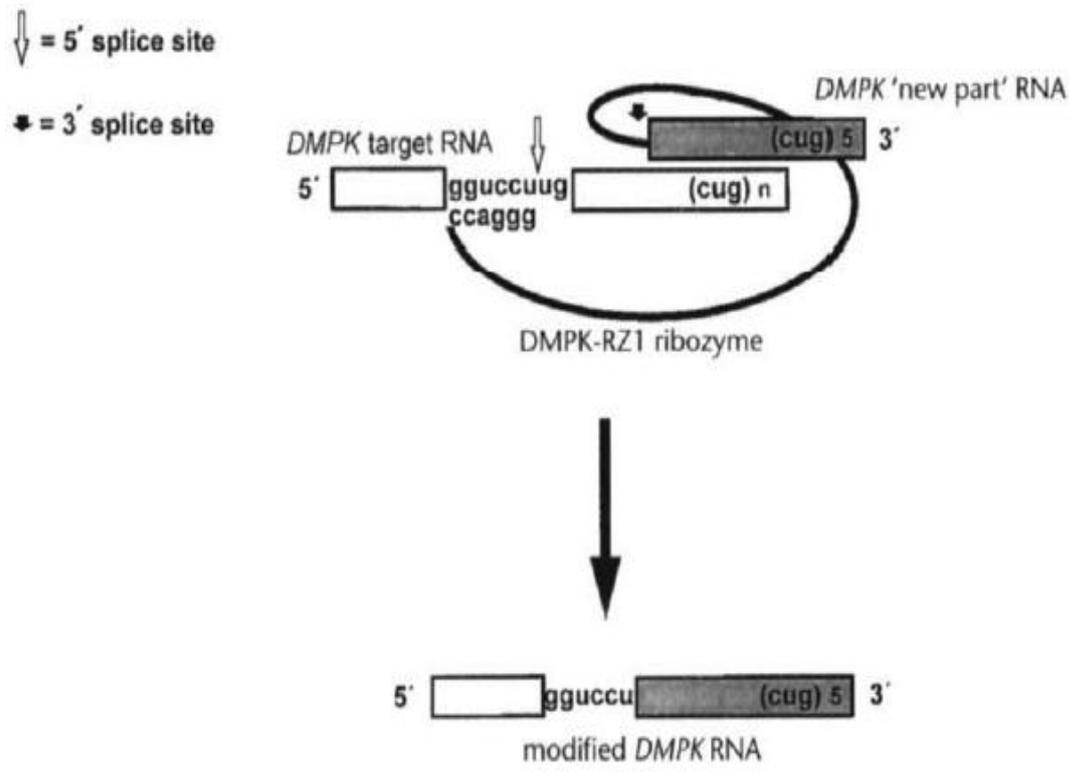
médiée par la Ribonucléase Dicer. Cette dernière reconnaît les ARNs double brin (dsRNA) et induit un clivage enzymatique ciblé sur les répétitions. L'équipe polonaise de l'Institut de chimie bioorganique dirigée par Wlodzimierz J. Kryzosiak a démontré l'efficacité de cette approche en publiant en 2007 une première étude. Celle-ci démontre que la transfection de ces siRNA appelés (CUG)<sub>7</sub> dans des fibroblastes de souris DM1 réduit nettement les quantités d'ARNm muté avec très peu d'effet sur l'allèle normal (Krol, 2007). Par ailleurs, l'équipe de Charles Thornton a présenté lors du congrès IDMC-7 en Septembre 2009 à Würzburg en Allemagne, une stratégie identique basée sur l'utilisation de siRNAs dirigés contre les répétitions (CUG)<sub>n</sub> de l'ARNm mutant. Leurs résultats préliminaires montrent qu'une seule injection de siRNA dans le modèle de souris HSA<sup>LR réduit</sup> spécifiquement l'ARNm mutant de 70-80% avec restauration du profil d'épissage normal du gène CLCN1 et une diminution marquée de la myotonie (Sobczak, 2009).

La seconde approche utilise la technologie des oligonucléotides antisens pour induire l'extinction post-transcriptionnelle du transcrit mutant (Du and Gatti, 2009). Parmi, les oligonucléotides synthétisés et modifiés chimiquement, l'oligonucléotide appelé (CAG)<sub>7</sub> semble apporter des résultats très encourageants avec des taux d'extinction de l'ordre de 90% dans un modèle de myoblastes/myotubes de patients (500CTG) et de l'ordre de 80% dans les modèles de souris DM500 et HSA<sup>LR</sup>. Cet effet est accompagné d'une diminution du nombre de foci et d'une amélioration du profil d'épissage. L'optimisation des oligonucléotides antisens actuellement en cours porte sur la taille des CAG et des modifications chimiques (Mulders, 2009).

Une dernière stratégie présentée également au congrès IDMC-7 par Denis Furling et Luis Garcia de l'Institut de Myologie de Paris propose d'utiliser la transduction d'un vecteur lentiviral antisens au sein d'un gène sU7-snrRNA. Les effets obtenus sont équivalents aux autres approches avec une destruction de l'ordre de 80-90% de l'ARNm mutant, sans effet sur l'allèle normal, ni toxicité, associée à une disparition des foci et à une restauration du profil d'épissage. Cette nouvelle stratégie thérapeutique est actuellement testée sur les modèles animaux de la DM1.

- **Réparer l'ARNm muté**

De nouvelles thérapies basées sur la possibilité de manipulation de l'épissage du pré-mRNA pour corriger les transcrits apparaît comme une nouvelle opportunité thérapeutique pour de



**Figure 55 : Stratégie visant à réparer l'ARNm muté par *trans*-épissage.**

Dans cette représentation schématique, le pré-mRNA comprend deux exons dont le deuxième porte l'extention CTG. L'utilisation de PTM (pre-trans-splicing molecule) permet la suppression de la mutation en remplaçant l'exon muté. Le PTM se lie au pré-ARNm par appariement de séquences, ce qui masque en partie le site 3' d'épissage. La réaction d'épissage normale est donc bloquée et le domaine de trans-épissage du PTM peut jouer le rôle d'un site 3' d'épissage. Le PTM apporte l'exon dépourvu de mutation, ce qui permet la réparation de l'ARNm.

(D'après Phylactou, 1998).

nombreuses maladies neuro-musculaires incluant la DM1 (Wood et al. 2010). Dans la DM1, une étude pilote assez ancienne s'était attachée à mettre au point un système de réparation de l'ARNm muté par un mécanisme de trans-épissage en substituant à un nombre de répétitions CUG donné, un nombre plus faible (Phylactou et al., 1998) (**Figure 55**). Très récemment, une seconde étude de l'Université de Singapour a examiné la possibilité d'utiliser de petites molécules correctives d'épissage basées sur la technologie SMaRT (Intronn proprietary technology) pour corriger artificiellement les ARNm mutants par trans-épissage. Bien que la preuve de concept soit apportée, les pourcentages de correction sont très faibles (de 1.81 à 7.41%) et des progrès sont nécessaires pour pouvoir envisager une approche thérapeutique par cette stratégie (Chen et al., 2009).

- **Expulser l'ARNm muté hors du noyau**

L'effet trans-dominant toxique de l'ARNm mutant est principalement du au fait que celui-ci est retenu dans le noyau. Une solution thérapeutique consisterait à pouvoir le faire sortir du compartiment nucléaire pour qu'il soit dégradé normalement dans le cytoplasme. L'effet positif sur le phénotype DM1 de l'expulsion de l'ARNm mutant vers le cytoplasme a été suggéré par les travaux de deux équipes. Cette observation a tout d'abord été apportée par l'équipe chypriote de Mastroiannopoulos à l'Institut de neurologie et génétique de Nicosie (Mastroiannopoulos et al., 2008; Mastroiannopoulos et al., 2005). Ces auteurs ont montré que des constructions GFP contenant la région 3'-UTR de la DMPK couplés ou non à la séquence WPRE (*Woodchuck Post-transcriptional Regulatory Element*) favorise l'export cytoplasmique des transcrits. L'export des transcrits vers le cytoplasme entraîne la formation de foci cytoplasmiques et une restauration partielle des capacités de différenciation des myoblastes en myotubes. Cette équipe n'est pas la seule à avoir rapporté un tel effet thérapeutique puisque l'équipe de Dansithong a également observé au niveau cardiaque dans leur modèle murin exprimant des répétitions CTG que les foci cytoplasmiques n'étaient pas toxiques et n'entraînaient pas de défaut d'épissage (Dansithong et al., 2008).

### ***7.2.3 Cibler les facteurs d'épissage MBNL1 et CUGBP1***

Comme nous l'avons vu précédemment, les protéines MBNL1 et CUGBP1 sont au centre du mécanisme physiopathologique.

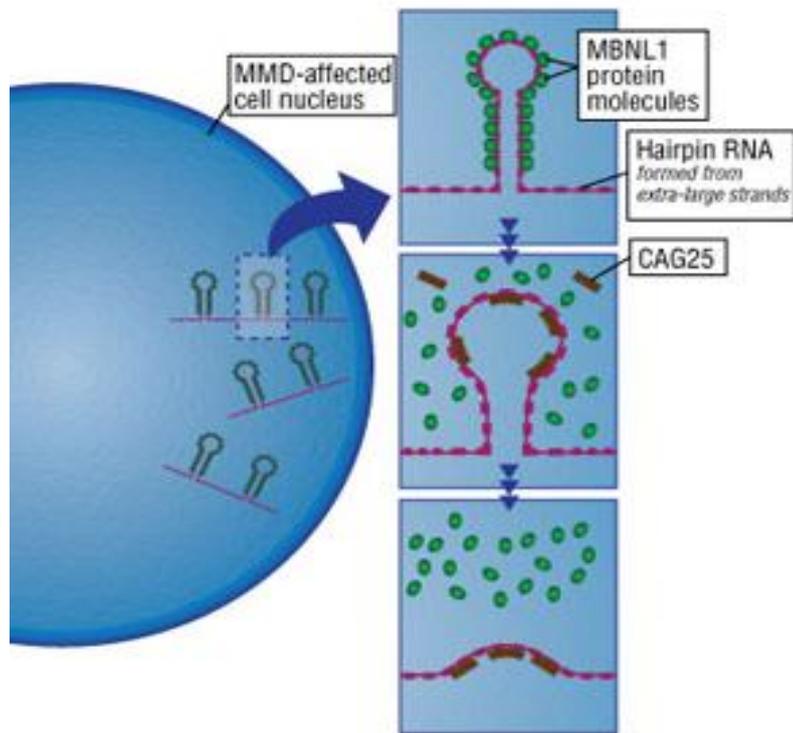


Figure 56 : Approches ciblant la protéine MBNL1 par une approche utilisant un oligonucléotide antisens. (Source : [www.mda.org](http://www.mda.org)).

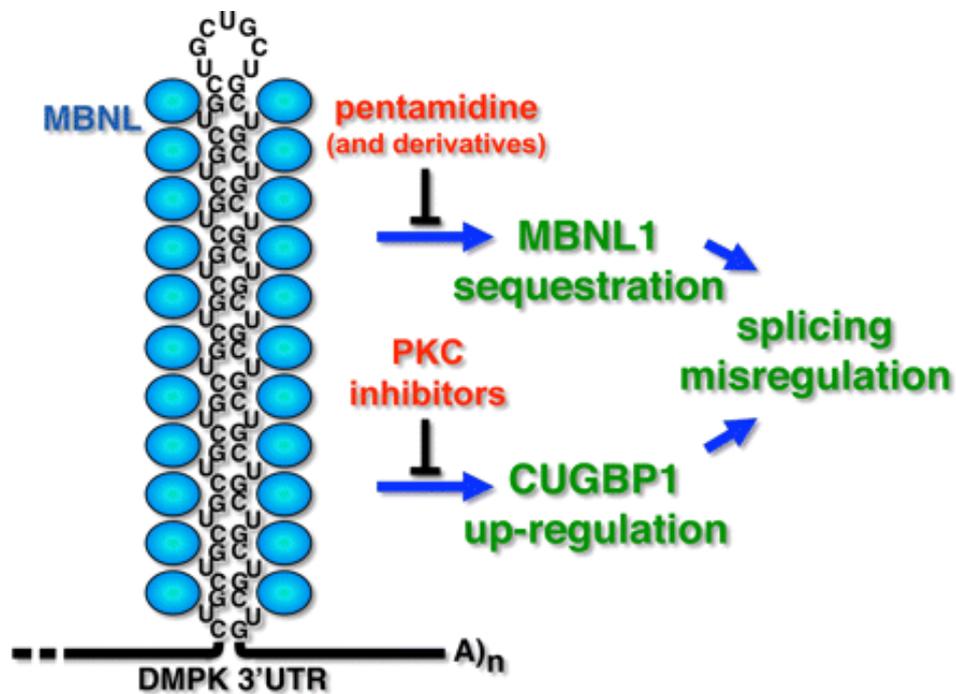


Figure 57 : Approches pharmacologiques ciblant les protéines MBNL1 et CUGBP1. (D'après Cooper, 2009).

- **Cibler MBNL1**

L'une des stratégies thérapeutiques pour restaurer un profil d'épissage normal serait de pouvoir compenser la perte d'efficacité de MBNL1 due à sa rétention par les ARNm mutants. Deux stratégies ont été développées, soit en empêchant et/ou en déplaçant la fixation de ce facteur d'épissage sur les expansions CUG, soit en sur-exprimant la protéine. Dans les deux cas, cela permettrait de normaliser sa concentration efficace.

Deux méthodes ont été développées pour déplacer les protéines MBNL1 fixées sur les expansions de CTG. Dans la première, l'équipe de Charles Thornton a utilisé une approche par oligonucléotides antisens (AONs) de type (CAG)<sub>25</sub> qui vont se fixer sur les répétitions CTG et empêcher la fixation de la protéine MBNL1 (Wheeler, 2009) (**Figure 56**). Elle a alors observé, en plus de l'effet bloquant recherché, une dispersion des foci nucléaires dans le tissu musculaire des souris HSA<sup>LR</sup>. Dans la mesure où les antisens utilisés de type morpholino ne déclenchent pas de dégradation médiée par interférence à l'ARN, cet effet a été attribué à une déstabilisation de la structure du foci en l'absence des protéines MBNL1. L'effet des AONs (CAG)<sub>25</sub> s'accompagne d'une normalisation partielle du profil d'épissage et notamment de celui de CLCN1, associé à une normalisation de la localisation, de l'activité du canal chlore et à la diminution de la myotonie. Dans la deuxième stratégie, des petites molécules capables de déplacer les protéines MBNL1 des ARNs mutants ont été recherchées. Bien que certaines molécules alkylantes comme la cisplatine soient connues pour fixer l'ADN, la possibilité qu'une petite molécule puisse cibler de manière spécifique un ARNm est en cours d'évaluation (DeJong et al., 2002; Thomas and Hergenrother, 2008). Plusieurs études récentes ont testées cette hypothèse dans le cadre de la DM1 (**Tableau 11**). Parmi ces résultats, l'étude de l'équipe de Andrew Berglund de l'université de l'Oregon {Warf, 2009 #2} a rapporté récemment que la pentamidine, un antiparasitaire utilisé dans le traitement des infections à *Pneumocystis carinii* des patients atteints du VIH, était capable de déplacer les molécules MBNL1 des répétitions CUG *in vitro* (**Figure 57**). Par ailleurs, ces auteurs ont montré que cette molécule était également capable de restaurer partiellement le profil d'épissage normal de l'INSR et de cTNT à la fois dans un modèle de cellules HeLa transfectées avec un plasmide contenant 960 CTG et chez la souris HSA<sup>LR</sup>.

L'ensemble de ces résultats démontre la validité de cette approche thérapeutique mais des études complémentaires sont nécessaires car la concentration utilisée est toxique. Notons que l'équipe américaine de Christopher Austin du National Institute of Health a annoncé au congrès

<b>Equipe</b>	<b>Stratégie</b>	<b>Modèle(s)</b>	<b>Résultats</b>	<b>Références</b>
<b>Thornton</b>	AONs morpholinos de 25 nucléotides "CAG25" (morpholino : pas de clivage de l'ARN cible)	injection intramusculaire et électroporation dans souris HSALR	- réduction foci nucléaires et libération MBNL1 - correction d'anomalies d'épissages associées à la perte de fonction de MBNL1 ( <i>Cln1</i> , <i>Serca1</i> , <i>m-Ttn</i> , <i>Zasp</i> ) et persistance de l'effet 14 semaines après injection - restauration de la myotonie	Wheeler <i>et al.</i> , 2009
<b>Berglund</b>	petites molécules	- modèle cellulaire : lignée Hela - modèle souris HSALR	- identification pentamidine et néomycine B permettant de diminuer la liaison de MBNL1 aux motifs CUG <i>in vitro</i> - pentamidine : amélioration d'anomalies d'épissages associées à MBNL1 ( <i>INSR</i> et <i>cTNT</i> <i>via</i> minigènes) et diminution des foci et donc de la séquestration de MBNL1 - restauration partielle épissages <i>in vivo</i> ( <i>Cln1</i> et <i>Serca1</i> ) mais impossibilité d'augmenter davantage les doses administrées sinon toxicité - en cours : résultats intéressants avec heptamidine	Warf <i>et al.</i> , 2009b; Warf <i>et al.</i> , 2009c
<b>Zimmerman</b>	petites molécules	/	- mise au point rationnelle d'un Ligand "1" pour sa capacité à se fixer aux répétitions CUG - Ligand 1 déstabilise les complexes formés de MBNL1 et des (CUG) <sub>4</sub> et (CUG) <sub>12</sub>	Arambula <i>et al.</i> , 2009
<b>Miller</b>	petites molécules	/	- criblage de 11325 composés résultant de synthèse combinatoire pour leur capacité à se fixer de manière sélective aux motifs (CUG) <sub>n</sub> - identification de composés qui peuvent, de plus, interférer avec la liaison de MBNL1 aux répétitions	Gareiss <i>et al.</i> , 2008
<b>Disney</b>	petites molécules	/	rational design de ligands pour leur capacité à se fixer de manière sélective aux motifs (CUG) <sub>n</sub> et identification de composés qui peuvent, de plus, interférer avec la liaison de MBNL1 aux répétitions	Lee <i>et al.</i> , 2009c; Pushechnikov <i>et al.</i> , 2009

**Tableau 11 : Approches visant à empêcher la liaison de MBNL1 aux répétitions CUG.**

(D'après, Laustriat 2010).

IDMC-7, le lancement d'un criblage à haut débit basé sur la méthodologie TR-FRET pour la détection de molécules interagissant sur l'interaction ARN-protéine.

A coté de l'approche visant à déplacer MBNL1 de l'ARNm mutant, la surexpression de ce facteur d'épissage pourrait suffire à normaliser sa concentration efficace et rétablir un profil d'épissage normal. Cette approche a été testée dans l'équipe de Maurice Swanson à l'Université de Floride (Kanadia et al., 2006). Les auteurs ont injecté dans le muscle *tibialis anterior* des souris transgéniques HSA<sup>LR</sup>, un vecteur viral AAV (adeno-associated virus) destiné à surexprimer une seule des isoformes de MBNL1 (l'isoforme 41kDa). La surexpression d'un facteur 2 a été suffisante pour saturer les sites de l'ARNm mutant et augmenter la fraction libre de MBNL1 dans le nucléoplasme. Ceci permet la restauration du profil d'épissage normal de *CLCN1* accompagné d'une réversion de la myotonie. Cette même approche a également été testée dans un modèle de drosophile DM1 génétiquement modifié pour exprimer 480 répétitions interrompues (iCUG)<sub>480</sub>. Les drosophiles transgéniques présentent des accumulations de foci nucléaires dans le tissu musculaire, une dégénérescence du muscle et des anomalies de l'œil (taille et désorganisation tissulaire). La surexpression de la MBNL1 humaine dans les drosophiles DM1 conduit également à une réversion du phénotype (de Haro et al., 2006).

L'approche de surexpression de MBNL1 semble donc être une option thérapeutique intéressante. Cependant, l'administration par voie systémique sera nécessaire pour le développement de cette stratégie thérapeutique et le choix du vecteur pourrait éventuellement permettre une administration aux tissus non-musculaires, ce qui serait souhaitable dans la DM1. Bien que non rapportée, l'amélioration des connaissances sur les mécanismes de la régulation génique de *MBNL1* permettra peut-être également de contrôler la surexpression de MBNL1 par de petites molécules.

- **Cibler CUGBP1**

Comme cela été décrit précédemment, les expansions CUG induisent l'activation de la voie de la PKC conduisant à une hyperphosphorylation et une stabilisation de CUGBP1 dans le tissu musculaire squelettique et cardiaque. Dans le but de tester l'effet des inhibiteurs pharmacologiques de la voie PKC, l'équipe de Charles Thornton a choisi le modèle de souris présentant un système inductible de 960 CTG dont l'expression est restreinte au tissu cardiaque (Wang et al., 2007; Wang et al., 2009). Les résultats révèlent un effet de l'inhibiteur Ro-31-



8220 qui prévient l'activation de la PKC et réduit son expression et son degré de phosphorylation (**Figure 57**). L'inhibition de cette voie dans les souris modèles conduit à une restauration du profil d'épissage de certains gènes qui dépendent spécifiquement de CUGBP1 et à une amélioration de l'électrocardiogramme et une diminution de la mortalité.

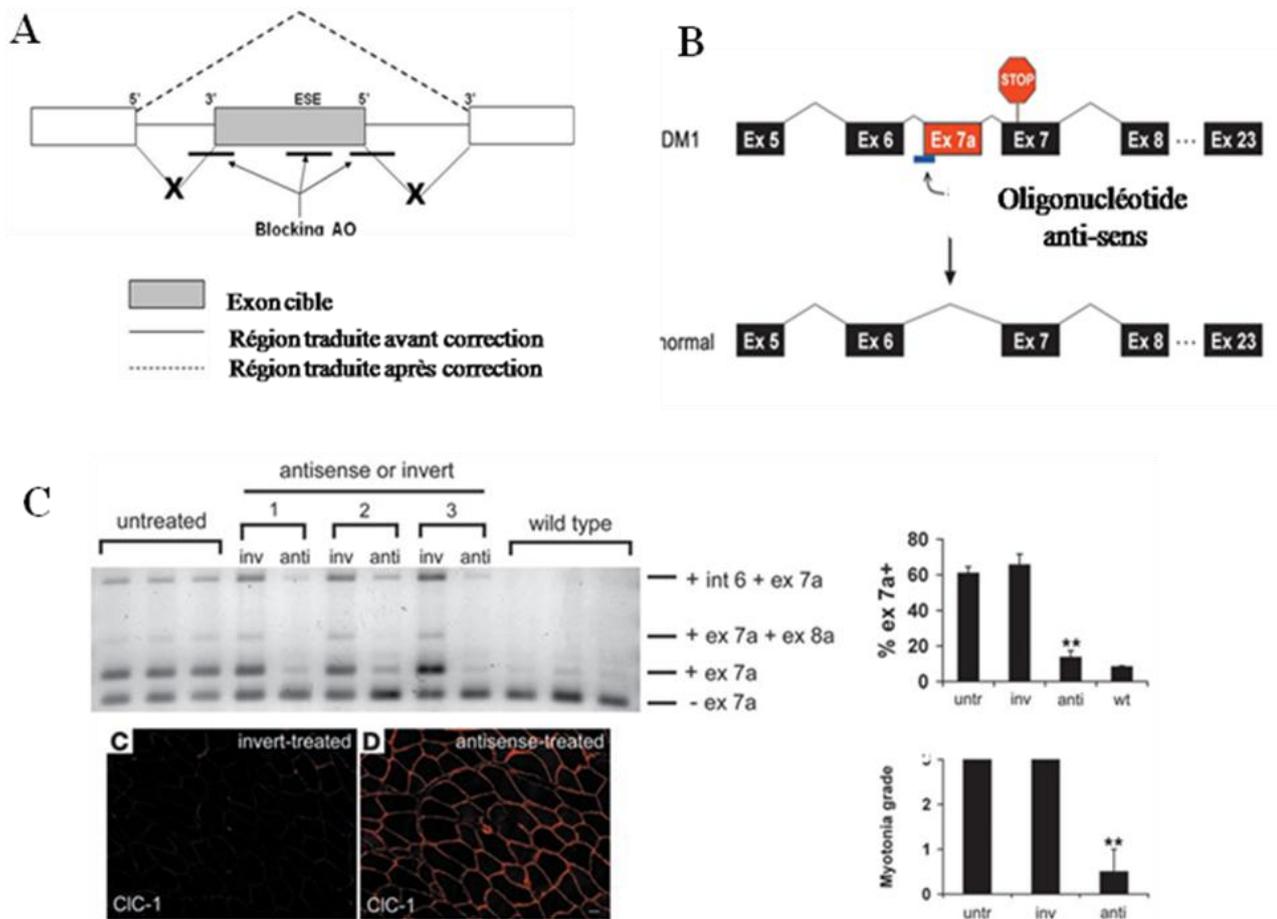
#### ***7.2.4 Corriger les anomalies d'épissage***

Les oligonucléotides antisens (OANs) qui ciblent les jonctions exon-intron ou des éléments régulateurs d'épissage à l'intérieur d'un exon peuvent également permettre de supprimer une région du pré-ARNm comme la présence d'un exon indésirable ou la présence d'une mutation (Du and Gatti, 2009).

Dans le cas de l'anomalie d'épissage du gène CLCN1, l'équipe de Charles Thornton a montré, dans les deux modèles de souris DM1 qui présentent une myotonie (HSA<sup>LR</sup> et MBNL1<sup>Δ3Δ3</sup>), que l'utilisation des OANs dirigés contre la jonction 3' de l'exon 7a pouvait restaurer un profil d'épissage normal avec à nouveau l'expression de la forme complète de la protéine correctement localisée dans la membrane plasmique (**Figure 58**). Cette approche permet de restaurer un phénotype normal avec une normalisation de la conductance électrique du muscle et une diminution de la myotonie (Wheeler et al., 2007b). Cette étude est la première à démontrer la correction spécifique d'un défaut d'épissage par des OANs dans un modèle animal de la DM1. De plus, contrairement aux agents pharmacologiques utilisés pour traiter la myotonie -comme la mexilitine qui agit indirectement en ciblant les canaux sodiques- les OAN sont au contraire hautement spécifiques et semblent très efficaces.

Les limitations pour un passage chez l'Homme sont les mêmes que celles de la thérapie génique en général avec notamment le problème de la voie d'administration. Toutefois, cette stratégie est plus avancée dans le traitement d'autres pathologies musculaires comme la myopathie de Duchenne. Les résultats de tolérance et d'efficacité de la voie d'administration par injection intramusculaire dans les modèles animaux de cette pathologie sont encourageants et les essais cliniques de sécurité et d'efficacité laissent entrevoir les possibilités thérapeutiques. Cependant, dans la DM1, les symptômes sont multiples touchant des systèmes différents et la myotonie ne représente que l'un d'entre eux. Il faudrait alors envisager de corriger différents défauts d'épissage, en formulant des mélanges d'OANs, pour traiter les différents symptômes de la maladie.

En conclusion, les nouvelles stratégies thérapeutiques développées dans la DM1 sont actuellement en plein essor. Les pistes thérapeutiques privilégient des approches très ciblées



**Figure 58 : Correction de l'épissage alternatif anormal du gène CLCN1 par une approche par oligonucléotide antisens.**

(A) Principe de la correction d'un profil d'épissage par des oligonucléotides antisens (OAN). Ces AONs peuvent être désignés pour cibler une région des pré-ARNm à la jonction exon-intron ou des sites enhancer de régulation d'épissage à l'intérieur de l'exon (ESE). (B) Dans DM1, des OAN dirigés contre la jonction exon/intron en 3' de l'exon 7a permettent d'éliminer cet exon qui génère lorsqu'il est inclus un codon stop dans le cadre de lecture de l'exon suivant. (C) Démonstration de l'efficacité des OAN pour la réversion du phénotype des souris MBNL1 avec restauration de l'épissage normal, relocalisation de la forme complète fonctionnelle de la protéine au niveau de la membrane plasmique ce qui finalement entraîne la diminution du grade de la myotonie.

sur les déterminants majeurs de la maladie. Notamment, les méthodes basées sur les OANs semblent très prometteuses car elles sont à la fois très spécifiques et très efficaces. Ces différentes stratégies pourront peut-être apporter aux patients DM1 les premiers médicaments à visée curative.

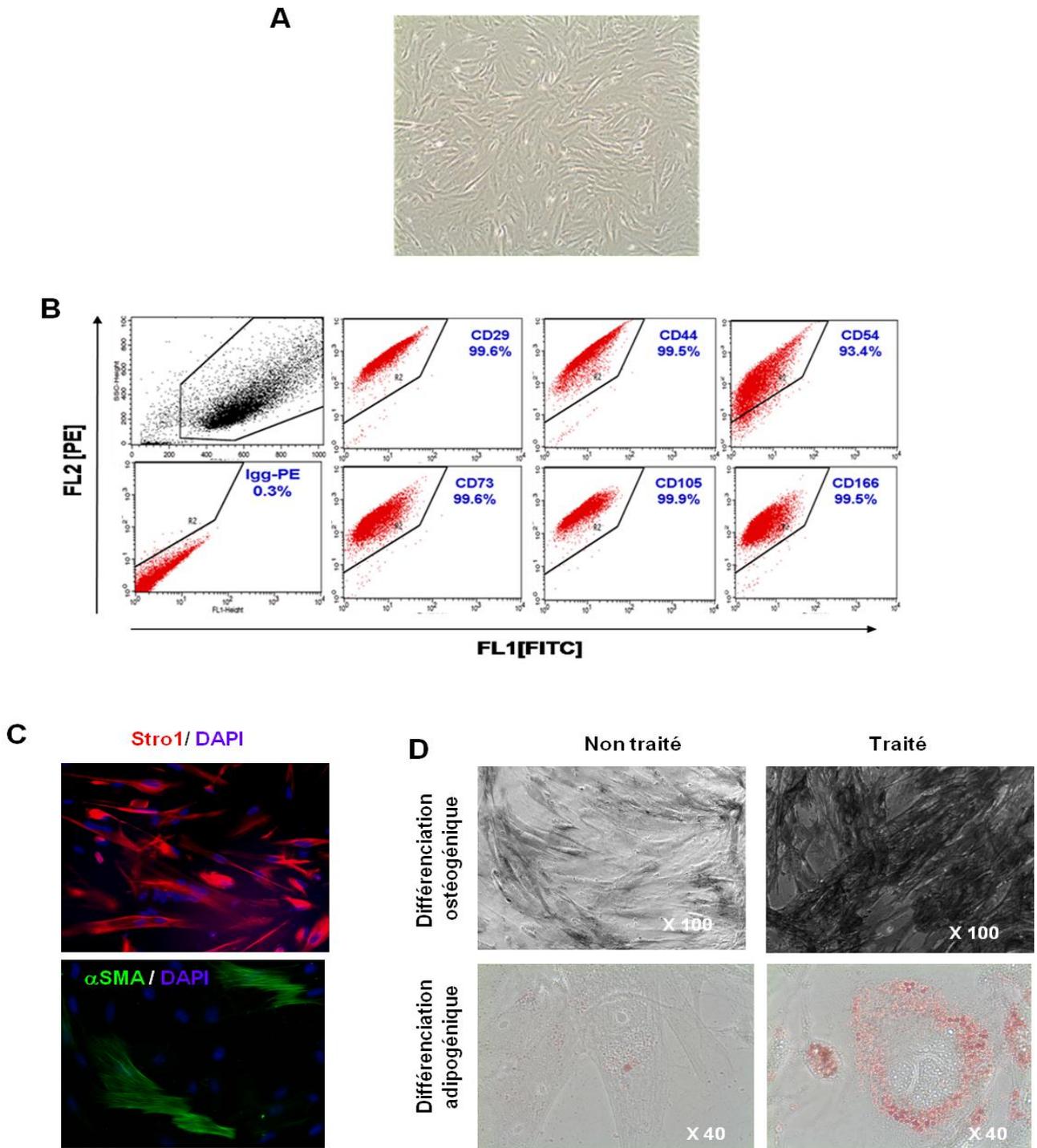


## **Résultats**



## **Première partie**

### **Obtention et caractérisation de populations homogènes de progéniteurs neuraux et mésenchymateux dérivés à partir de cellules hES**



**Figure 59 : Obtention d'une population homogène de progéniteurs mésenchymateux MPC à partir des cellules hES.**

(A) Morphologie des cellules MPC. (B) Caractérisation phénotypique par l'expression de marqueurs membranaires analysés par FACS. (C) Analyse de l'expression du marqueur mésenchymateux Stro-1 (marqueur mésoderme) et  $\alpha$ -SMA (marqueur du muscle lisse) par immunocytochimie. (D) Analyse des capacités de différenciation des cellules MPC vers les ostéoblastes et vers les adipocytes par coloration à la phosphatase alcaline et au « Red Oil » respectivement avant (non traité) et après (traité) traitement par le milieu inducteur. (Voir Article I).

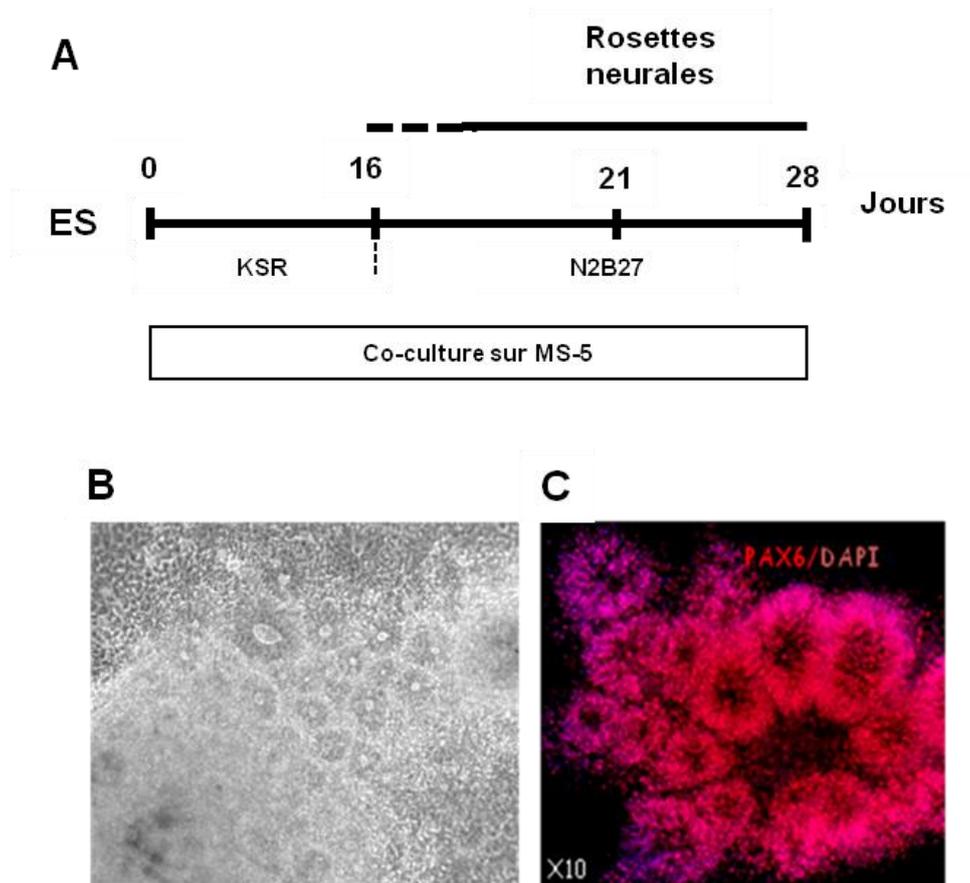
Comme nous l'avons décrit dans la revue bibliographique, les cellules hES sont caractérisées par leur propriété de pluripotence. Cette propriété « théorique » ne signifie cependant pas que sur le plan expérimental, il soit toujours possible de les obtenir à l'état pur ou sous forme de populations cellulaires homogènes. Cette condition est pourtant souvent le pré-requis pour la mise en place d'un certain nombre d'études dont la modélisation pathologique de la DM1 que nous souhaitons entreprendre (voir la 2<sup>ème</sup> partie des résultats). Au laboratoire I-STEM, notre effort a donc porté sur la mise en place de protocoles permettant l'obtention de populations homogènes soit de progéniteurs soit de cellules différenciées. Dans l'équipe, nous avons obtenu à partir des cellules hES des progéniteurs dans deux types de lignages, mésenchymateux et neuraux.

### **I. Obtention et caractérisation d'une population homogène de progéniteurs mésenchymateux**

Un travail initié par le Dr. Christelle Rochon-Beaucourt à I-STEM avait permis de mettre au point les conditions d'obtention, à partir des cellules hES, d'une population homogène de progéniteurs mésenchymateux (MPC pour « *Mesenchymal Precursor Cells* ») possédant des caractéristiques des cellules souches mésenchymateuses (MSC) issues de la moelle osseuse. Le protocole spécifique de différenciation de ces progéniteurs à partir des cellules hES est décrit dans l'**article I**.

Cette population se présente sous la forme de cellules à la morphologie ressemblant à des fibroblastes (**Figure 59A**). Elle partage, avec les cellules MSC de la moelle osseuse, l'expression d'un certain nombre de marqueurs de surface incluant CD29, CD44, CD54, CD73, CD105 et CD166 (**Figure 59B**) ainsi que des protéines STRO-1 et SMA (*Smooth Muscle Actin*) (**Figure 59C**). Sur le plan fonctionnel, ces cellules ont un potentiel de différenciation vers les lignages ostéocytaires et adipocytaires (**Figure 59D**). Enfin, ces progéniteurs sont capables de proliférer pendant 15-20 passages et peuvent être congelés/décongelés sans perte de leur phénotype.

Nous disposons ainsi d'une population homogène de précurseurs mésenchymateux, auto-amplifiables, aux caractéristiques phénotypiques similaires aux cellules MSC de la moelle osseuse.



**Figure 60 : Obtention des rosettes neurales.**

(A) Protocole d'obtention des rosettes neurales à partir des cellules hES à l'état indifférencié. (B) Morphologie des cellules observées après 21 jours de culture. Les rosettes neurales apparaissent à l'intérieur des colonies neuroectodermiques. (C) Caractérisation des rosettes neurales par l'expression du marqueur PAX6.

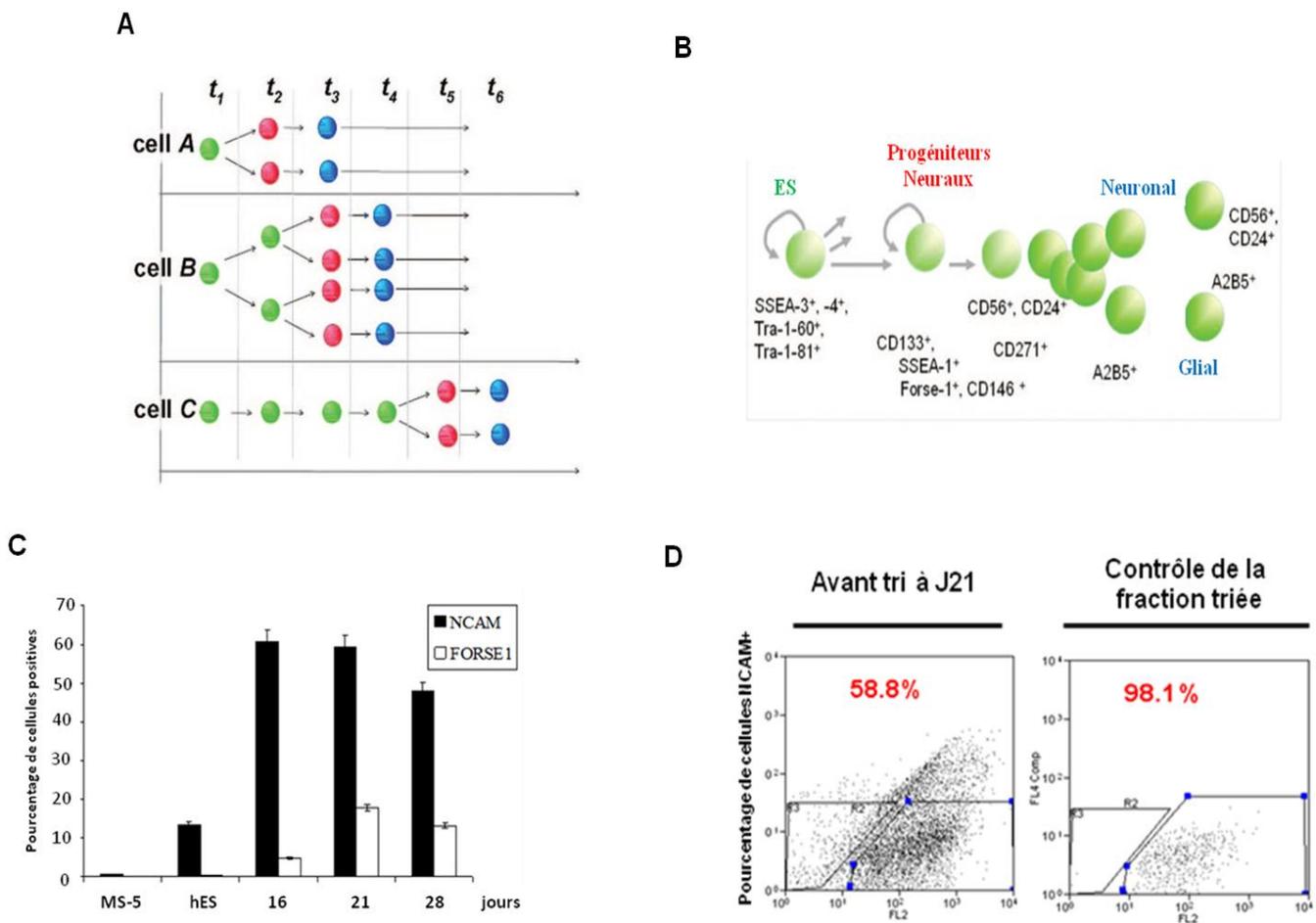
## **II. Obtention et caractérisation d'une population homogène de progéniteurs neuraux**

### **2.1 Obtention de progéniteurs neuraux**

Durant mon stage de master, mon objectif avait été de développer les conditions de différenciation des cellules hES vers la voie neurale dans le but d'obtenir une population homogène de progéniteurs neuraux (NPC pour « *Neural Precursor Cells* »), nécessaire pour explorer les mécanismes physiopathologiques touchant le système nerveux impliqués dans la DM1 dans le cadre de la modélisation pathologique. La différenciation neurale des cellules hES représente un des types de différenciation qui a été le plus étudié dans la littérature. Lorsque j'ai initié ce travail, il existait trois méthodes principales d'induction des cellules hES vers le lignage neural : l'induction par défaut, la formation de corps embryoides et la co-culture sur cellules stromales, comme cela est décrit dans la revue bibliographique.

Nous avons choisi la méthode développée par le Dr. Anselme Perrier, l'un des membres d'I-STEM, lors de son stage post-doctoral réalisé dans le laboratoire du Dr. Lorentz Studer à New-York, qui utilisait les co-cultures de lignées stromales de souris MS-5 (Perrier et al., 2004). Ce protocole semblait au regard de la bibliographie donner les meilleurs rendements. En pratique, les cellules hES sont prélevées mécaniquement sous le contrôle d'une loupe et déposées, à faible densité, sur les cellules MS-5 préalablement inactivées par de la mytomycine. Les cellules sont ainsi cultivées en milieu KSR (*Knock-out SeRum*) pendant 15 jours. Sur le plan morphologique, on observe progressivement l'apparition de clusters cellulaires de nature neuroectodermique. Au 16<sup>ème</sup> jour, le milieu KSR est remplacé par un milieu plus spécifique des cellules neurales, le milieu N2B27 (**Figure 60A**). On observe vers les 18-20<sup>ème</sup> jours, l'apparition de rosettes neurales qui contiennent des progéniteurs neuraux ressemblant aux progéniteurs multipotents présents dans le neuroépithélium formant la plaque neurale et le tube neural (**Figure 60B**). Ces progéniteurs expriment le facteur de transcription *PAX6*. (**Figure 60C**).

Ce protocole permet d'enrichir des populations cellulaires en progéniteurs neuraux, mais il ne permet pas de synchroniser le développement des cellules comme cela est le cas *in vivo* pendant le développement normal.



**Figure 61 : Choix d'un marqueur d'homogénéisation des cultures et tri cellulaire.**

(A) Schéma représentant l'hétérogénéité des cultures cellulaires au cours de protocoles de différenciation guidée à un temps  $t$ . Les ronds verts représentent les cellules à l'état indifférencié, les ronds rouges représentent des progéniteurs et les ronds bleus correspondent à des cellules plus différenciées (Adapté de pruzak, 2007).

(B) Revue bibliographique des marqueurs de surface exprimés au cours de la différenciation neurale à partir des cellules hES. (Adapté de Pruzak, Sonntag et al. 2007). (C) Etude phénotypique de l'expression des marqueurs NCAM et FORSE-1 au cours de l'induction neurale. Pourcentage de cellules positives pour l'un des marqueurs calculé dans les cellules hES indifférenciées et au 16<sup>ème</sup>, 21<sup>ème</sup> et 28<sup>ème</sup> jours du protocole d'induction neurale pour 3 à 5 différentiations indépendantes. MS-5 correspond à l'expression de ces marqueurs dans la lignée stromale seule. (D) Exemple d'analyse de l'expression du marqueur NCAM réalisée avant ou après tri par FACS au 21<sup>ème</sup> jour de culture au stade de rosettes neurales.

Ce concept d'asynchronisme des cultures est schématisé dans la **Figure 61A**. Ainsi, la coexistence de cellules dans des états de maturation différents entraîne une hétérogénéité des cultures.

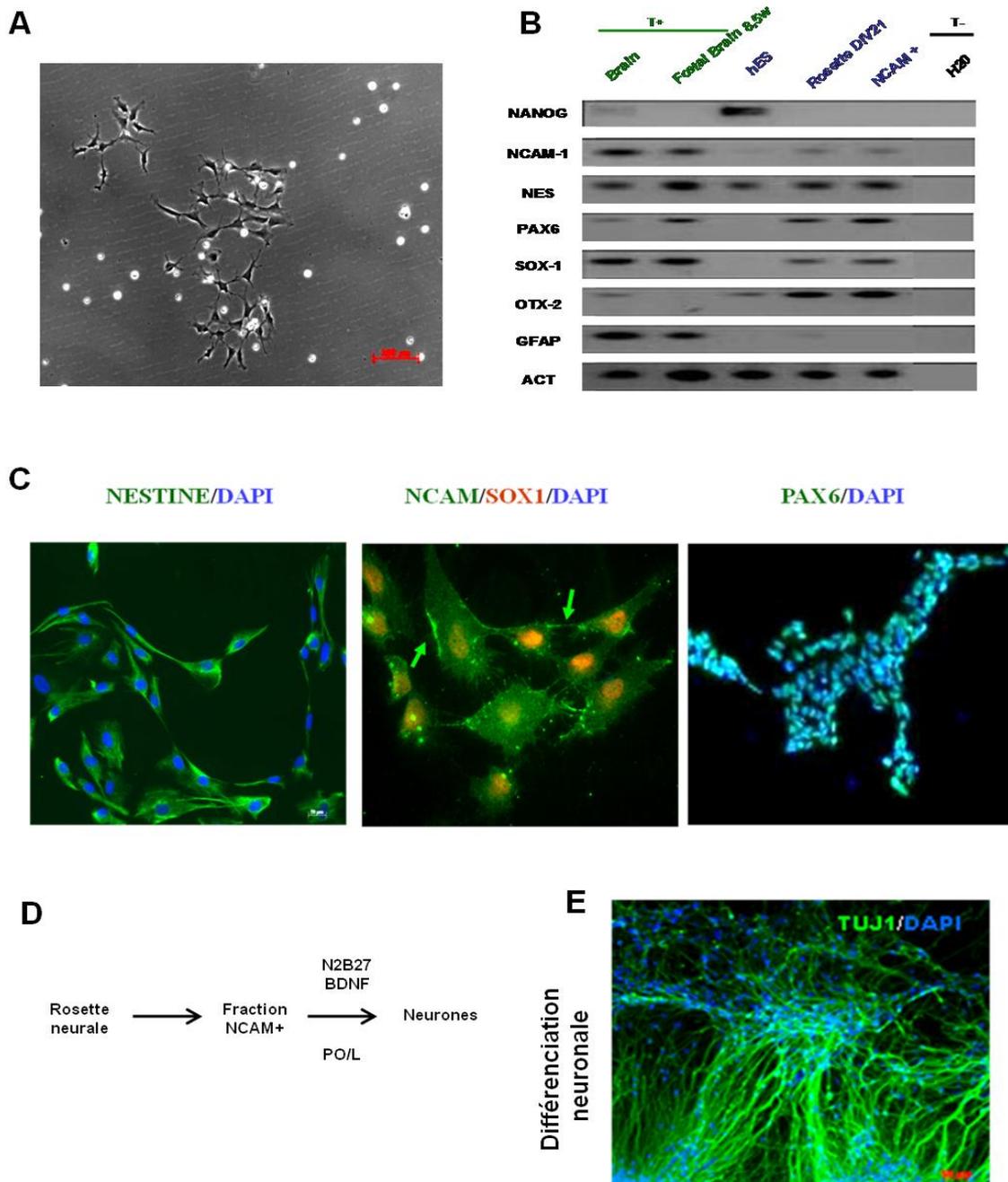
Il nous a donc paru indispensable d'ajouter une étape de sélection des cellules d'intérêt au cours de ce protocole de différenciation.

Une des méthodes pour effectuer cette sélection est la technique du FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*). Elle permet d'améliorer de manière notable la pureté d'une population cellulaire en sélectionnant ou en contre-sélectionnant les cellules sur la base de l'expression de marqueurs membranaires. Néanmoins, cette technique nécessite la présence d'épitopes de surface spécifiques d'un type cellulaire donné. Dans le cas de la différenciation neurale, un certain nombre d'entre eux ont déjà été rapportés dans différentes populations et sont potentiellement utilisables pour le tri cellulaire (**Figure 61B**).

Nous avons testé l'expression de deux d'entre eux à plusieurs temps durant le protocole d'induction : le marqueur CD56/NCAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*) et la protéine FORSE-1 (FORebrain Surface Embryonic) (**Figure 61C**). Les protéines FORSE-1 et NCAM ne sont pas exprimées dans les cellules nourricières MS5 utilisées pour la co-culture. Le marqueur NCAM présente une faible expression dans les cellules hES indifférenciées. Par contre, au 16<sup>ème</sup> jour de différenciation, on constate qu'environ 60% des cellules expriment ce marqueur, ce pourcentage est maintenu au 21<sup>ème</sup> jour puis baisse légèrement au 28<sup>ème</sup> jour. En revanche, le pourcentage de cellules exprimant le marqueur FORSE-1 n'est que de 20% et reste faible lorsque son expression est maximale au 21<sup>ème</sup> jour de culture. Ces résultats nous ont conduits à choisir d'effectuer le tri cellulaire sur le marqueur NCAM à partir des rosettes neurales prélevées au 21<sup>ème</sup> jour du protocole de différenciation.

La proportion de cellules positives pour ce marqueur correspond à environ la moitié de la population triée. Pour chaque expérience, une population de cellules positives pour ce marqueur (NCAM+) a été isolée par FACS. Afin de confirmer l'homogénéité de cette population, l'expression du marqueur NCAM a été ré-analysée par cytométrie de flux. Les cellules ainsi purifiées expriment cette protéine à plus de 98% (**Figure 61D**). Ce résultat, obtenu dans un grand nombre d'expériences sur des cellules provenant de plusieurs lignées hES illustre le caractère homogène de ces populations pour l'expression de ce marqueur.

Cette population NCAM+ a ensuite été caractérisée sur le plan phénotypique par l'analyse de son profil d'expression, génique et protéique, et sur le plan fonctionnel par sa capacité de



**Figure 62 : Obtention et caractérisation de la population NCAM+ après tri cellulaire.** (A) Morphologie des cellules remises en culture après le tri sur le marqueur NCAM. Elles sont cultivées dans des boîtes recouvertes de poly-ornithine/laminine (P0/L) dans le milieu N2B27 en présence de facteurs mitogènes (EGF+FGF2) permettant leur prolifération. (B) Caractérisation de l'expression des gènes d'intérêt par RT-PCR. (C) Caractérisation par immunomarquage de l'expression de protéines spécifiques de progéniteurs neuraux dans la population NCAM+. (D) Protocole de différenciation des progéniteurs neuraux en neurones. (E) Caractérisation par immunomarquage des neurones positifs pour le marqueur TUJ1 ( $\beta$ -III tubuline), en vert, après différenciation guidée des cellules de la fraction NCAM+. Les noyaux sont marqués au DAPI (en bleu).

différenciation afin de déterminer si elle présentait toutes les propriétés représentatives de précurseurs neuraux.

## **2.2 Caractérisation de la population NCAM+**

Après remise en culture, la population cellulaire triée présente une morphologie homogène. Les cellules sont de petites tailles et interagissent les unes avec les autres par l'intermédiaire de courtes extensions neuritiques (**Figure 62A**).

### ***2.2.1 Caractérisation phénotypique***

Le profil d'expression génique de la population de cellules NCAM+ a été caractérisé par RT-PCR et comparé à celui d'autres populations cellulaires telles que les cellules hES et les rosettes neurales découpées mécaniquement après 21 jours de différenciation ainsi qu'à différents contrôles positifs correspondant à des ARNs d'origine humaine isolés de la moelle épinière fœtale à 8,5 semaines et de cerveau adulte (**Figure 62B**).

Les cellules de la fraction NCAM+ présentent une perte d'expression du gène *NANOG* exprimé dans les cellules hES, concomitante avec la transcription induite de gènes spécifiques de précurseurs neuraux comme *NCAM*, *NESTINE*, *PAX6* (Paired box gene 6) et *SOX1* (Sry-box1) établissant un profil d'expression représentatif d'un phénotype de progéniteurs neuroectodermiques. Comme attendu, l'expression de ces gènes n'est pas détectée dans les cellules hES mais devient forte dans les rosettes et les témoins positifs provenant de tissu nerveux adulte ou fœtal. Le gène *OTX2* (Orthodenticle homolog 2) est utilisé comme un marqueur de régionalisation antérieure, ce qui est cohérent avec le profil d'expression dans les échantillons contrôles : il est présent dans le cerveau adulte et absent dans l'échantillon de moelle épinière fœtale présentant un profil de régionalisation postérieure. Ce gène est exprimé dans les rosettes et la fraction NCAM+ mais son expression est également détectée (faiblement) dans les cellules hES indifférenciées. Le gène GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), spécifique de cellules différenciées astrocytaires, n'est pas exprimé dans la fraction NCAM+ alors qu'une faible bande est observée au niveau des rosettes neurales. Par contre, ce gène est fortement exprimé dans les échantillons contrôles de tissus nerveux, fœtale et adulte.

L'analyse du profil d'expression protéique a été réalisée par immunomarquage avec des anticorps reconnaissant des protéines spécifiques du phénotype neural comme la Nestine,



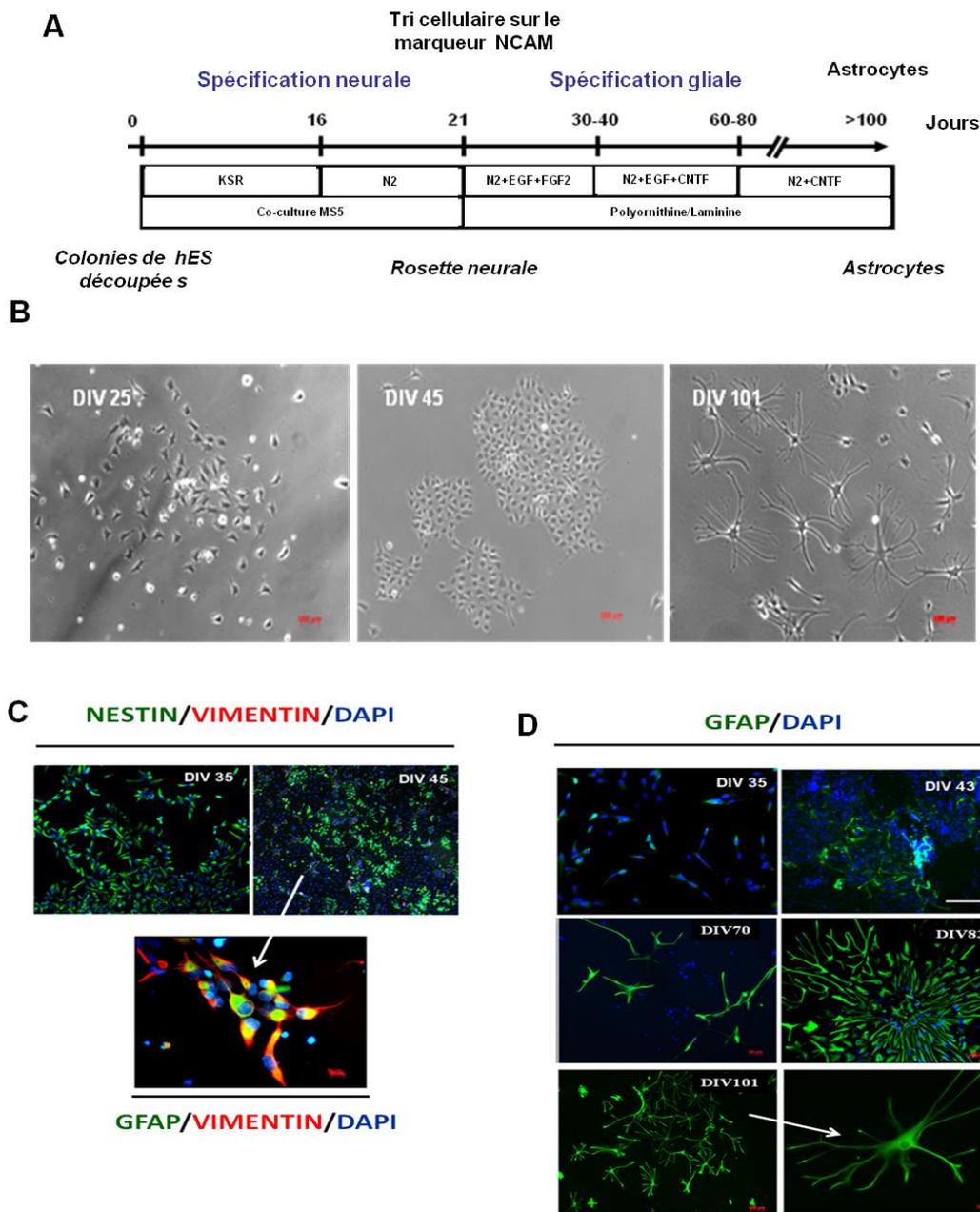
NCAM et les facteurs de transcription PAX6 et SOX1 (**Figure 62C**). Dans cette population NCAM+, la Nestine et la protéine SOX1 exprimés respectivement dans le cytoplasme et le noyau sont présents dans la totalité des cellules. Le marqueur PAX6 est exprimé dans un grand nombre de cellules directement après le tri mais nous avons observé que celui-ci avait tendance à disparaître progressivement après un ou deux passages.

### 2.2.2 Capacité de différenciation

La caractérisation de la population de cellules NCAM+ a été poursuivie en étudiant ses capacités à se différencier en neurones et en astrocytes. Le protocole de différenciation en neurones consiste à enlever les facteurs mitogènes du milieu pendant environ deux semaines (**Figure 62D**). Dans ces conditions, les cellules acquièrent progressivement un phénotype neuronal et le réseau neuritique se densifie et se complexifie après un mois de culture. Nous avons ainsi pu observer que ces cellules possédaient des propriétés neurogéniques importantes comme le montre la présence d'un grand nombre de neurones post-mitotiques positifs pour le marqueur TUJ1 (**Figure 62E**). Toutefois, même s'il est possible d'obtenir une population très enrichie, celle-ci correspond à un mélange variable de différents types de neurones qui n'étaient pas utilisables pour des études transcriptomiques ultérieures. En revanche, les astrocytes sont des populations neurales moins hétérogènes que les neurones et pouvaient constituer une population cellulaire d'intérêt dans le cadre de notre modélisation pathologique.

Les résultats de ce travail de mise au point d'un protocole de différenciation guidée vers le lignage astrocytaire a été effectué avec le Dr. Lina Kassar-Duchossoy dans notre équipe. Au moment où nous avons initié ce travail peu de protocoles de différenciation guidée spécifique du phénotype astrocytaire avaient été rapportés. Toutefois deux facteurs, l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) et le CNTF (*Ciliary NeuroTrophic Factor*) avaient été décrits pour permettre l'engagement des progéniteurs neuraux de souris isolés *in vivo* vers le lignage glial au dépend du lignage neuronal.

Le protocole qui nous a permis d'obtenir une population homogène d'astrocytes à partir des progéniteurs neuraux triés est présentée dans la **Figure 63A**. Il est basé sur trois étapes permettant la spécification gliale : la première permet d'amplifier les progéniteurs triés par une combinaison de facteurs mitogènes comme l'EGF et le FGF2, puis l'EGF est remplacé par le



**Figure 63 : Différenciation guidée des cellules hES et des rosettes triées vers les astrocytes matures.** (A) Protocole de différenciation des cellules hES vers les astrocytes matures. (B) Changement morphologique des cellules au cours de la différenciation guidée des progéniteurs neuraux vers les astrocytes matures (C-D) Immunomarquage des cellules au cours de la différenciation guidée de la population de cellules NCAM+ vers les astrocytes matures. ; la nestine permet d'identifier les progéniteurs neuraux (en vert), la vimentine les progéniteurs gliaux (en rouge) et la GFAP les astrocytes matures (en vert). Les noyaux sont repérés en bleu par le DAPI. DIV : Days *in vitro*, jours de culture par rapport au 1<sup>er</sup> jour de différenciation des ES à l'état indifférencié.guidée des ES en astrocytes.

CNTF et enfin les cellules sont cultivées uniquement en présence de CNTF jusqu'à la différenciation finale.

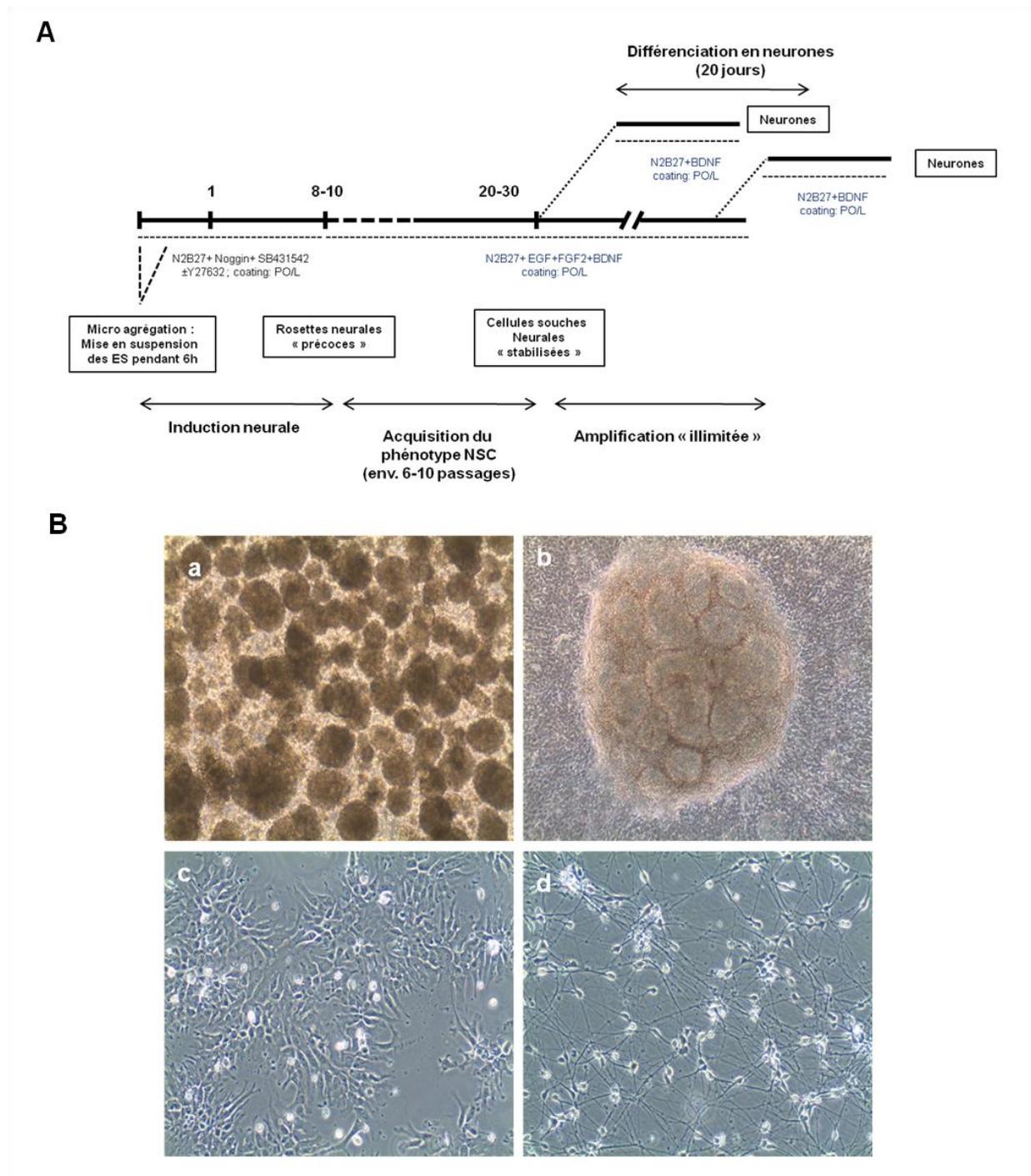
Dans ces conditions de culture, la morphologie des cellules change pour présenter, plus de 80 jours de cultures après le tri (soit près de 100 jours au total) un aspect caractéristique d'astrocytes activés (**Figure 63B**). L'analyse immunocytochimique montre que durant les premiers jours du protocole une large majorité des cellules expriment toujours le marqueur Nestine. Quelques cellules commencent à exprimer une autre protéine du cytosquelette, la vimentine, alors que le marqueur Nestine disparaît. En parallèle, quelques cellules positives pour le marqueur astrocytaire GFAP commencent à apparaître (**Figure 63C**). Au cours de la phase de différenciation terminale en présence de CNTF seul, le nombre de cellules exprimant la GFAP augmente et l'on obtient progressivement une population homogène de cellules étoilées semblables sur le plan morphologique à des astrocytes (**Figure 63D**). Les populations d'astrocytes obtenues grâce à ce protocole sont quasiment pures. Cependant le temps nécessaire pour arriver à la différenciation terminale est très long (>100 jours) et les quantités de cellules obtenues sont très faibles. Aussi, ces deux facteurs ont été un obstacle à leur utilisation en modélisation pathologique.

En conclusion, la population cellulaire que nous avons isolée, homogène pour l'expression du marqueur NCAM+, présente sur le plan phénotypique et par sa capacité de différenciation toutes les propriétés de progéniteurs neuraux NPC.

### **III. Comparaison par transcriptome du profil d'expression des populations de progéniteurs neuraux et mésenchymateux**

Nous disposions donc de 2 populations de progéniteurs engagés vers 2 lignages différents, le mésoderme, les cellules MPC, et le neurectoderme, les cellules NPC. Leur homogénéité nous a permis d'entreprendre une approche par transcriptome différentiel ayant pour but de rechercher les profils d'expression spécifiques de ces deux populations en les comparant à la même référence, la population de cellules hES au stade indifférencié. Cette double sélection nous a permis d'identifier des gènes spécifiquement modulés dans chacun des lignages puis d'identifier des voies de signalisation et des réseaux de gènes différentiellement activés en utilisant une approche *in silico* basée sur des outils de bio-informatiques.

Cette étude est présentée dans **l'article I**.



**Figure 64 : Obtention des cellules souches neurales (NSC) et des neurones à partir des cellules hES en utilisant le protocole d'induction neurale en présence des inhibiteurs noggin et SB431542.**

(A) Protocole de différenciation des cellules hES en cellules souches neurales et en neurones. (Voir le matériel et méthodes de l'article II). (B) Aspect morphologique des cellules au cours de la différenciation (a) microagrégation à 6h (b) rosette neurale à J10 (grossissement 10X) (c) aspect caractéristique des NSC à passage 5 après le stade rosette (d) différenciation terminale en neurone après 20 jours de différenciation (grossissement 10X).

#### **IV. Obtention et caractérisation d'une population homogène de cellules souches neurale à partir des cellules hES**

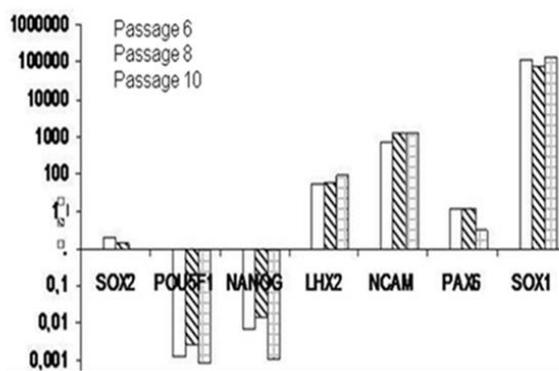
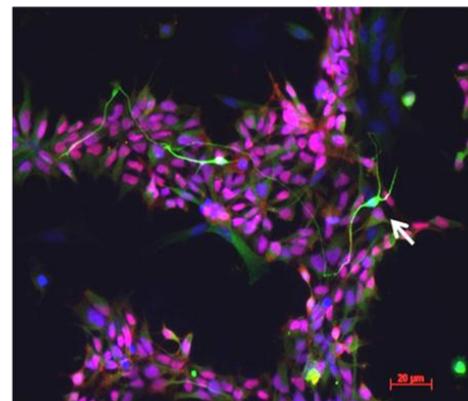
Les progéniteurs neuraux NPC que nous avons présentés au paragraphe II ont également été utilisés comme ressource biologique pour une étude de transcriptome dans le cadre de la modélisation de la DM1 pour rechercher des gènes différentiellement exprimés entre les cellules NPC mutantes et contrôles. Ces résultats seront présentés dans la 2<sup>ème</sup> partie des résultats. Comme nous l'avons vu, ces cellules NPC possèdent des propriétés leur conférant une potentialité de différenciation vers les neurones et les astrocytes, mais ce sont des progéniteurs transitoires dont la manipulation reste peu aisée et limitante pour notre objectif de modélisation pathologique.

Au cours de l'année 2008, un nouveau protocole de différenciation neural avait été développé à I-STEM par l'équipe « maladies neurodégénératives » permettant d'obtenir, en grande quantité, une population homogène d'un autre type de progéniteurs neuraux, les cellules souches neurales (NSC). En plus de leur capacité de différenciation vers le lignage neuronal, ces cellules NSC représentaient une population de progéniteurs neuraux avec une propriété d'auto-renouvellement qui leur conférait un avantage pour leur manipulation *in vitro*.

J'ai donc appliqué ce protocole à la différenciation des lignées hES normales et DM1 dans le cadre de mon travail de thèse pour l'approche de modélisation pathologique.

##### **4.1 Obtention des cellules NSC**

Ce protocole comprend deux étapes successives : l'induction des cellules hES en rosettes neurales et la différenciation de ces rosettes en cellules NSC (**Figure 64A**). Contrairement au protocole précédent, la différenciation neurale est induite en l'absence de cellules nourricières mais en exposant les cellules hES à des inhibiteurs des voies du BMP et du TGF $\beta$  favorisant le lignage neurectodermique (Chambers et al., 2009). En pratique, les cellules hES sont découpées en petits agrégats sous le contrôle d'une loupe binoculaire et placées en suspension pendant 6 heures dans un milieu d'induction contenant du N2B27 additionné de Noggin, un inhibiteur de la voie des BMP et de SB431542, un inhibiteur de la voie du TGF $\beta$  (**Figure 64B photo a**).

**A****B**

**Figure 65 : Caractérisation du profil d'expression des cellules NSC dérivées des hES.**

(A) Caractérisation par PCR quantitative du profil d'expression génique des gènes d'intérêt au cours de différents passages. (B) Caractérisation du profil d'expression protéique de marqueurs SOX2 (en rouge) et TUJ1 (en vert). Un neurone identifié par la flèche blanche est fortement positif pour TUJ1 illustrant la différence d'intensité du marquage entre les NSC et les neurones.

Les agrégats cellulaires sont ensuite transférés sur des boîtes recouvertes avec de la poly-ornithine/laminine permettant leur adhésion. Les cellules sont cultivées dans ce même milieu jusqu'à l'apparition de rosettes neurales semblables morphologiquement à celles obtenues avec le protocole précédent utilisant les co-cultures sur cellules MS-5, mais plus rapidement puisque ces structures apparaissent en moyenne après seulement 8-10 jours de culture (**Figure 64B photo b**)

A partir de ce stade de rosettes neurales, les cellules sont détachées par de la trypsine et placées dans une nouvelle boîte recouverte de la poly-ornithine/laminine en présence de milieu N2B27 contenant des facteurs mitogéniques comme l'EGF et le FGF2 ainsi qu'un facteur favorisant la survie des cellules neurales, le BDNF. L'utilisation de ces facteurs permet de faire proliférer ces cellules, qui perdent leur organisation épithéliale en rosettes, en induisant une transition vers un phénotype de cellules NSC (**Figure 64B photo c**). Ce protocole m'a permis d'obtenir des cellules souches neurales pour les 3 lignées de cellules hES mutantes utilisées dans la 2<sup>ème</sup> partie de ma thèse.

## 4.2 Caractérisation phénotypique des NSC

Ces cellules NSC ont été caractérisées sur le plan phénotypique, génique et protéique. L'analyse du profil d'expression génique, par PCR quantitative, montre la perte des marqueurs de pluripotence *POU5F1/OCT4* et *NANOG* ainsi que le maintien de l'expression du gène *SOX2* (**Figure 65A**). Les marqueurs pan-neural *NCAM*, neuroectodermique *SOX1* et de progéniteurs *LHX2* sont fortement exprimés dans ces cellules. L'expression de ces gènes se maintient au cours des passages. Enfin, l'expression du gène *PAX6*, caractéristique du stade NPC, a tendance à diminuer lors de la transition vers les cellules NSC. L'analyse de l'expression protéique réalisée par immunohistochimie a révélé que ces cellules présentaient un marquage nucléaire pour le marqueur d'auto-renouvellement *SOX2*. De plus, la faible expression du marqueur des neurones post-mitotiques *TUJ1*, dans moins de 10% des cellules, suggère qu'il est possible d'obtenir des populations quasiment homogènes de cellules NSC sans contamination neuronale (**Figure 65B**).

### 4.2.1. Capacité de différenciation

Comme les progéniteurs NPC, les NSC ont la capacité de se différencier en neurones par sélection passive en enlevant du milieu de culture les facteurs mitogènes, l'EGF et le FGF2, le

Type de progéniteurs	NPC triés sur NCAM/CD56	Cellules souches neurales
<b>Phénotype</b>	Nanog - ; Oct4 - ; Sox2+ ; NCAM+ ; NESTIN+; PAX6+ ; SOX1+	Nanog - ; Oct4 - ; Sox2+ ; NCAM+ ; NESTIN+; SOX1+
<b>Protocole</b>	Rosettes neurales obtenues par le protocole SDIA à J21 puis trié sur NCAM/CD56	Rosette obtenues à J8-10 par sélection médiée par des cytokines (Noggin+SB) puis sélection passive dans EGF+FGF2+BDNF
<b>Régionalisation</b>	Antérieur	NT
<b>Congélation/décongélation</b>	Non	Oui
<b>Prolifération*</b>	Oui mais limité	Oui (rapide/à long terme)
<b>Différenciation :</b>		
<b>Neurones</b>	Oui	Oui
<b>Astrocytes</b>	Oui	Oui
<b>Oligodendrocytes</b>	NT	NT
<b>Utilisation en modélisation pathologique</b>	Limité : transcriptome/protéome	Idéale : applications consommatrices en cellules notamment criblage

**Tableau 12 : Comparaison des caractéristiques des deux populations de progéniteurs neuraux obtenues par différenciation guidée à partir des cellules hES.**

NT : Non testé

facteur BDNF favorisant la survie étant maintenu. Une population quasiment homogène en neurones peut ainsi être obtenue même après de nombreux passages des NSC (**Figure 63B photo d**). La description des neurones mutants pour la DM1 obtenus par ce protocole seront également décrits dans la deuxième partie des résultats.

## V. Comparaison des propriétés des cellules NPC et NSC

En conclusion, nous avons donc à disposition deux méthodes permettant l'obtention de populations homogènes de progéniteurs neuraux à partir de différentes lignées de cellules hES.

Le **tableau 12** propose de comparer ces deux populations de progéniteurs neuraux sur la base des résultats obtenus dans cette première partie de ma thèse.

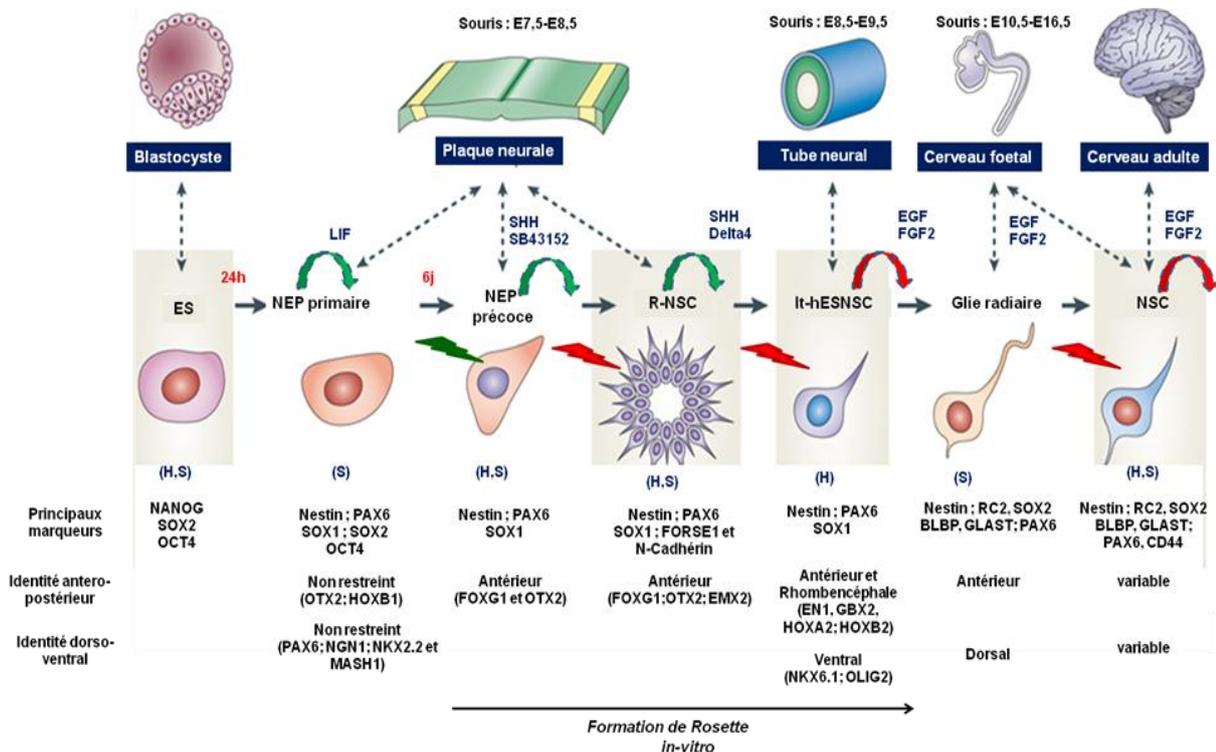
## VI. Discussion et perspectives

L'obtention d'une population homogène de précurseurs neuraux humains représente une ressource biologique majeure aussi bien dans le cadre de leurs utilisations futures appliquées à la thérapie cellulaire que comme outil de modélisation du développement neural en conditions normales ou pathologiques. Dans ce travail de thèse, nous avons décrit deux populations de progéniteurs neuraux obtenues à partir des cellules hES : les progéniteurs NPC et les cellules souches neurales NSC.

Il nous a paru important de discuter ici de l'identité de ces progéniteurs neuraux en s'interrogeant sur la pertinence de ces cellules générées *in vitro* en forçant expérimentalement leur différenciation et sur leur capacité à être représentatives du système existant *in vivo* au cours du développement du cerveau (Conti and Cattaneo 2010) (**Figure 66**), voir page suivante.

Plusieurs populations de progéniteurs neuraux et de cellules souches neurales ont été isolées *in vivo* au cours du développement du système nerveux central et dans des régions discrètes du cerveau adulte. Il est maintenant admis que les cellules ES sont capables de se différencier en progéniteurs neuraux selon une séquence qui mime les événements moléculaires qui se produisent au cours de l'embryogénèse, ce qui permet certainement d'identifier de nouvelles populations de progéniteurs neuraux qui représentent des états transitoires de leur spécification.

Les progéniteurs neuro-épithéliaux (NEPs) primitifs ont été définis par différenciation guidée de cellule ES de souris. Ce sont les premiers à apparaître *in vitro* 24 heures après leur mise en culture dans un milieu défini contenant du LIF (nécessaire à l'auto-renouvellement des



**Figure 66 : Liens développementaux supposés entre les différentes populations de progéniteurs/NSC isolés *in vivo* et générés *in vitro* à partir des cellules ES.**

Les flèches courbées vertes indiquent une capacité d'autorenouvellement limitée alors que les flèches rouges indiquent des capacités d'autorenouvellement à long terme. Les éclairs verts et rouges indiquent respectivement leurs capacités à répondre aux signaux de régionalisation pendant des périodes restreintes ou étendues ; (H,S) indique que les données sont disponibles chez l'Homme et/ou chez la souris

(Modifié à partir de Conti, 2010).

cellules ES de souris), sans sérum et sans cellules nourricières (Tropepe et al., 2001). Les NEPs primitifs sont caractérisés par l'expression de marqueurs neuraux précoces comme SOX1, qui est également l'un des premiers marqueurs neuraux à apparaître dans l'embryon (Pevny and Placzek, 2005; Pevny et al., 1998), ainsi que par la persistance de l'expression de OCT4 suggérant une différenciation partielle. Cette population a également été isolée à partir d'embryon de souris entre E5,5 et E7,5 indiquant qu'il ne s'agit pas d'une population générée *in vitro* de manière artificielle (Smukler et al., 2006).

Récemment, une population plus mature, les NEPs précoces, a été caractérisée. Elle est obtenue après 6 jours en inhibant ensemble la voie des BMPs et la voie Lefty–Activin– TGF $\beta$ , par un protocole appelé « double inhibition des SMADs ». Il utilise à la fois la protéine Noggin et une petite molécule synthétique le SB431542\* (Chambers et al., 2009). Ces NEPs expriment des marqueurs spécifiques du neurectoderme comme PAX6, OTX2 et FOXG1 et s'organisent en rosettes. Cette population est similaire à celle présentée lors de la première étape du protocole qui m'a permis d'obtenir les cellules NSC (Figure 63B). Ces cellules sont capables de répondre aux facteurs de régionalisation, ce qui signifie que cette population de progéniteurs peut être dirigée *in vitro* vers de nombreux types de neurones comprenant ceux du télencéphale (profil antérieur) mais aussi des neurones exprimant Islet1 ou HB9 correspondant aux motoneurones de la moelle épinière (profil postérieur).

Ces progéniteurs ne peuvent pas être maintenus *in vitro* car ils dérivent spontanément vers une population plus tardive que l'on appelle R-NSC (*Rosette-Neural stem cells*). Ces cellules forment des structures de type rosettes avec l'expression de marqueurs spécifiques comme la *zonula occludens* ZO1 et se comportent comme les progéniteurs neuraux *in vivo* avec une migration apico-basale de leur noyau (Elkabetz et al., 2008). Cette population semble très proche de celle que nous avons décrite dans le premier protocole qui correspond aux précurseurs neuraux NPC obtenus en utilisant les cellules nourricières MS5. Ces NPC ne semblent pas pouvoir proliférer dans les conditions de culture de type EGF+FGF2<sup>†</sup>. Les travaux du groupe d'Elkabetz suggèrent que cette population pourrait être maintenue pendant

---

\* Brevet déposé par le laboratoire I-STEM en décembre 2008.

<sup>†</sup> Les NPCs triés sur le marqueur NCAM que nous avons décrits dans cette thèse ont des capacités d'amplification restreintes en présence de EGF+FGF2 et cette population perd l'expression de marqueurs tels que NCAM et Nestine après moins de 8 passages pour la meilleure condition de concentration testée.



quelques passages avec du sonic hedgehog (SHH) et un agoniste de la voie des Notch, le Delta 4. Ces progéniteurs peuvent être également purifiés par tri cellulaire en combinant 2 marqueurs neuraux la Cadherine neurale (N-Cadherin) et Forse-1 (*forebrain-surface-embryonic*).

Cette population a été également isolée *in vivo* à partir de la plaque neurale de souris au stade E8.25. Notre population de NPCs triée sur le marqueur NCAM qui représente un marqueur dont le profil d'expression à ce stade du développement neural est similaire à celui de la N-Cadherin suggère que ces deux populations partagent certainement de nombreuses caractéristiques communes. Ces cellules sont capables de répondre aux signaux de régionalisation de manière similaire aux NEPs précoces décrits précédemment et sont capables d'être dirigées vers des phénotypes du système nerveux central mais aussi du système nerveux périphérique.

Lors de notre étude de transcriptome, nous avons également été surpris par la présence dans les cellules NPC de gènes fortement exprimés tels que PAX3 et SOX10<sup>‡</sup>. Ces marqueurs sont fréquemment associés aux cellules des crêtes neurales, dont la spécification intervient dès le stade plaque neurale, et qui seront entre autres responsables du lignage correspondant au système nerveux périphérique. Nos résultats suggèrent que malgré la présence de progéniteurs neuraux très enrichies dans la fraction NCAM+ comme en témoigne la signature génique obtenue par transcriptome, cette population pourrait être contaminée par des cellules des crêtes neurales expliquant en partie cette capacité de différenciation vers des cellules du système nerveux périphériques. L'étude du groupe de Lorentz Studer apporte des arguments dans ce sens puisque ces progéniteurs sont présents *in vitro* en bordure des rosettes, ce qui coïncide *in vivo* avec leur spécification précoce au stade plaque/gouttière neurale. Il serait ainsi probablement utile d'ajouter au moment du tri cellulaire, un marqueur de sélection négatif pour les cellules de crêtes neurales. La population NCAM+/p75- pourrait alors représenter une population de progéniteurs neuraux encore mieux purifiés.

En résumé, la population de NEPs précoces et la population de R-NSC sont probablement des populations très pertinentes pour mimer les événements précoces de l'embryogénèse neurale puisque ces populations ont des équivalents *in vivo* qui ont pu être isolés. Elles représentent certainement une population utile dans le cadre de la thérapie cellulaire des maladies neurodégénératives. Toutefois, il a été montré récemment que l'implantation de ces

---

<sup>‡</sup> Voir tableau 1 de l'article I



progéniteurs R-NSC dans des cerveaux de rat entraîne des surcroissances (Aubry, 2008). Il est donc nécessaire de prendre en compte ce problème avant d'entreprendre un transfert technologique vers des applications cliniques.

Une autre limitation de ces cellules, NEPs et R-NSCs, est leur faible capacité de prolifération, ce qui rend leur manipulation difficile. Dans le cerveau, ces cellules qui correspondent au tout premier stade du développement *in vivo* sont capables de se diviser symétriquement avant la première vague de neurogénèse mais cette amplification est transitoire. La possibilité de maintenir artificiellement ces cellules dans un état prolifératif nécessiterait d'une certaine façon de transgresser les barrières naturelles qui contrôlent leur auto-renouvellement. Ainsi, l'exposition des progéniteurs R-NSCs à des mitogènes classiquement utilisés comme l'EGF et le FGF entraîne une transition phénotypique vers une population négative pour SOX1 qui ressemble aux cellules de la glie radiaire (RG)<sup>§</sup> appelée NSC<sup>FGF/EGF</sup>. Ces dernières possèdent un potentiel de différenciation plus restreint, biaisé vers le lignage gliale et génèrent des neurones de type postérieurs (Glaser, 2005).

Toutefois, il a été récemment montré par l'équipe d'Oliver Brüstle, qu'il était possible de capturer entre le stade R-NSC et le stade NSC<sup>FGF/EGF</sup> une population SOX1 positive, appelée lthESNSCs (*long-term expanded ES-derived neural stem cells*). Elle possède la capacité de répondre à l'EGF et au FGF tout en maintenant certaines propriétés des rosettes incluant leur capacité de réponse aux facteurs de régionalisation. De plus, ces cellules possèdent des propriétés très particulières puisque qu'elles sont capables d'être maintenues en culture pendant au moins 100 passages (Koch et al., 2009b).

Il est probable que les cellules NSC décrites dans le cadre de cette thèse soient très proches de la population décrite par le Dr. O. Brüstle. Ces cellules constituent une population probablement intéressante pour le développement d'applications médicales ou biotechnologiques puisqu'elles représentent une source illimitée de cellules neurales (Koch et al., 2009a).

Il est important cependant de se poser la question de l'identité de ces cellules. La différence entre les protocoles de différenciation des cellules ES en cellules NSC<sup>FGF/EGF</sup> (équivalent de la glie radiaire) n'impliquent pas de phase d'amplification ce qui cause leur différenciation rapide

---

<sup>§</sup> Après la première phase de neurogénèse *in vivo*, les NEPs acquièrent un phénotype de glie radiaire, caractérisé par l'apparition de marqueurs gliaux tels que l'expression de GFAP par exemple. Pour revue (Gotz, 2005 #933).



en neurones glutamergiques alors que le protocole permettant de produire des cellules ItESNSC dépend de l'addition de mitogènes forçant artificiellement ces progéniteurs à rester dans le cycle cellulaire. On peut se demander alors si ces NSC capables de proliférer à long terme représentent une entité physiologique.

On sait depuis les travaux du groupe de Reynolds en 1992 qu'il est possible de cultiver des progéniteurs neuraux isolés du cerveau en développement de souris et de rat, ainsi que de la zone sous ventriculaire (SVZ) ou de la zone granulaire de l'hippocampe du cerveau adulte {Reynolds, 1992}. Ces cellules prolifèrent sous la forme d'agrégats en suspension appelés neurosphères. De nombreux auteurs considéraient ces structures sphériques comme une récapitulation *in vitro* de la niche des cellules souches neurales NSC, naturellement présentes *in vivo*. Plus récemment, d'autres stratégies ont été développées pour la propagation à long terme des cellules NSC de rongeurs ou des NSC humaines. Dans ces études, des cellules NSC exposées à l'EGF et au FGF2 peuvent proliférer de manière homogène, en maintenant des capacités de différenciation importante.

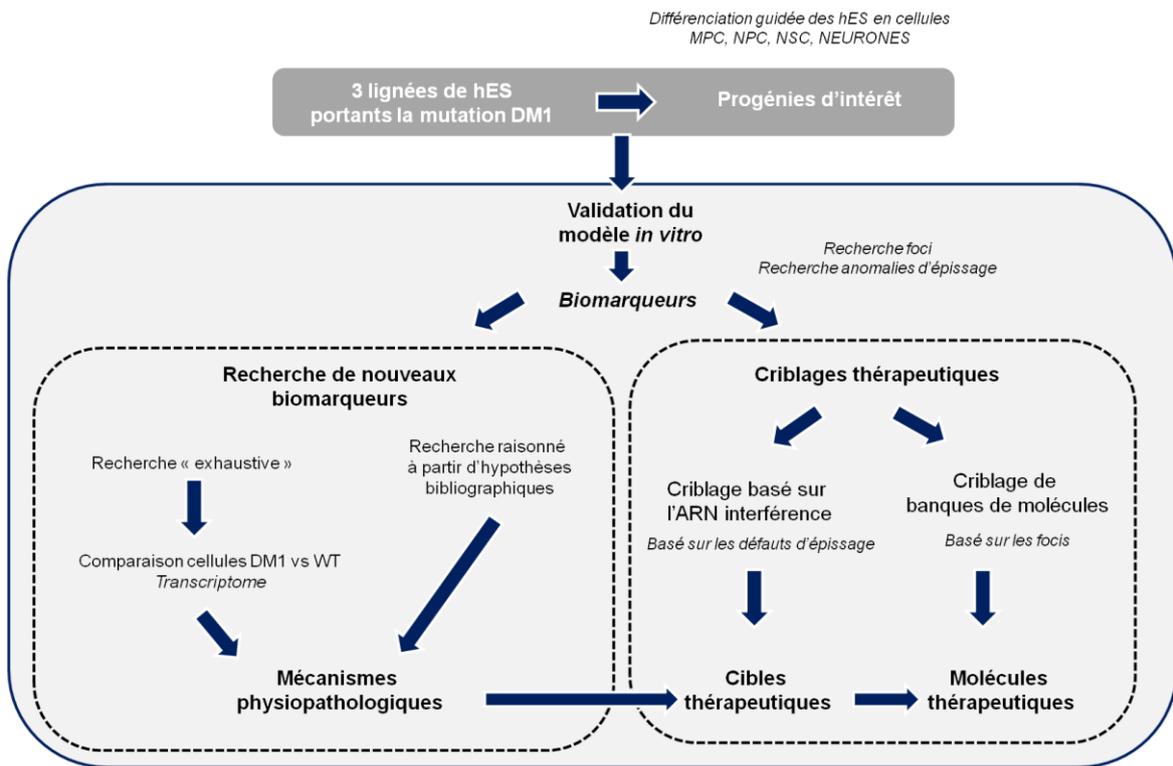
Les cellules NSC dérivées de cellules hES que nous avons décrites dans cette thèse présentent, dans nos conditions de culture, des propriétés similaires à celles des progéniteurs isolés *in vivo*. Néanmoins, l'identité réelle de ces cellules et les relations qu'elles peuvent avoir avec les cellules NSC présentes *in vivo* au sein de la niche de la SVZ reste une question ouverte.



**Deuxième partie**

**Modélisation pathologique de la**

**Dystrophie Myotonique de type 1**



**Figure 67 : Stratégie générale du projet de modélisation pathologique de la DM1.**

L'objectif général de l'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse est d'apporter la preuve du concept selon lequel il est possible de disposer d'un modèle cellulaire pertinent pour la modélisation pathologique d'une maladie génétique grâce à l'utilisation de lignées de cellules hES porteuses de la mutation.

## **I. Stratégie générale**

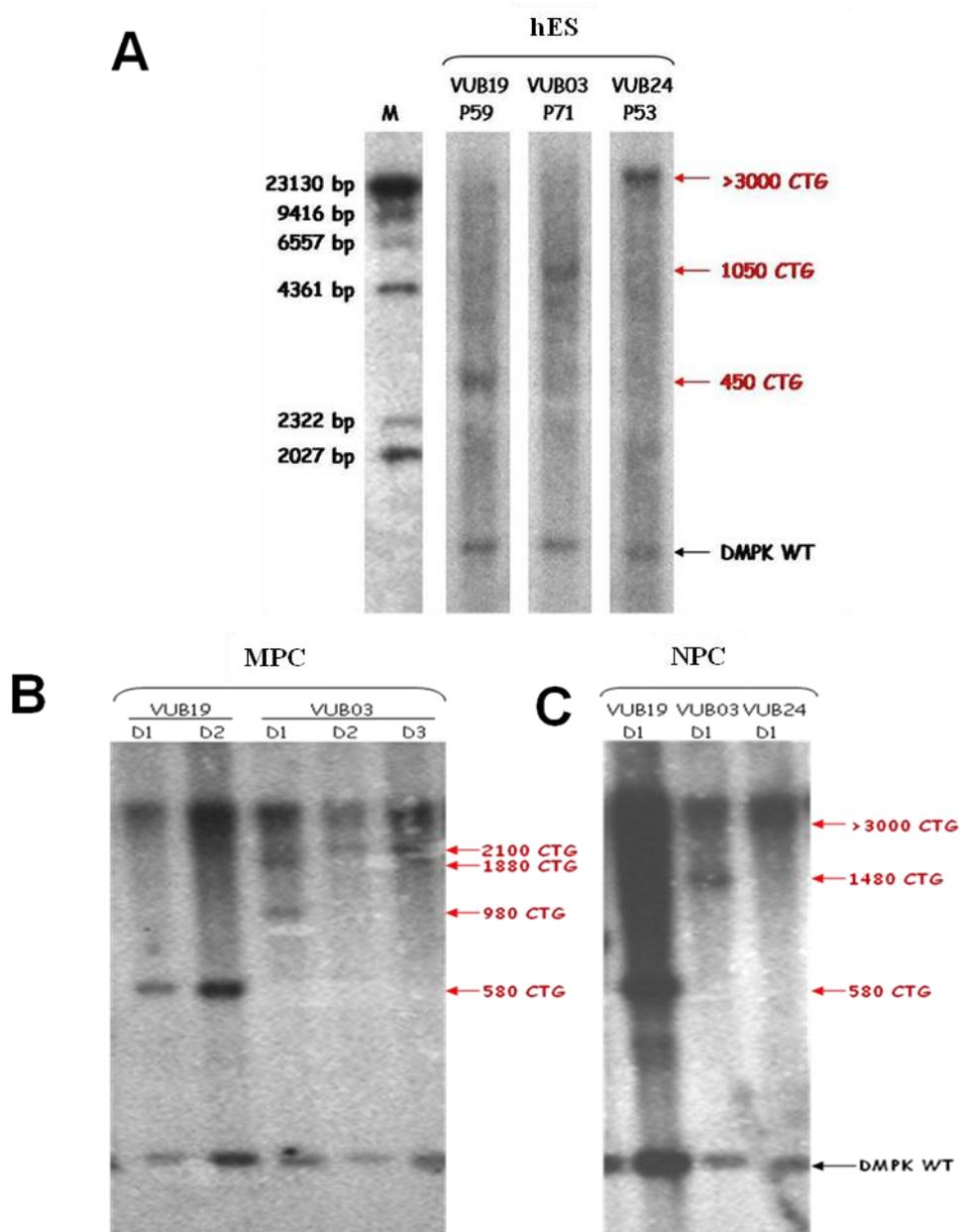
Un projet de modélisation pathologique de la DM1 basé sur l'utilisation d'une lignée de cellules hES porteuse de la mutation dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire AZVUB à Bruxelles a été initié dès 2005 à la création du laboratoire I-STEM. Ce projet comprenait trois volets principaux et une vue d'ensemble de la stratégie adoptée par notre équipe est présentée sur la **Figure 67**.

Le premier volet consistait en la validation du modèle. Il a nécessité d'obtenir les ressources biologiques en important les lignées de cellules hES normales et mutantes pour la DM1 puis d'entreprendre leur différenciation vers des phénotypes d'intérêts en relation avec la pathologie. Les cellules hES ont ainsi été différenciées vers les populations homogènes de progéniteurs mésenchymateux et neuraux (MPC, NPC ou NSC) que nous avons décrites dans la première partie des résultats. Nous avons ensuite recherché si ces populations cellulaires, correspondant à des stades précoces du développement, présentaient des anomalies pathognomoniques déjà connues dans les tissus adultes de patients DM1, comme la présence de foci ou des anomalies d'épissage. Ces phénotypes informatifs identifiés dans les cellules porteuses de la mutation représentent ainsi des biomarqueurs de la DM1.

Dans le deuxième volet de ce projet, ces phénotypes informatifs (*Read out*) ont été utilisés pour entreprendre des criblages à haut débit (HTS pour *High Throughput Screening*) dans le but d'identifier des composés chimiques ou des gènes dont l'action est capable de reverser la modulation pathologique de ces biomarqueurs.

Le troisième volet, réalisé en parallèle, visait à rechercher de nouveaux biomarqueurs associés à la maladie par des approches sans *a priori* à grande échelle ou plus ciblées en se basant sur des hypothèses.

Plusieurs étapes de ce projet de modélisation pathologique ont déjà été réalisées, son but ultime restant la découverte de nouveaux médicaments et une meilleure compréhension des mécanismes de la DM1.



**Figure 68 : Mesure de la taille des CTG dans les différentes lignées mutantes par Southern-Blot.**

(A) A l'état indifférencié. (B) Après différenciation en MPC. (C) Après différenciation en NSC.

## II. Validation du modèle

### 2.1. Obtention des ressources biologiques

Au début de ce projet, nous disposions d'une seule lignée hES porteuse de la mutation pour DM1, la lignée VUB03\_DM, importée en 2005 du laboratoire de l'Academisch Ziekenhuis Vrije Universiteit, dirigé par le Pr. Karen Sermon à Bruxelles (Belgique) et obtenue à partir d'un diagnostic préimplantatoire. En 2008, deux autres lignées ont été dérivées dans les mêmes conditions par le même laboratoire, la lignée VUB19\_DM, et la lignée VUB24\_DM.

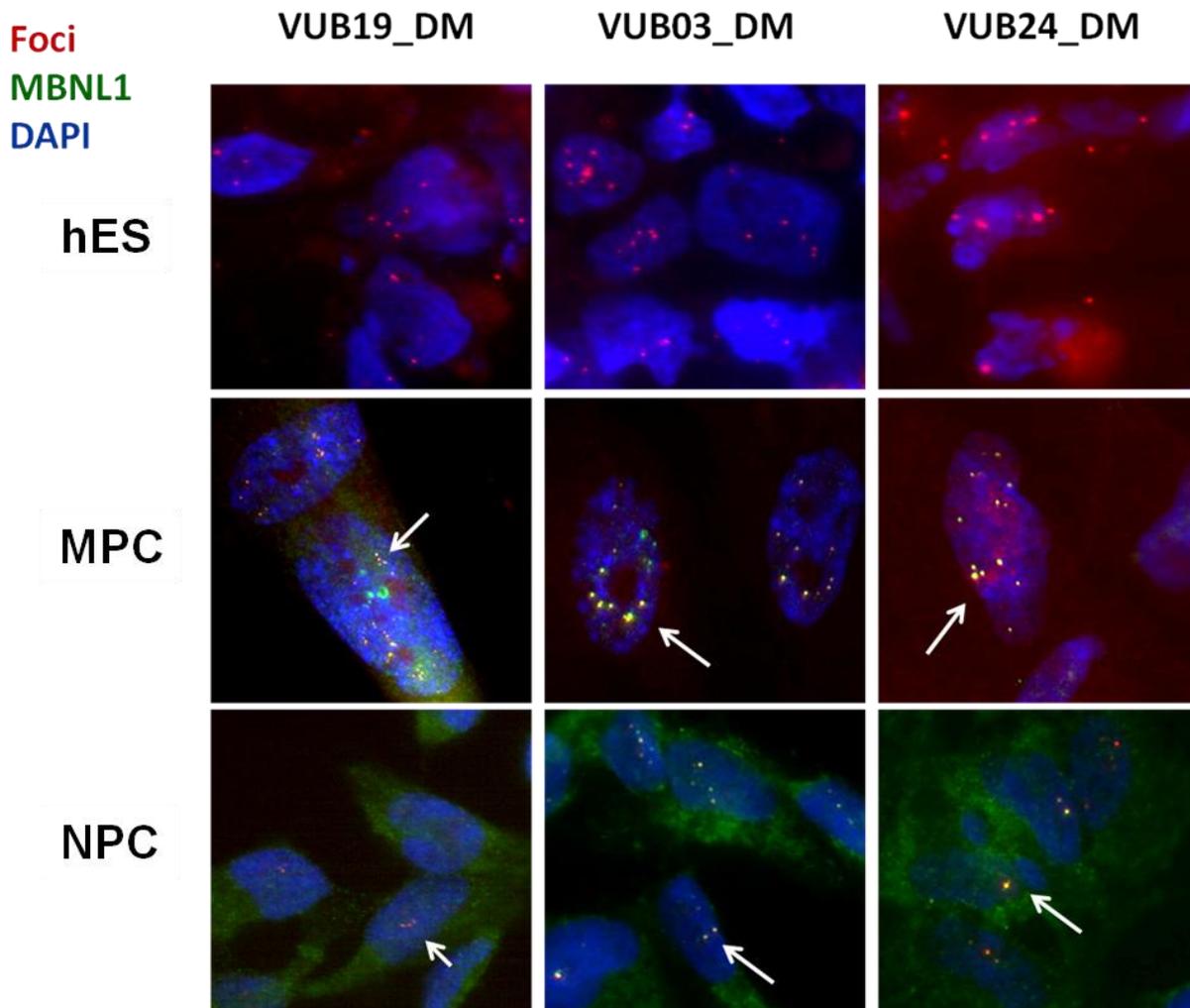
Une première analyse de la taille des répétitions CTG dans le gène *DMPK* dans l'ADN génomique des cellules hES avait été réalisée aux alentours de 20 passages par le laboratoire belge par la technique de Southern blot. La taille de ces expansions CTG était différente selon les lignées : environ 250 CTG pour VUB19\_DM ; environ 460 CTG pour VUB03\_DM et environ 1800 CTG pour VUB24\_DM.

L'examen de la taille de ces répétitions à des passages plus élevés (Passages >50) réalisé en collaboration avec le Dr. Geneviève Gourdon, à l'Hôpital Necker à Paris, a montré une augmentation marquée du nombre de répétitions CTG témoignant d'une instabilité dynamique importante (**Figure 68A**). Comme nous l'avons présenté dans la revue bibliographique sur la DM1, l'augmentation du nombre de CTG est corrélée à la sévérité de la maladie suggérant la possibilité, avec notre modèle cellulaire, de modéliser les différentes formes de la maladie et notamment la forme congénitale avec des lignées présentant plus de 1000 CTG.

Après différenciation des cellules hES en MPC et en NSC, nous avons observé une légère augmentation du nombre de CTG au cours de la différenciation mésenchymateuse (**Figure 68B**) et neurale (**Figure 68C**) mais elle est moins marquée que lors des passages des cellules hES à l'état indifférencié.

### 2.2. Recherche des anomalies pathognomiques dans les cellules hES et leurs progénies mésenchymateuses et neurales.

Dans un premier temps, nous avons recherché la présence d'agrégats nucléaires de l'ARN *DMPK* mutant, les foci, dans les cellules hES mutantes et leurs progénies (NPC et MPC) dans la seule lignée hES mutante disponible, la lignée VUB03\_DM. Dans les cellules hES, au stade indifférencié, nous avons détecté la présence de foci mais ces derniers ne sont jamais co-



**Figure 69 : Détection de foci nucléaires et de l'expression de la protéine MBNL1 dans les trois lignées mutantes au stade indifférencié et dans les progénies mésenchymateuses et neurales.**

Les foci colocalisant avec la protéine MBNL apparaissent en jaune (pointées par les flèches blanches) comme le résultat de superposition du signal rouge (foci) et du signal vert (Anticorps secondaire de MBNL1 couplé à la FITC). Les noyaux sont marqués par le DAPI et apparaissent en bleu.  
Grossissement : 40X après immersion dans l'huile.

localisés avec le facteur d'épissage MBNL1 démontrant que ceux-ci pouvaient se former en l'absence de cette protéine. En revanche, nous avons observé une co-localisation entre les foci et la protéine MBNL1 à la fois dans les cellules MPC et les NPC. Ces résultats ont été retrouvés ultérieurement dans les 2 autres lignées mutées aux mêmes stades et dans les NSC bien que ces foci soient plus difficilement détectables dans la lignée VUB19\_DM (**Figure 69**).

Les différents paramètres caractérisant ces foci ont ensuite été quantifiés en utilisant un microscope disponible au laboratoire, l'ArrayScan (Cellomics), permettant l'acquisition automatique de nombreux paramètres d'imagerie (**Figure 70**). Le travail de mise au point de cette analyse a été réalisé à I-STEM par Jacqueline Gide et Yves Maury.

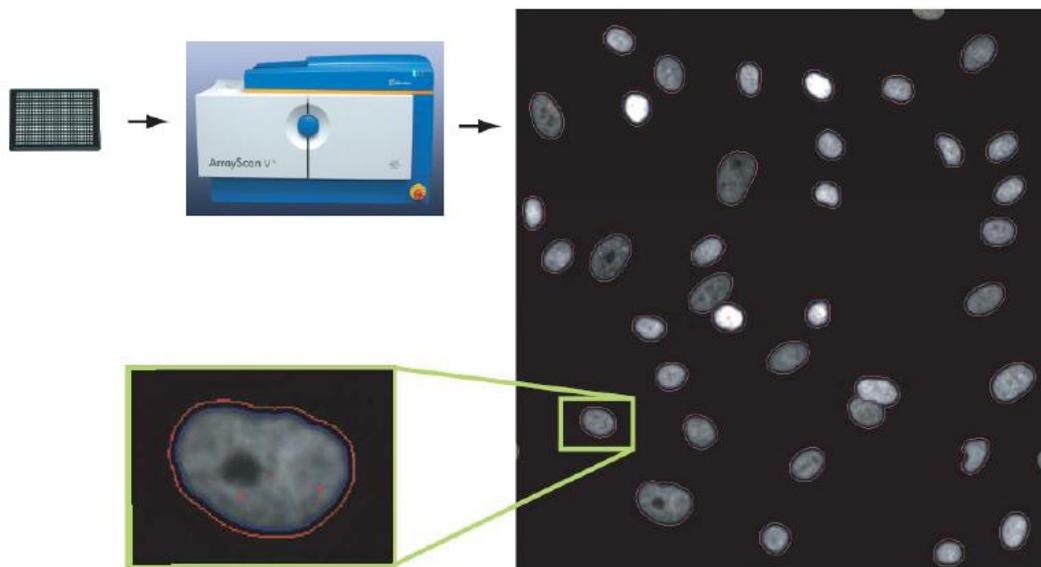
Nous avons ainsi pu montrer que plus de 80% des noyaux des cellules provenant des lignées VUB03\_DM et VUB24\_DM (CTG>1000) présentaient au moins un foci contrairement à ceux de la lignée VU19\_DM (CTG<1000) qui en contiennent seulement 30%. De même, le nombre de foci par noyau était positivement corrélé au nombre de répétitions CTG présentes dans les cellules MPC dérivées des différentes lignées DM1 (**Figure 71**).

Des résultats similaires ont été observés dans les cellules NSC et sont présentés dans la Figure 1 de l'Article II.

Nous avons ensuite recherché dans les cellules de la lignée VUB03\_DM, la présence d'anomalies d'épissage parmi celles décrites dans la DM1 incluant :

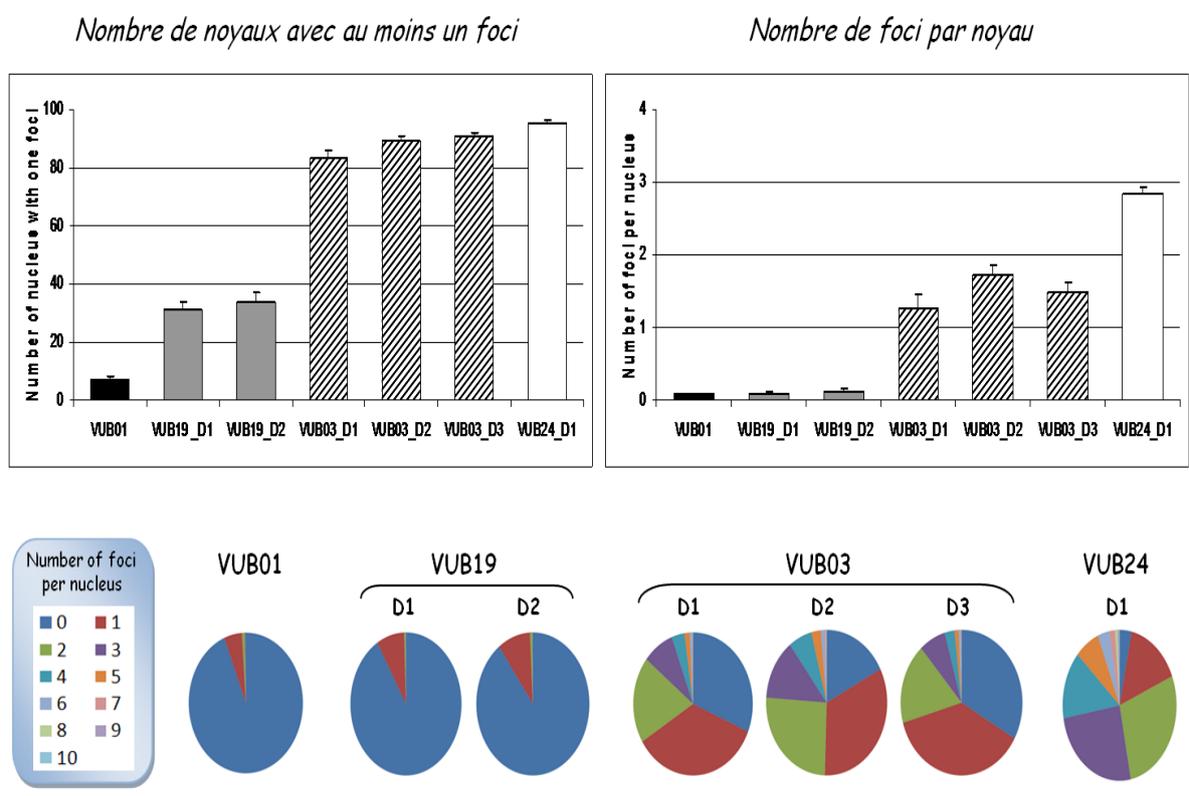
- **pour les MPC** : la troponine cardiaque et le récepteur de l'insuline (INSR)
- **pour les NPC** : le précurseur amyloïde (APP) ; le récepteur du NMDA (NMDAR1), la protéine Tau (MAPT) et l'INSR.

La seule anomalie d'épissage que nous avons détectée est celle de l'INSR et uniquement dans les cellules MPC (**Figure 72**). Le profil identifié est identique à celui observé dans les fibroblastes ou les myoblastes de patients DM1 et présente une diminution de l'inclusion de l'exon 11 c'est à dire la forme codant l'isoforme B de l'INSR. Cette modulation de l'épissage de l'INSR dans les cellules MPC, observée après seulement 30 jours de différenciation à partir des cellules hES, apporte un éclairage nouveau à la conception actuelle selon laquelle l'anomalie pathologique de l'épissage dans la DM1 correspond à une modulation d'un profil « adulte » vers un profil « fœtal ». Ainsi, en fonction du phénotype cellulaire, ce profil

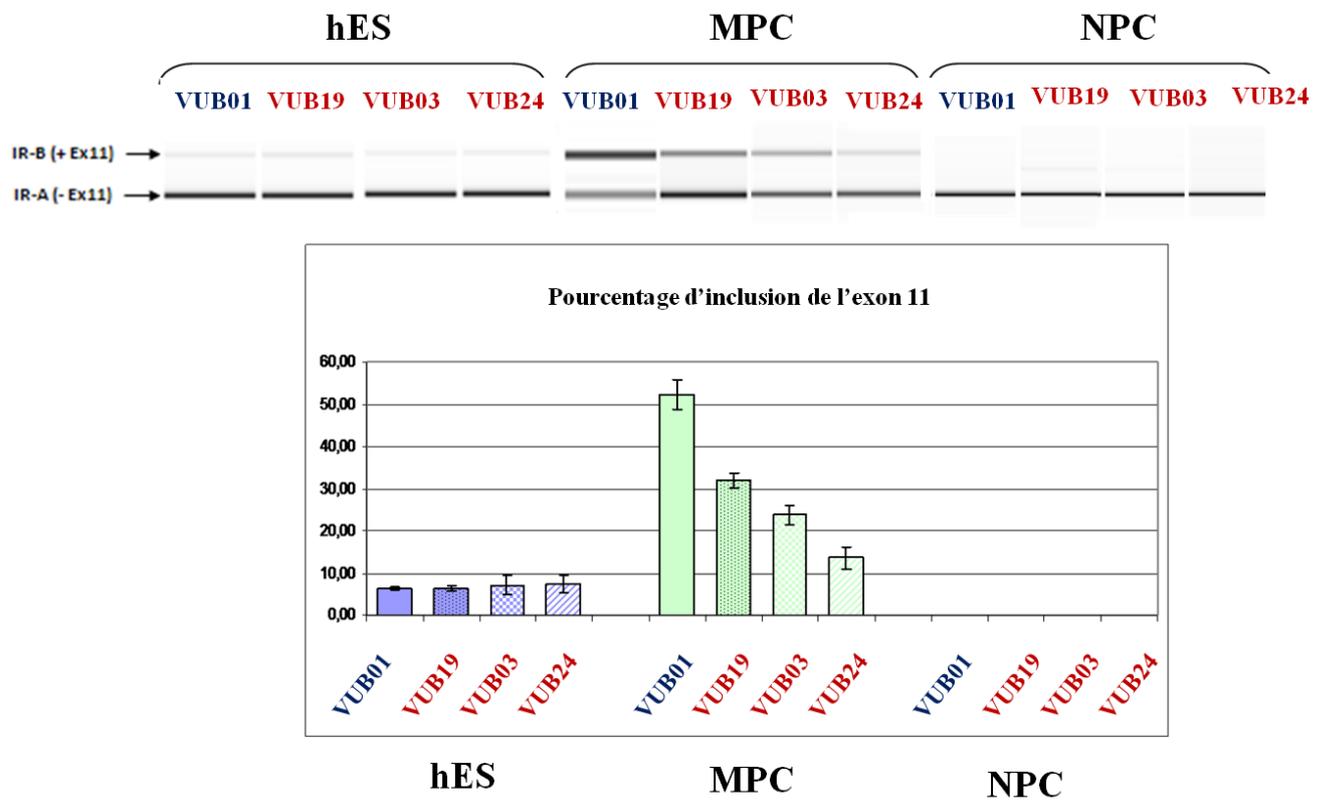


**Figure 70 : Principe de la détection et de la caractérisation des foci par la bioapplication « Colocalization ».**

Les cellulesensemencées en plaques 96 puits sont marquées par FISH. Les acquisitions sont effectuées par l'Arrayscan. La bioapplication « Colocalization » identifie les noyaux cellulaires grâce au marquage DAPI (bleu). Au sein du noyau, les régions correspondant aux foci (marquage rouge intranucléaire) sont déterminées et des régions d'intérêt sont identifiées (*ROI, region of interest*). Différents paramètres caractérisant les foci sont alors calculés : le nombre par noyau, l'aire totale par noyau (exprimée en pixels), l'intensité totale par noyau (exprimée en unités arbitraires) ainsi que l'intensité moyenne par ROI (exprimée en unités arbitraires).



**Figure 71 : Exemple de mesure des paramètres liés au foci détectés dans les MPC mutants.**



**Figure 72 Profil d'épissage du récepteur à l'insuline (l'INSR) au stade indifférencié et dans les progénies neurales et mésenchymateuses.**

Le profil d'épissage de l'exon 11 de l'INSR est recherché après amplification par PCR puis migration par électrophorèse capillaire sur puce Agilent. La bande du haut correspond à l'isoforme avec l'exon 11 (isoforme B, IR-B) et la bande du bas sans l'exon 11 (isoforme A, IR-A). La quantification de l'inclusion 11 est réalisée en mesurant les intensités des bandes en faisant le rapport  $IR-B/(IR-A+IR-B)$ . La lignée contrôle est la lignée VUB01\_WT (en bleu) et les 3 lignées mutantes sont VUB19\_DM ; VUB03\_DM et VUB24\_DM (en rouge). Chaque expérience est réalisée en triplicat.

« adulte » peut être induit très tôt au cours du développement et dérégulé dans les cellules mutantes.

Sur les bases de cette étude réalisée sur la lignée VUB03\_DM, nous avons confirmé ces résultats et montré la présence de l'anomalie d'épissage de l'INSR dans les cellules MPC dérivées des 2 autres lignées mutantes, VUB19\_DM et VUB24\_DM. Cette diminution pathologique de l'inclusion de l'exon 11 est corrélée avec le nombre de CTG (**Figure 72**). Par contre, dans les cellules hES la forme avec l'exon 11 représente moins de 10% de la forme totale et il n'y a pas de différence entre les lignées normales et mutées. D'autre part, l'isoforme B (avec l'exon 11) est indétectable dans les cellules NSC quelque soit la lignée considérée.

En conclusion, l'ensemble de ces données démontre que les cellules hES porteuses de la mutation pour DM1 ou leurs progénies obtenues après différenciation guidée sont capables de reproduire des anomalies spécifiques de la DM1 dès les premiers stades du développement validant ainsi ce modèle cellulaire de la pathologie.

### **2.3. Recherche de nouveaux médicaments**

La présence de phénotypes informatifs représentant des biomarqueurs -la présence de foci intranucléaires et l'anomalie de l'épissage de l'INSR- dans les populations homogènes de cellules amplifiables NSC et MPC mutées peuvent être quantifiés et servir de « *Read-out* » ouvrant la voie à des approches de criblage HTS. Deux types de criblages ont été entrepris : (1) un criblage d'une banque de composés chimiques ; (2) un criblage de génomique fonctionnelle. Ce dernier est basé sur l'utilisation d'une collection de siRNA.

Ainsi toutes molécules ou modulations d'un gène capables de détruire l'accumulation des foci ou de normaliser l'anomalie d'épissage de l'INSR pouvaient être considérées comme la base d'une stratégie thérapeutique éventuelle.

#### **2.3.1 Criblage de composés chimiques**

Le principe du criblage HTS consiste à confronter un très grand nombre de molécules potentiellement thérapeutiques, jusqu'à plusieurs centaines de milliers, à un modèle biologique pertinent d'une maladie génétique et d'observer leurs effets.

Le crible HTS réalisé à I-STEM par l'équipe dirigée par Marc Lechuga était basé sur l'identification de molécules pharmacologiques capables de cibler la destruction des foci



intranucléaires en utilisant les cellules MPC porteuses de la mutation pour la DM1 préparées par notre équipe.

Le test visant à détecter et à quantifier les foci a été réalisé par hybridation *in situ*, a été adapté au format de plaques 384 puits afin de pouvoir suivre l'effet de chaque composé au moyen de l'Array Scan présenté précédemment.

Sur la base de cet essai, un crible d'une banque de composés chimiques comprenant 1200 composés qui représentent l'ensemble des molécules actuellement mises sur le marché aux USA (« *FDA-approved drugs* ») a été réalisé. Ce crible a permis l'identification d'un composé chimique capable de conduire à la disparition des foci intranucléaires à des doses n'induisant pas de toxicité cellulaire. Les caractéristiques de ce composé n'ont pas permis pas de le retenir comme agent thérapeutique. En revanche, ces résultats nous ont permis de valider l'approche et les développements techniques entrepris. La poursuite de ce projet, prévue pendant l'été 2010, visera à la réalisation d'un crible à plus haut débit d'une collection de 5000 composés de la banque académique Française ainsi que d'une banque commerciale.

### ***2.3.2. Criblage de génomique fonctionnelle***

Une seconde approche basée sur le criblage par ARN interférence a été développée par le groupe du Dr. Sandrine Baghdoyan à I-STEM. Pour ce crible, le « read-out » retenu est l'anomalie de l'épissage de l'INSR dans les cellules MPC porteuses de la mutation pour la DM1. Pour cela, la quantification des transcrits par PCR quantitative codant les isoformes A et B de l'INSR (IR-A et IR-B) a été mis au point au format de plaques à 96 puits. Une étude pilote a consisté à éteindre par ARN interférence (siARN) une collection de gènes sélectionnés pour leur homologie de séquence avec les facteurs d'épissage impliqués dans la DM1 : MBNL1 et CUGBP1. Elle a conduit à l'identification d'un gène candidat\*\* dont l'extinction entraîne une correction de l'épissage de l'INSR accompagnée d'une correction fonctionnelle de l'insulinorésistance des cellules MPC mutées qui acquièrent une capacité à incorporer le glucose à un niveau égal à celui des cellules non mutées. A partir de l'étude des voies de signalisation dans lesquelles la protéine candidate est potentiellement impliquée, elle a été identifiée comme une cible pour deux composés pharmacologiques connus. Ce résultat ouvre

---

\*\* Ces résultats sont en cours de publication

Nom du gène	Symbole	Chromosome	ES	NPC	MPC
Zinc finger protéin 37a	ZNF37A	Chr10	-3,8	-11,8	-10,7
Proteasome 28S subunit, non ATPase-5	PSMD5	Chr9	-8,3	-3,2	
Zinc finger protéin 248	ZNF248	Chr10		-54,6	
SLIT and NTRK-like family member 4	SLITRK4	ChrX		-20,84	
Ephrin receptor A5	EPHA5	Chr4			-22,3
Paired related homeobox	PRRX1	Chr1			-9,2
Nicotinate phosphoribosyltransferase domain containing 1	NAPRT1	Chr8			-7,7
Ribosomal protein L31	RPL31	Chr2			-6,1
Trafficking protein particle 3	TRAPPC3	Chr1	+2,6	+3,2	
Cathepsin B	CTSB	Chr8	+2,1	+3,1	
Maternally expressed 3	MEG3	Chr14	+8,7		+90,5
NAD(P)H deshydrogénase, quinone 2	NQO2	Chr6	+5,1		+3,0
Interleukin 13 receptor, alpha 1	IL13RA1	ChrX		+5,4	
Eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3 gamma, 52kDa	EIF2S3	Chr12		+2,5	
Prickle-like 1	PRICKLE 1	Chr12	+2,9		

Tableau 13 : Identification par analyse transcriptomique sur microarray de gènes différentiellement exprimés entre cellules DM1 (lignée VUB03-DM) et deux lignées contrôles (VUB01\_WT et H9\_WT). Les gènes modulés dans au moins un type cellulaire à l'état indifférencié ES) ou différencié en précurseurs neuraux (NPC) ou mésenchymateux (MPC) ont été sélectionnés sur la base de leur intérêt biologique et leur expression validée en Q-PCR. FC : Fold change.

des perspectives intéressantes car l'application de ces composés permet également la correction du défaut d'épissage de plusieurs autres gènes anormalement processés dans DM1.

## 2.4. Recherche de nouveaux biomarqueurs pour la DM1

Nous avons utilisé deux approches pour la recherche de nouveaux biomarqueurs, par « ressource driven » ou par « hypothesis driven » qui ne sont pas exclusives mais complémentaires. Quelque soit l'approche, chaque nouveau biomarqueur pour DM1 identifié doit être validé. Cela nécessite de pouvoir relier sa modulation ou sa perturbation à un processus cellulaire ou moléculaire altéré dans les cellules mutantes. Il peut ensuite servir à mieux comprendre la physiopathologie de la maladie mais aussi représenter de nouveaux « Read-out » pour les criblages.

### 2.4.1 Approche par « ressource driven »

Cette approche dite par « ressource driven » -guidée par la ressource biologique- consiste à rechercher sans *a priori* des différences entre les cellules normales et mutées par une méthode exhaustive comme le transcriptome ou le protéome dans le but d'identifier des gènes ou des protéines modulés pouvant refléter l'action pathologique ou compensatrice de la mutation sur des voies métaboliques. Nous avons choisi d'utiliser une approche par transcriptome sur puces à ADN pangénomique (Affymetrix, « Human Genome U133 plus 2.0 array ») permettant l'étude simultanée de l'expression des 25 000 gènes humains dans le but d'identifier ceux qui pourraient être impliqués soit dans un processus physiopathologique soit dans un mécanisme de protection. Cette analyse a révélé la modulation de l'expression de 87 gènes dans les cellules de la lignée hES VUB03\_DM et leurs progénies MPC et NPC comparées aux lignées contrôles dont 48 sont sous-exprimés et 39 sur-exprimés, chacun d'entre eux pouvant *a priori* être considéré comme un candidat biomarqueur de DM1 associé à l'expression de la mutation.

Une quinzaine de ces gènes ont ensuite été sélectionnés sur la base de leur pertinence biologique ou d'un haut niveau de modulation et validés en recherchant si ces modulations observées en transcriptome étaient retrouvées en PCR quantitative dans les 2 autres lignées mutées VUB19\_DM et VUB24\_DM (**Tableau 13**).

L'équipe du Dr Cécile Martinat s'est intéressée à deux gènes dont l'expression est diminuée dans la progénie neurale issue des hES DM1 et qui codent pour des protéines de la famille SLITRK. Elle a pu observer une hyperarborisation neuritique dans les cultures cholinergiques



mutées par rapport aux contrôles. Cette anomalie s'accompagne également d'un défaut dans la capacité des cellules cholinergiques mutées à interagir avec leur cible musculaire.

Parallèlement à cette étude, elle s'est également intéressée au gène ZNF37A, codant pour une protéine présentant les caractéristiques de la famille de facteur de transcription à doigt de zinc et contenant des domaines Krab (pour « Krüppel-associated box »), dont l'expression de l'ARNm est diminuée d'au moins un facteur 100 dans les cellules mutées quelque soit leur état de différenciation. Une étude est actuellement en cours afin d'identifier les cibles génétiques de ce facteur de transcription et en particulier d'analyser leur effet physiopathologique.

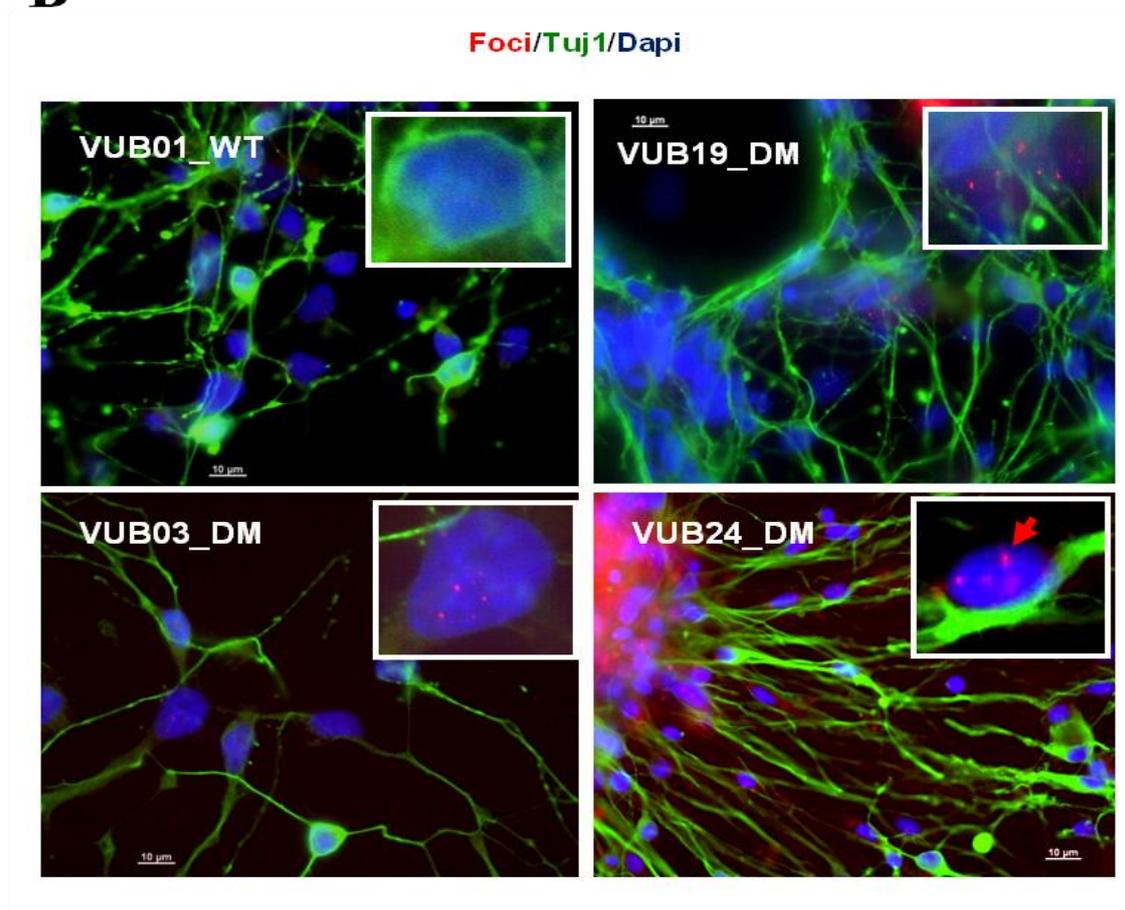
Je me suis pour ma part intéressé à l'expression de la cathepsine B, une des enzymes principale de la voie catabolique lysosomiale. J'ai validé son augmentation dans les cellules NPC et NSC à la fois au niveau du gène et de la protéine. Son implication reste à définir mais nous disposons de certains arguments suggérant son implication dans un mécanisme autophagique qui sera présenté au paragraphe III.

#### **2.4.2. Approche par « Hypothèse driven ».**

L'approche par « hypothesis driven » -guidée par l'hypothèse- consiste à rechercher des anomalies sur les bases de données disponibles dans la littérature ou d'un phénotype directement observable dans les cellules mutantes.

C'est sur cette approche que j'ai basé la réalisation de la deuxième partie des mes résultats de thèse qui sont présentés ci-dessous.

En conclusion, la stratégie de modélisation pathologique de DM1 entreprise depuis plus de 5 ans à I-STEM comporte de multiples aspects impliquant plusieurs groupes. Le modèle cellulaire a été validé et les étapes suivantes, qui ont déjà donné des premiers résultats, sont toujours en cours.

**A****B**

**Figure 73 : Présence de Foci dans les neurones mutants DM1 dérivés à partir des cellules NSC.**

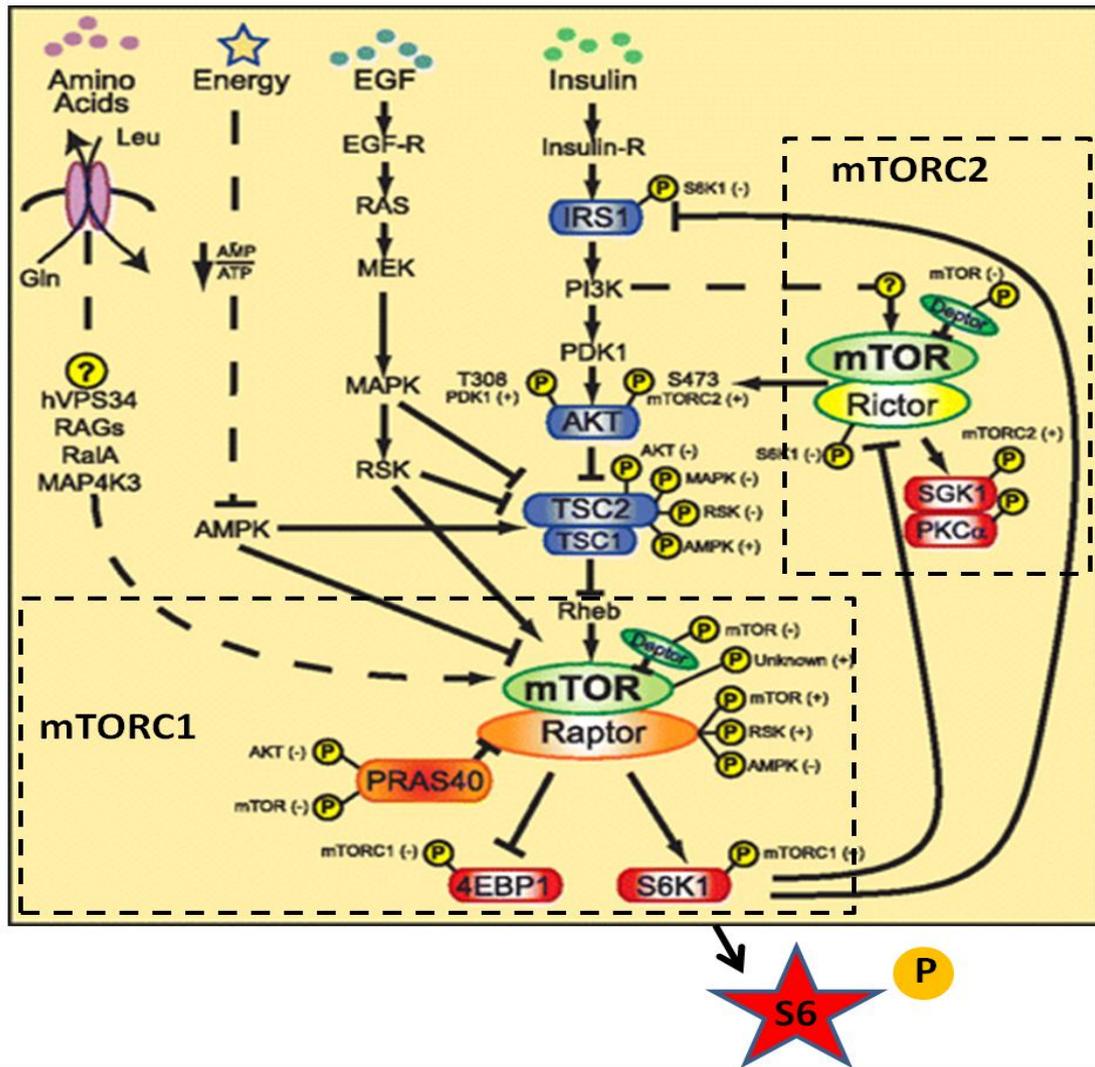
(A) Protocole de différenciation des cellules NSC en neurones. (B) Recherche de Foci par hybridation *in situ* (en rouge) combinée avec l'immunomarquage avec l'anticorps polyclonal dirigé contre la protéine Tuj1 (marqueur neuronal), en vert. Les noyaux sont marqués par le DAPI.

### **III. Modélisation pathologique des anomalies neurales dans la DM1**

Ma contribution à ce projet de modélisation pathologique a consisté à utiliser les précurseurs neuraux présentés dans la première partie pour mieux comprendre les mécanismes pathologiques impliqués dans les anomalies neurales de la DM1 afin d'ouvrir des nouvelles pistes thérapeutiques. Comme cela a été évoqué plus haut, la deuxième partie de mes travaux de thèse a été menée dans le cadre de la recherche de nouveaux biomarqueurs de DM1 par une approche « hypothèse driven ». Deux études ont ainsi été menées en parallèle en collaboration avec Sophie Aubert, Ingénieur d'étude dans l'équipe :

- **la mise en évidence d'une voie de signalisation cellulaire perturbée** : cette étude s'est basée sur une observation selon laquelle les cellules NSC porteuses de la mutation DM1 proliféraient plus lentement que les cellules contrôles. Nous avons recherché et identifié une voie de signalisation perturbée dans les NSC mutantes, la voie mTORC1, qui pourrait être responsable de ce phénotype.
- **l'étude d'un marqueur de neurodégénérescence, la protéine Tau** : Cette protéine connue pour son implication dans la maladie d'Alzheimer. Elle joue un rôle dans la DM1 mais son implication dans la physiopathologie de la maladie n'est pas entièrement comprise.

Comme évoqué précédemment pour les MPC, j'ai recherché et identifié des foci dans les NSC (**Figure 69**) et les neurones dans les 3 lignées mutantes (**Figure 73**).



**Figure 74 : Régulation de la voie de signalisation mTOR.**

Les facteurs de croissance (l'insuline), les mitogènes, les nutriments (acides aminés) ou le statut énergétique activent la voie de signalisation mTORC1 par des cascades de phosphorylation qui convergent sur le complexe mTORC1. La voie de l'insuline active la voie PI3K/Akt/TSC/Rheb; les facteurs mitogènes comme le récepteur de l'EGFR (*EGF-R*) active la voie Ras/MEK/MAPK/RSK; les acides aminés activent la voie hVps34, RAG et RalA GTPases; l'énergie (rapport ATP/AMP favorable) inhibe la voie mTORC1 via l'AMPK. La voie de l'insuline active également, via la PI3K, la voie mTORC2 par un mécanisme inconnu. Le complexe mTORC1/S6K1 effectue un rétro-contrôle négatif sur ces deux voies et supprime la voie PI3K/mTORC2/Akt. La phosphorylation est notée par un (P) dans un cercle jaune. Les kinases responsables de ces phosphorylations sont indiquées avec (+) ou (-) indiquant respectivement une relation d'activation ou d'inhibition. L'étoile rouge indique la protéine ribosomale S6 (S6) et sa forme phosphorylée (P-S6) que nous utilisons dans notre étude comme marqueur d'activation de la voie mTOR. Elle est phosphorylée par la S6K1 (protéine S6 Kinase-1).

(D'après Foster, 2010).

### **3.1. Étude d'une anomalie de prolifération dans les précurseurs neuraux porteurs de la mutation DM1**

#### ***3.1.1 Contexte de l'étude et principaux résultats***

En suivant la capacité de prolifération des cellules NSC, nous avons pu mettre en évidence une augmentation du temps de doublement dans les cellules dérivées des lignées VUB03\_DM et VUB24\_DM comparée aux lignées contrôles et à la lignée VUB19\_DM.

Cette diminution des capacités prolifératives de ces cellules peut-être potentiellement due soit à une augmentation de la mortalité soit à un défaut du cycle cellulaire. Nous n'avons pas observé de différence entre les cellules NSC normales et mutées dans les processus d'apoptose ou de nécrose. Par contre, nous avons observé en Western Blot une augmentation d'un puissant inhibiteur de la transition G1/S du cycle cellulaire, la protéine p27kip. Pour caractériser cette anomalie, nous avons analysé une des voies de signalisation connue pour induire le catabolisme de cette protéine, la voie mTORC1/p70S6K (**Figure 74**). Nous avons ainsi mis en évidence, par Western Blot, une forte diminution de cette voie, dans les NSC VUB03\_DM, en suivant la diminution de l'un de ses substrats, la phosphorylation en Ser235/236 de la protéine ribosomale S6 (P-S6). Cette phosphorylation s'est révélée être un bon marqueur de l'activation/répression de cette voie de signalisation puisque la rapamycine, un inhibiteur spécifique de mTOR, permet de la réprimer complètement et de manière continue.

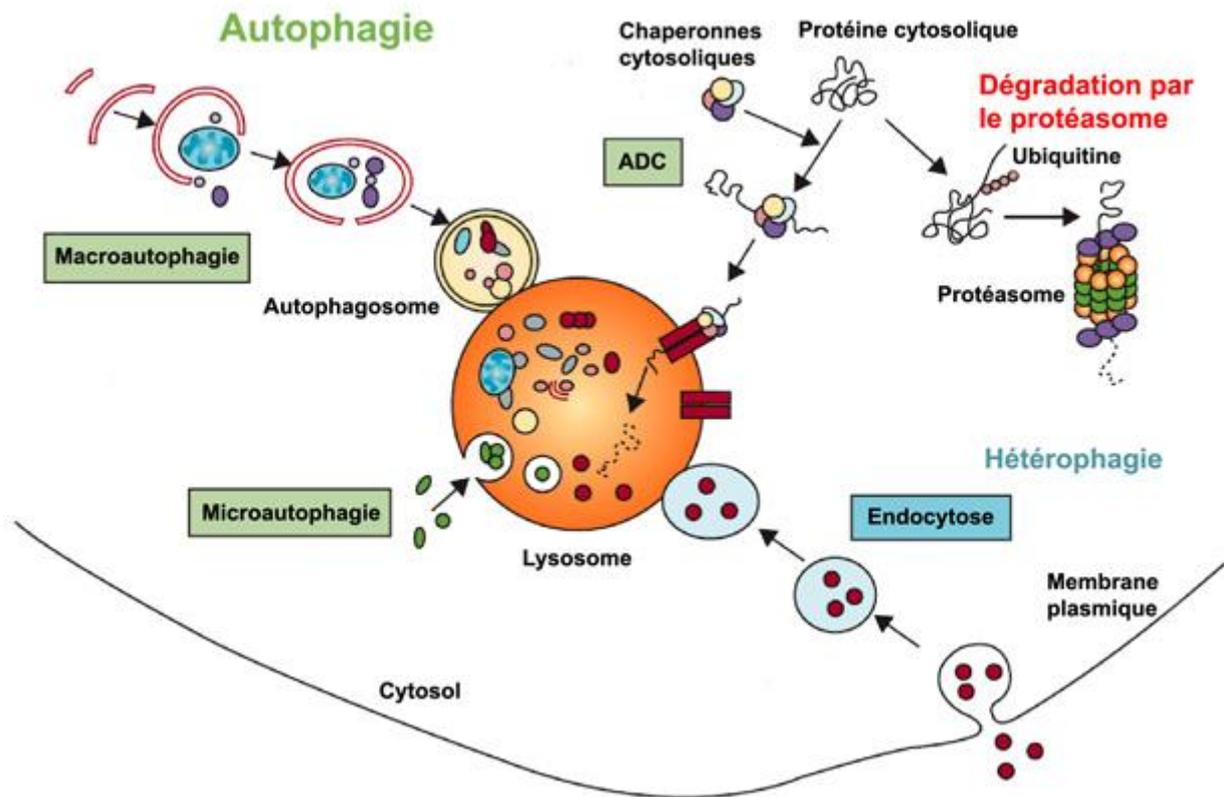
Afin de corréliser cette observation avec la présence de la mutation, nous avons nucléofecté un plasmide contenant 960 répétitions CTG dans les cellules NSC normales mimant ainsi l'effet de ma mutation. La présence de cette expansion de CTG entraîne une diminution de la phosphorylation de la P-S6 que nous interprétons comme une diminution pathologique de la voie mTOR dans les NSC mutées.

Pour confirmer que cette anomalie n'était pas due aux conditions de culture, nous avons testé séparément l'effet des facteurs de croissance, l'EGF, le FGF2 et BDNF, ajoutés au milieu de culture de nos cellules. Nous n'avons pas trouvé d'effet du BDNF et de l'EGF sur l'expression de la P-S6. En revanche, l'ajout de FGF2 est capable de restaurer l'activation de cette voie de manière dose-dépendante par la voie des MAP kinase ERK1/2 après 1h et 6h de traitement, dans les cellules mutées, cet effet s'estompant à mesure que la voie s'éteint à 24 et 48h. Ces résultats nous ont permis de conclure que la voie mTOR était diminuée dans les cellules NSC



mutantes et que cette anomalie n'apparaissait que quand la voie ERK n'était pas activée. Par contre, nous avons pu montrer que la phosphorylation de la S6 était complètement inhibée par un inhibiteur spécifique de la voie PI3K, le LY292002, suggérant que la diminution de l'activation de la voie mTOR dans ces cellules était principalement due à une anomalie de cette voie dans les cellules malades.

L'ensemble de ces résultats est présenté dans l'**article II**



**Figure 75: Présentation des différents mécanismes cataboliques centrés sur les lysosomes incluant l'autophagie.**

Le terme autophagie provient du grec et signifie « Se manger soi-même ». Ce processus biologique d'auto-cannibalisme a été principalement décrit lors d'une carence en nutriments, et regroupe un ensemble de mécanismes cataboliques conduisant à la dégradation de constituants cellulaires par le lysosome. L'autophagie peut être subdivisée en au moins 3 catégories : la microautophagie, l'autophagie dépendante des chaperonnes (ADC) et la macroautophagie.

(D'après <http://www.oncoendo.com>).

### 3.1.2. Conséquence de l'inhibition de la voie mTOR et autophagie

La diminution de la voie mTOR que nous avons identifiée dans les cellules NSC DM1 peut avoir de nombreuses conséquences sur la physiologie de la cellule dont la levée de l'inhibition du mécanisme autophagique à laquelle nous nous sommes intéressés (**Figure 75**).

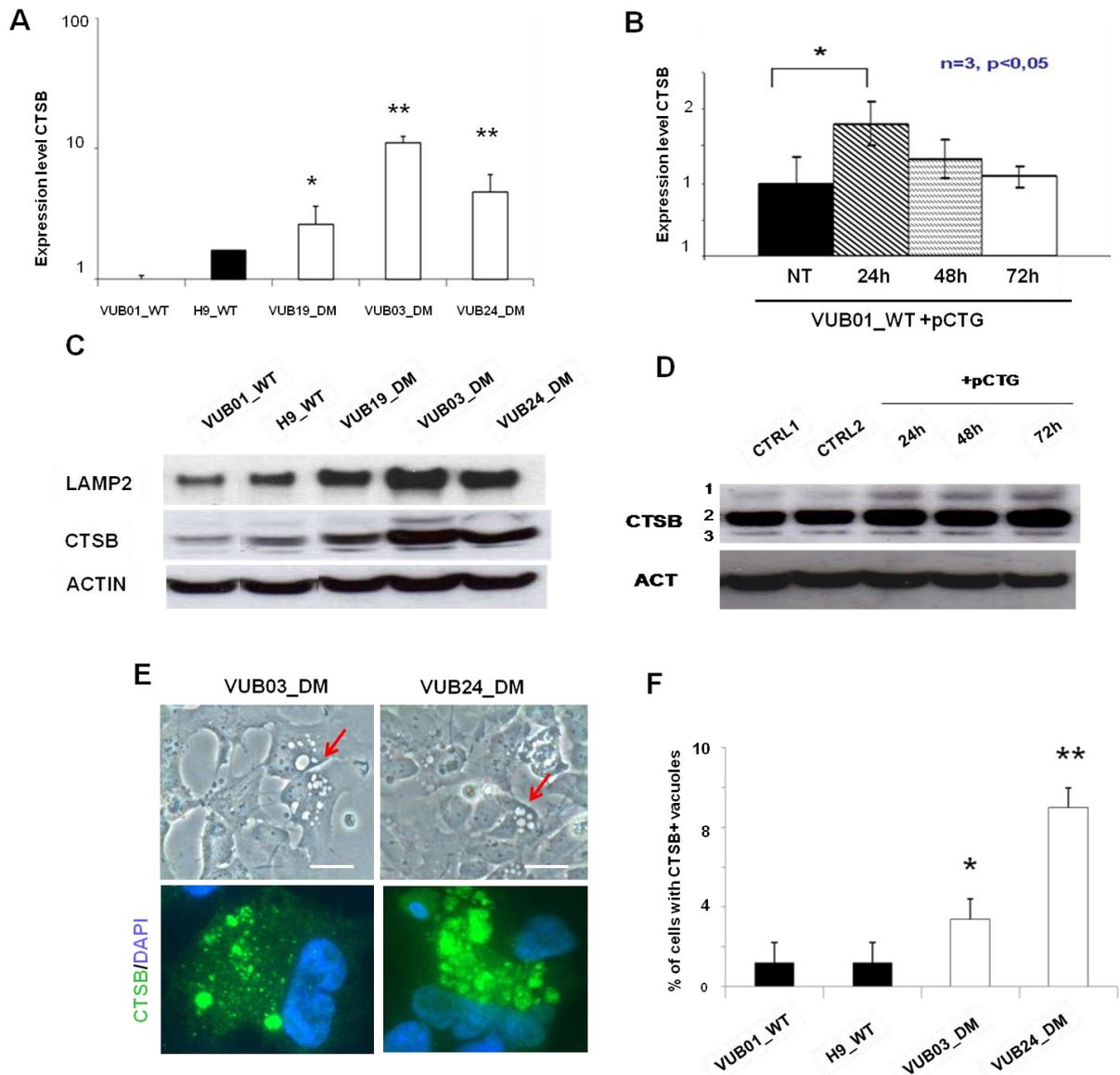
#### 3.1.2.1 Définition de l'autophagie

L'autophagie est un processus d'auto-digestion qui consiste en une dégradation des composants intracellulaires par l'intermédiaire des enzymes contenues dans les lysosomes ou les vacuoles propres à la cellule (Puyal et al., 2009). Il existe plusieurs types d'autophagie :

- **la micro-autophagie** : elle a lieu lorsque le cytoplasme est séquestré par invagination de la membrane lysosomale ou vacuolaire.
- **l'autophagie médiée par les chaperones** : elle concerne spécifiquement les protéines qui portent une séquence précise de 5 acides aminés (KFERQ). Ces protéines sont prises en charge par un complexe formé par les protéines chaperones (hsc70) et co-chaperones (hip, hop, hsp40, hsp90 et bag1) qui les dirigent jusqu'au lysosome où un récepteur associé à la membrane lysosomale (LAMP-2A) les reconnaît et permet leur translocation dans la lumière du lysosome.
- **la (macro)autophagie** : il y a formation de vésicules à double membrane, les autophagosomes, qui séquestrent des portions du cytoplasme. Après fusion complète de l'autophagosome avec le lysosome (ou la vacuole), se produit la dégradation du matériel séquestré et éventuellement le recyclage d'autres composants.

L'autophagie joue un rôle physiologique important dans la croissance cellulaire, la différenciation et le « *turn-over* » des organites non fonctionnels ainsi que des protéines à longue durée de vie assurant ainsi le maintien de l'homéostasie cellulaire.

En situation de stress, par exemple lors de conditions pauvres en nutriments, l'autophagie est impliquée dans le maintien d'une production énergétique suffisante et assure l'élimination des métabolites toxiques, des organites ou des protéines anormales. Plus récemment, ce rôle de l'autophagie en condition de stress s'est complexifié à la suite de la description d'un nouveau type de mort cellulaire nommé « mort cellulaire de type 2 » caractérisée par une activité autophagique délétère (Puyal et al., 2009).



**Figure 76 : Augmentation de la cathepsine (CTSB) et vacuolisation du cytoplasme dans les cellules NSC mutantes**

(A) Expression de la CTSB mesurée par PCR quantitative (qPCR) dans les cellules NSC. (B) Expression de la CTSB mesurée après nucléofection d'un plasmide contenant 960 CTG (pCTG 960) à 24, 48, 72 heures dans les cellules NSC VUB01\_WT. (NT : non transfectées). (C) Expression protéique réalisée par Western blot de la CTSB et de LAMP2, un marqueur lysosomal dans les cellules NSC. La bande du milieu correspond à la forme mature de la CTSB, la bande supérieure à la pro-cathepsine et la bande du bas à la chaîne  $\beta$  de la protéine. (D) Expression protéique de la CTSB après nucléofection du plasmide pCTG 960. (E) Vacuolisation du cytoplasme (flèche rouge) dans les NSC mutantes observées au microscope optique (Grossissement 20X, barre d'échelle : 10 $\mu$ m). Certaines vacuoles cytoplasmiques de grande taille sont positives pour la cathepsine B. (F) Pourcentage de NSC présentant des grandes vacuoles positives pour la CTSB dans les cellules NSC (n=3 ; t-test ; \*p<0,05 ; \*\*p<0,01).

Ce paradoxe est particulièrement important dans le système nerveux où l'activation de l'autophagie semble protectrice dans certaines maladies neurodégénératives liées à l'accumulation de protéines mutées ou toxiques et à leur agrégation (Cuervo, 2010). C'est ainsi le cas dans la maladie de Parkinson (agrégats d' $\alpha$ -synucléine) (Yang, 2010), la maladie de Huntington (agrégats de polyglutamine) (Sarkar, 2008), la maladie d'Alzheimer (agrégats du peptide  $\beta$  -amyloïde) (Funderburk, 2010; Ling, 2009) et les tauopathies (agrégats de la protéine tau hyperphosphorylée) (Rubinsztein et al., 2005). Par contre, ces accumulations semblent pathologiques dans d'autres situations (Uchiyama et al., 2009) comme la sur-activation des neurotransmetteurs excitateurs glutamatergiques (excitotoxicité) dans l'ischémie cérébrale (Koike et al., 2008; Uchiyama et al., 2008).

L'induction de l'autophagie est principalement régulée par l'effet inhibiteur de la voie mTOR (Carrera, 2004; Pattingre et al., 2008) bien que, récemment, une induction indépendante de cette voie ait également été décrite (Sarkar et al., 2009).

### 3.1.2.2 Etude de l'autophagie dans les cellules NSC DM1

Plusieurs résultats que nous avons obtenus suggèrent que les cellules NSC mutantes présentent des signes d'autophagie. Tout d'abord, parmi les gènes que nous avons validés à partir de l'étude de transcriptome présentée précédemment, la cathepsine B (CTSB), la principale hydrolase lysosomiale, a été identifiée comme sur-exprimée dans les cellules NPC de la lignée VUB03\_DM par rapport aux différentes lignées contrôles (**Tableau 13**). La mesure de l'expression de la CTSB par PCR quantitative a révélé que la quantité de transcrite était significativement plus élevée dans les NSC des lignées VUB03\_DM et VUB24\_DM que dans 2 lignées contrôles VUB01\_WT et H9\_WT ou la lignée VUB19\_DM (**Figure 76A**). Par ailleurs, la nucléofection transitoire du plasmide de 960 répétitions CTG dans les cellules NSC normales, que nous avons décrite ci-dessus, induit une augmentation de l'expression de la CTSB d'un facteur 2, 24h post-nucléofection suivie par un retour à un niveau basal à 48h et 72h. (**Figure 76B**). Au niveau protéique, on observe une augmentation de la CTSB mature, correspondant à la bande majoritaire, dans les 3 lignées mutantes de NSC par rapport aux 2 lignées contrôles (**Figure 76C**). Les deux autres bandes correspondent respectivement à la procathepsine B (bande du haut) et de la chaîne  $\beta$  (bande du bas). Cette augmentation est corrélée à l'expression de LAMP2a une protéine membranaire du lysosome et des autolysosomes. Par ailleurs, la nucléofection du plasmide de 960 CTG est associée à une augmentation progressive, à 24h, 48h et 72h, de la pro-cathepsine et de la chaîne  $\beta$ ,



respectivement la bande du haut et la bande du bas et l'augmentation de l'expression de la CTSB mature (bande principale au milieu) est plus modérée, (**Figure 76D**). Ces résultats montrent que l'introduction d'une expansion de répétitions CTG dans les NSC contrôles entraîne une induction de la néosynthèse de CTSB.

D'autre part, l'observation des cellules NSC mutantes au microscope révèle la présence, de grosses vacuoles dans le cytoplasme fortement positives pour l'expression de la CTSB par immunomarquage (**Figure 76E et 76F**).

En conclusion, dans un contexte cellulaire pathologique où la voie mTOR est inhibée, nous interprétons ces résultats comme une augmentation de l'accumulation d'auto-lysosomes riches en CTSB dans les cellules neurales DM1 correspondant à l'étape terminale du mécanisme autophagique.

### 3.1.2.3 Discussion et perspectives

L'ensemble de nos résultats suggèrent l'implication de la voie mTOR dans le mécanisme physiopathologique de la DM1 affectant potentiellement le système nerveux central.

Nous centrerons notre discussion sur les conséquences de la diminution de la voie mTOR dans le cadre de la DM1, de la pertinence de l'augmentation de l'autophagie dans le processus physiopathologique de la maladie et enfin, nous discuterons de la voie mTOR comme cible thérapeutique potentielle.

- **Conséquences de la diminution de la voie mTOR dans la DM1**

Comme nous l'avons vu, la voie mTOR régule de nombreux mécanismes dont la croissance, la prolifération, la traduction et l'autophagie. Les conséquences de la diminution de la voie mTOR sont bien connues dans le muscle où elle joue un rôle central dans la régulation de la masse musculaire et du métabolisme énergétique mais son rôle dans le cerveau est moins documenté. Cette voie de signalisation a cependant été impliquée dans la physiopathologie de plusieurs maladies neurologiques responsables notamment d'anomalies du comportement, de la mémoire et de l'apprentissage. Comme nous l'avons déjà évoqué les patients DM1 présentent des anomalies neurologiques incluant ces 3 symptômes. (Voir discussion de l'article II).



- **Pertinence de l'augmentation de l'autophagie dans la DM1 ?**

Des études portant sur des relations entre une augmentation de l'autophagie et la DM1 ont déjà été rapportées dans la littérature. Une étude réalisée dans le modèle de drosophile mutant pour la DM1 a montré la présence de vacuoles dans les cellules musculaires mais sans décrire de mécanisme associé (de Haro et al., 2006). Plus récemment, une autre étude a proposé un possible mécanisme reliant la DM1 et l'induction de l'autophagie (Oude Ophuis et al., 2009). Dans cette étude, Wansink et ses collaborateurs ont montré qu'un déséquilibre dans le rapport des isoformes de la DMPK est associé à un mécanisme pathologique. En effet, la surexpression de l'isoforme A de la DMPK, l'un des six isoformes de la protéine, est capable d'induire par l'intermédiaire de son extrémité C-terminale le regroupement (« clustering ») de mitochondries dystrophiques associées à une augmentation de l'autophagie. Dans ce mécanisme, l'induction de l'autophagie pourrait être un mécanisme de défense cellulaire pour rétablir un défaut énergétique et augmenter la clairance des débris mitochondriaux dans le cytoplasme.

De manière plus générale, le dysfonctionnement des lysosomes est observé dans un grand nombre de maladies (cancer, maladies neurodégénératives et certaines formes de myopathies), qui sont dues soit à une absence de protéine soit à une protéine défectueuse, ce qui entraîne une accumulation de substrats dans la cellule et un métabolisme modifié.

Dans la DM1, la présence d'anomalies d'épissage médiées ou non par la protéine MBNL1, peut conduire à la formation de protéine anormale. C'est le cas par exemple du canal chlore dont l'inclusion de l'exon 7a conduit à l'apparition d'un codon stop et à une protéine tronquée.

On peut supposer que certaines de ces protéines sont potentiellement toxiques pour la cellule.

L'induction d'un mécanisme catabolique comme l'autophagie pourrait ainsi jouer un rôle protecteur pour les cellules mutantes contre l'accumulation protéique.

A partir de l'ensemble de nos résultats, des expériences complémentaires sont nécessaires afin d'étudier le flux autophagique dans les cellules NSC normales et mutantes en utilisant des activateurs de l'autophagie, notamment la rapamycine et des inhibiteurs telles que la 3-MA ou la bafylomycine A1 qui empêchent la fusion des lysosomes avec les autophagosomes. Ces expériences devraient permettre de préciser la nature de l'anomalie conduisant à l'accumulation de vacuoles contenant de la CTSB. Il pourrait également être intéressant d'analyser par



microscopie électronique la nature de l'ultra-structure de ces vacuoles afin de préciser la présence d'autophagosomes à double membrane ou d'autolysosome à simple membrane.

De manière plus générale, la recherche de vacuoles contenant de la CTSB dans d'autres modèles de la maladie comme les souris DMXL, présentant des répétitions CTG >1000 et reproduisant certaines anomalies neurologiques, pourrait appuyer ces résultats et apporter une nouvelle piste dans la recherche des mécanismes physiopathologiques de la DM1 en définissant une cible thérapeutique potentielle.

- **La voie mTOR comme cible thérapeutique ?**

Comme nous l'avons mentionné dans la revue bibliographique, les approches thérapeutiques agissant très en aval sur les cascades métaboliques dans le but d'améliorer la condition cellulaire (« *cell-being* ») sont aujourd'hui peu développées dans la DM1 contrairement aux stratégies directement basées sur les acteurs centraux de la maladie à savoir l'ARNm mutant et la protéine MBNL1. Néanmoins, le caractère multisystémique de cette maladie et en particulier l'atteinte neurologique qui peut être au premier plan dans les formes congénitales nécessite de ne pas négliger d'autres pistes thérapeutiques, notamment pharmacologiques.

La voie mTOR est une voie de signalisation centrale qui présente, comme nous l'avons vu, une certaine pertinence par rapport à la symptomatologie neurologique de la DM1. De plus, certains composés de cette voie sont « druggables », c'est-à-dire que l'on peut avoir accès à des approches pharmacologiques capables de la moduler.

Les résultats que nous venons de présenter ne permettent pas de savoir si l'inhibition de la voie PI3K/mTOR et l'augmentation des vacuoles positives pour la CTSB, observées dans les cellules NSC mutants, constituent des événements protecteurs ou au contraire délétères pour les cellules malades. En fonction de la réponse, des stratégies thérapeutiques pourraient être proposées en modulant l'activité de cette voie de signalisation.

Dans le cas où la diminution de la voie PI3K/mTOR dans les cellules malades serait pathologique, une solution thérapeutique pourrait être apportée par stimulation de cette voie.

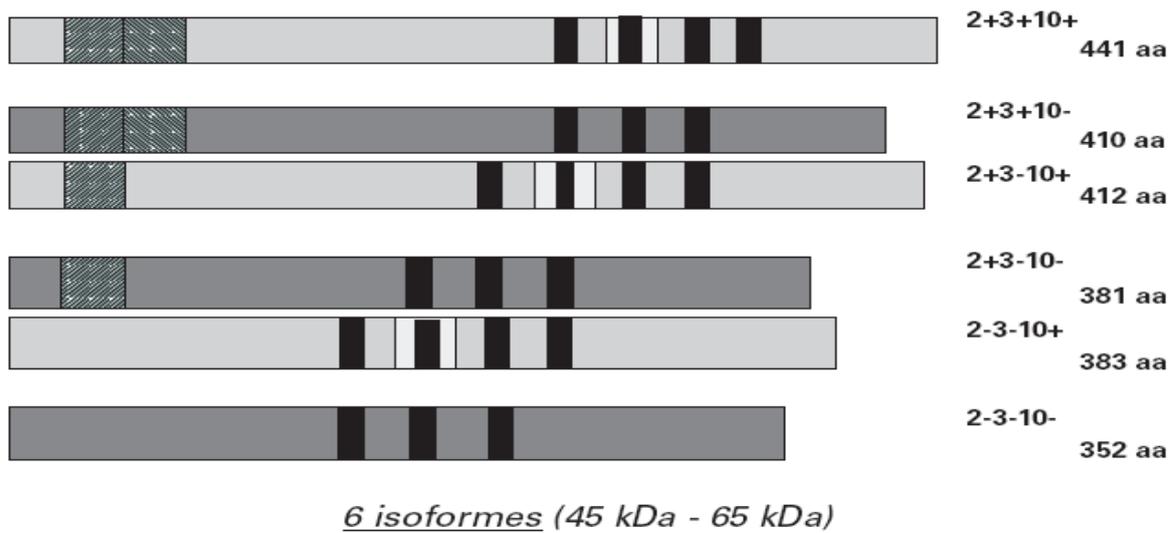
Une des stratégies actuellement en cours dans la DM1 concerne l'utilisation de l'IGF et de ses dérivés (voir revue bibliographique) qui sont des puissants anabolisants qui stimulent la voie mTOR en induisant l'hypertrophie musculaire (Glass; Latres et al., 2005). Dans le système nerveux central, l'IGF est un puissant facteur neurotrophique qui peut être associé à des processus neurodégénératifs en cas de dysfonctionnement de cette voie (Carro, 2006). L'entrée



de l'IGF1 à travers la barrière hémato-encéphalique se fait principalement dans le plexus choroïde et est régulé via la diminution de l'activité GSK3 qui régule son internalisation (Carro, 2005). Ainsi, les inhibiteurs de la GSK3 pourraient avoir un effet thérapeutique en normalisant la voie mTOR via l'augmentation de l'IGF1 au niveau du système nerveux central (Bolos et al. 2010).

Dans le cas où la diminution de la voie PI3K/mTOR dans les cellules malades aurait un effet protecteur de nombreuses approches pharmacologiques visant à augmenter/prolonger l'effet de l'inhibition de cette voie pourraient apporter une réponse thérapeutique. La rapamycine, que nous avons utilisée dans les expériences effectuées dans ce travail, est également un médicament (le sirolimus) de la famille de la cyclosporine largement utilisé en thérapeutique pour ces effets immunodépresseurs. Il est très lipophile et est capable de passer la membrane hématoencéphalique.

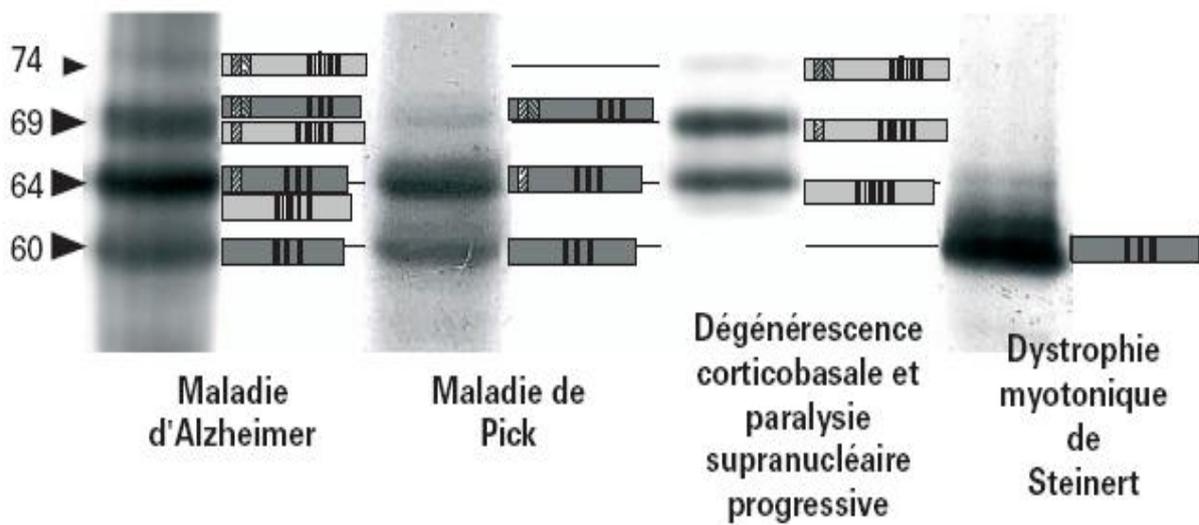
Dans chacun de ces deux cas, il semble toutefois nécessaire d'identifier plus précisément une cible thérapeutique en recherchant le mécanisme physiopathologique responsable de l'anomalie de la voie PI3K/mTOR spécifique à la DM1. En effet, la modulation pharmacologique d'une voie de signalisation aussi centrale pourrait avoir des effets pléiotropiques trop importants pour une utilisation thérapeutique adaptée à la DM1.



**Figure 77 : Les six isoformes de protéines Tau.**

Les rectangles noirs schématisent les domaines de liaison aux microtubules (R1-R4). Il existe trois isoformes à trois domaines de liaison aux microtubules et trois isoformes à quatre domaines de liaison.

(D'après Buée and Delacourte, 2006).



**Figure 78 : Le code barre électrophorétique de la protéine Tau dans différentes maladies neurodégénératives.**

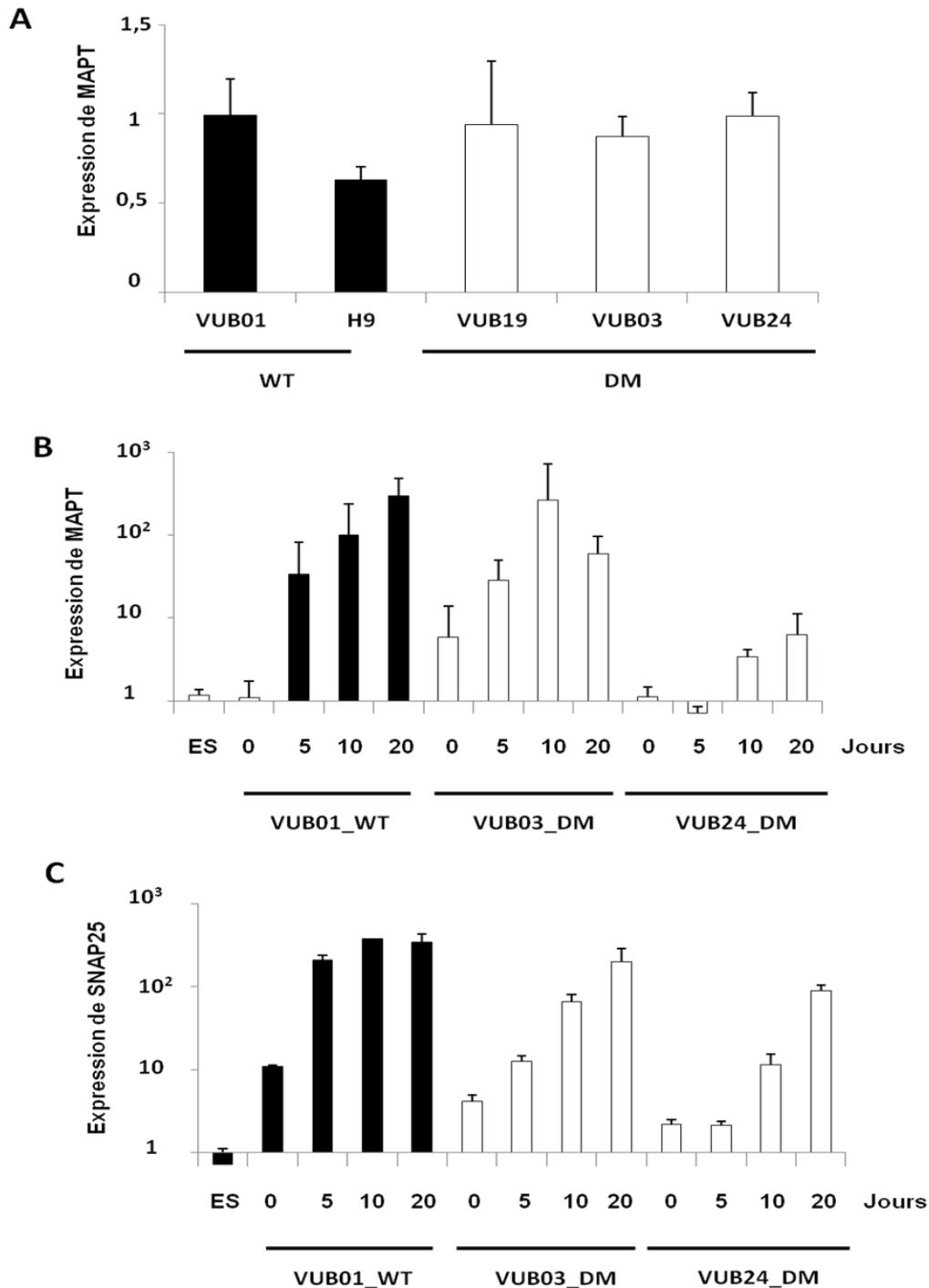
Les 6 isoformes hyperphosphorylées s'agrègent dans la maladie d'Alzheimer et présentent un profil électrophorétique de type triplet. Seules les isoformes E10- s'agrègent dans la maladie de Pick.

## 3.2 Étude de l'implication de la protéine Tau

### 3.2.1 Contexte scientifique

Dans la DM1, outre les symptômes musculaires, le système nerveux central est également touché à des degrés divers. Dans les formes les plus sévères de la maladie et en particulier dans les formes congénitales, les symptômes neurologiques sont majorés se traduisant par des troubles cognitifs, des troubles de la mémoire et du langage ainsi que de la représentation spatiale. Sur le plan anatomopathologique, il existe fréquemment une atrophie corticale du lobe frontal et temporal avec des lésions de la substance blanche. La possibilité d'un mécanisme neurodégénératif dans la DM1 notamment dans la région hippocampique et le lobe temporal a été évoquée par certaines études impliquant des anomalies de la protéine Tau. Celle-ci est connue pour être responsable de la dégénérescence neurofibrillaire observée dans la maladie d'Alzheimer ainsi que dans d'autres maladies neurodégénératives, regroupées sous le terme de tauopathies. En collaboration avec le Dr. Nicolas Sergeant et le Dr. Marie-Laure Caillet-Boudin de l'Unité INSERM U837 à Lille, nous avons décidé d'explorer plus précisément l'expression de cette protéine grâce à notre modèle cellulaire au stade cellules souches neurales (NSC) et au cours de la différenciation neuronale.

Le gène *MAPT* (Microtubule Associated Protein Tau), codant pour la protéine Tau, est localisé sur le chromosome 17 (locus 17q21). L'épissage alternatif conduit dans le système nerveux central à six ARN messagers qui diffèrent par différentes combinaisons inclusion/exclusion des exons 2/3 et 10 produisant six isoformes protéiques. L'exon 10 code pour des régions peptidiques de liaisons aux microtubules (les zones répétées R). Le rôle des séquences codées par les exon 2/3 est moins clair (Goedert et al., 1989; Wei et al., 2000). Une seule isoforme, la plus courte, est présente à la naissance et ne comporte pas de séquence codée par les exons 2, 3 et 10, il s'agit de l'isoforme fœtale de 352 acides aminés (aa). Après la naissance, les autres isoformes vont apparaître au cours du développement : [2-3-10+ (383 aa)], [2+3-10- (381 aa)], [2+3-10+ (412aa)], [2+3+10- (410 aa)] et [2+3+10+ (441 aa)] (**Figure 77**). Les différentes isoformes de Tau sont des protéines qui favorisent la polymérisation et la stabilisation des microtubules. Elles sont physiologiquement phosphorylées principalement sur des Sérine et Thréonine. Par contre, une hyperphosphorylation de ces sites et une phosphorylation sur des sites additionnels peuvent entraîner des modifications altérant les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles de la protéine qui peut alors devenir pathologique. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, les protéines Tau sont anormales et



**Figure 79 : Quantification de l'expression du gène MAPT/Tau par PCR quantitative.**

(A) Expression du gène *MAPT* (*Microtubule-Associated Protein Tau*) dans les cellules NSC des différentes lignées contrôles (VUB01\_WT et H9\_WT) et dans les lignées mutantes (VUB19\_DM ; VUB03\_DM et VUB24\_DM). (B) Expression du gène *MAPT* aux Jours 0 (J0), J5, J10 et J20 de la différenciation neuronale. J0 correspond au moment où l'on retire les facteurs mitogènes du milieu de culture des cellules NSC. ES : cellules hES indifférenciées de la lignée VUB01\_WT servant de référence interne. (C) Expression du gène *SNAP25* (*Synaptosomal-associated protein 25*) dont la modulation est corrélée avec l'apparition des neurones au cours du protocole de différenciation.

présentent des anomalies de phosphorylation qui conduisent à la formation de fibrilles constituées de filaments caractéristiques appelés paires de filaments appariés en hélice (PHF : *Paired Helical Filament*). Ces structures conduisent à la formation d'agrégats insolubles intra-neuronaux, responsables de la mort neuronale : on parle de dégénérescence neurofibrillaire (DNF). La caractérisation biochimique de ces filaments a été réalisée par Western Blot révélant que les 6 isoformes de Tau pouvaient être présentes dans ces structures. Le profil électrophorétique est également altéré, les isoformes hyperphosphorylées de Tau migrant à 55, 64 et 69kDa (=PHF-Tau). Ces profils électrophorétiques différents existent dans plusieurs maladies neurodégénératives, les tauopathies, incluant la DM1 et représentent un « code barre » spécifique à chacune de ces pathologies (**Figure 78**).

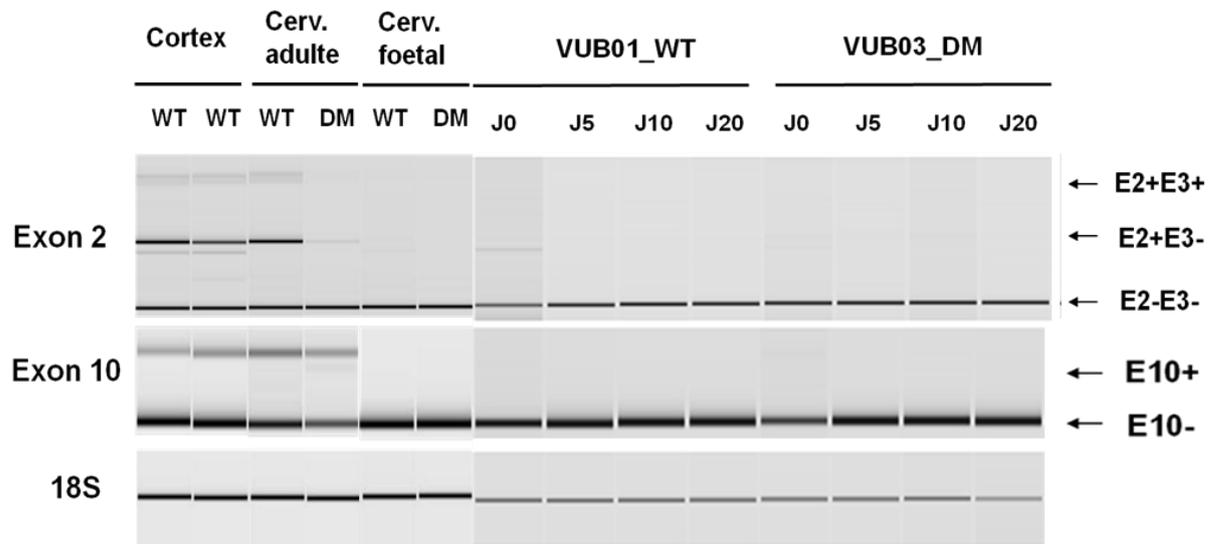
Le profil biochimique des protéines Tau dans la DM1 est tout à fait particulier avec une bande majeure à 60 kDa. Il a été rapporté dans le cerveau DM1 une exclusion des exons 2/3 (Sergeant et al., 2001), de l'exon 6 (Leroy et al., 2006b) et de l'exon 10 (Jiang et al., 2004). Il est vraisemblable que des facteurs ou régulateurs d'épissage soient captés au sein des expansions de triplet CUG conduisant à une dérégulation des mécanismes d'épissage. Ainsi, il a été montré récemment que ETR-3 (également appelé CUGBP2) favorise sélectivement l'exclusion de l'exon 2 (Leroy et al., 2006a). Le neurone va donc exprimer des isoformes de protéines Tau de façon différentielle et entrainer la DNF possiblement corrélée au déficit cognitif observé dans la DM1 (Modoni et al., 2008). Les mêmes observations ont été faites dans la Dystrophie Myotonique de type 2 (Maurage et al., 2005).

### ***3.2.2 Principaux résultats***

- **Expression de Tau dans les cellules NSC**

Nous avons tout d'abord analysé l'expression du gène *MAPT* codant Tau dans différentes lignées par PCR quantitative, en utilisant comme amorce des oligonucléotides permettant de détecter l'ensemble des isoformes de la protéine.

Au stade de cellules NSC, ce gène est relativement peu exprimé car les sorties de cycle sont de l'ordre de 30 dans des conditions standards. Cette analyse ne nous a pas permis de mettre en évidence de différence d'expression de ce gène entre les NSC de la lignée normale (VUB01\_WT) et les lignées mutantes (VUB03\_DM et VUB24\_DM) (**Figure 79A**).



**Figure 80 : Profil d'épissage des exons 2/3 et 10 du gène MAPT/Tau au cours de la différenciation en neurones.**

Exons 2/3 : les bandes correspondant à l'exclusion des 2 exons sont indiquées par E2-E3- ; E2+E3- signifie l'inclusion de l'exon 2 mais pas de l'exon 3 et E2+E3+ l'inclusion des deux exons. Le cas E2-E3+ est impossible car lorsqu'E2 est inclu E3 l'est aussi. Pour l'exon 10, E10- signifie l'absence de l'exon 10 et E10+ présence de l'exon 10. Les échantillons contrôles de cerveau correspondent à des échantillons de cortex, de cerveau adulte (commercial) et fœtal. Les échantillons provenant des 3 lignées (1 contrôle : VUB01\_WT et 2 mutantes : VUB03\_DM et VUB24\_DM) ont été préparés aux jours J0, J5, J10 et J20 de la cinétique de différenciation neuronale. Ces analyses sont réalisées par RT-PCR en utilisant des primers spécifiques suivie d'une migration des produits de PCR par électrophorèse capillaire sur puce Agilent.

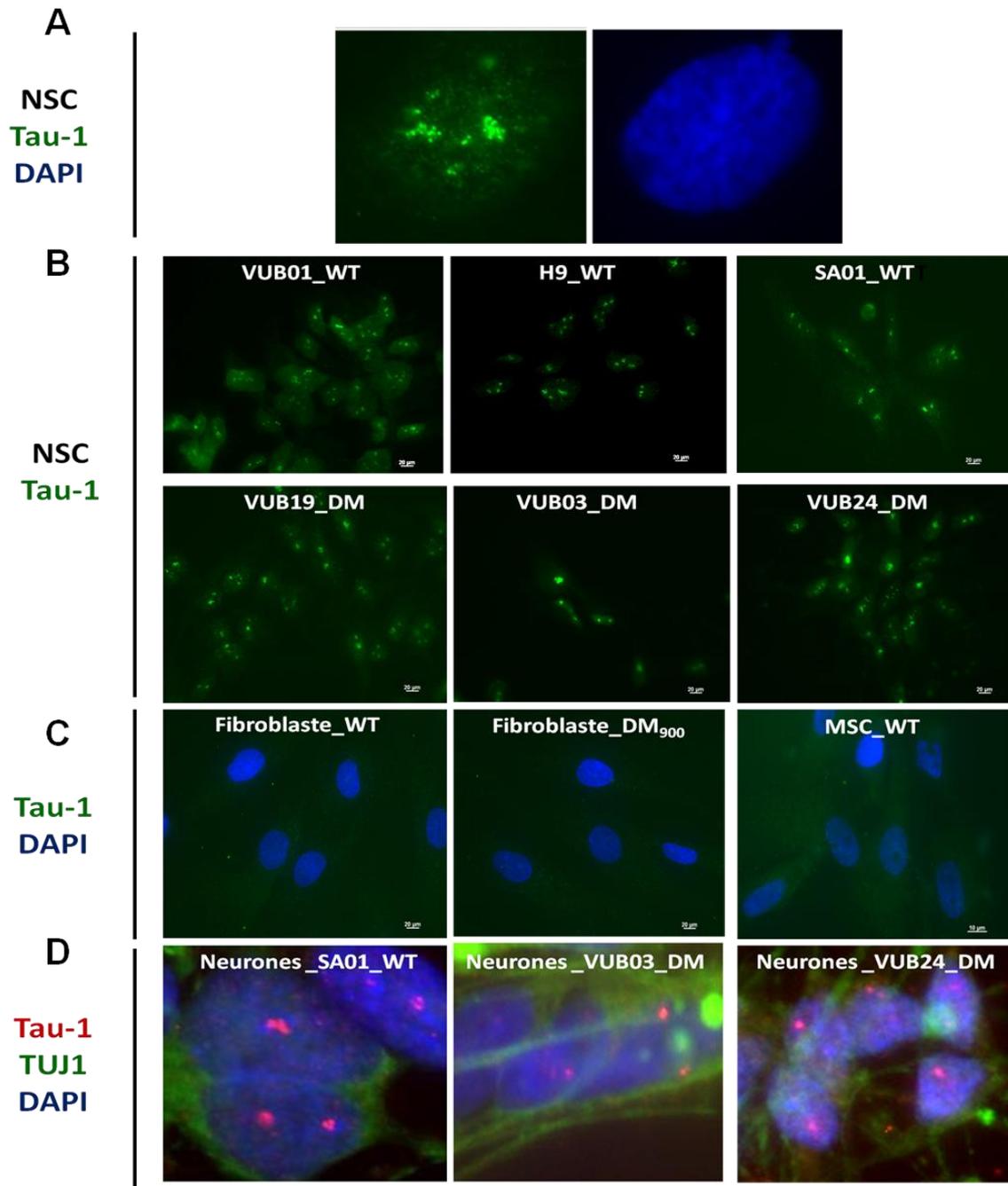
Nous avons également suivi l'expression du gène *MAPT* au cours de la différenciation neuronale (**Figure 79B**). Nous avons alors observé pour la lignée contrôle VUB01\_WT une forte augmentation de l'expression de Tau au cours du temps. Ces résultats sont retrouvés pour la lignée mutante VUB03\_DM à l'exception du temps à 20 jours où l'on note une faible diminution de l'expression du gène. En revanche, son expression est faiblement augmentée au cours de la différenciation en neurones des cellules NSC issues de la lignée VUB24\_DM. Le gène SNAP25 (Synaptosomal-associated protéin-25) dont l'expression est corrélée avec l'apparition des neurones en culture est utilisé comme contrôle de cette différenciation (**Figure 79C**).

- **Profil d'épissage de Tau dans les cellules NSC et au cours de la différenciation neuronale**

L'analyse de l'expression des exons 2/3 et 10 par RT-PCR a révélé que les cellules NSC normales (VUB01\_WT) et DM1 (VUB03\_DM et VUB24\_DM) présentaient l'exclusion de ces exons (**Figure 80**). Ce profil d'épissage correspond à celui décrit dans le cerveau fœtal humain mais aussi à celui des anomalies d'épissage de Tau observées dans les cerveaux adultes DM1. A ce stade de précurseurs neuraux, il n'est donc pas possible de détecter des différences entre les cellules NSC normales et mutantes. Au cours de la différenciation neuronale pendant 20 jours, le profil d'épissage est similaire à celui observé pour les cellules NSC et aucune inclusion des exons 2/3 et 10 de Tau n'a pu être détectée.

- **Expression de la protéine Tau dans les NSC et au cours de la différenciation neuronale**

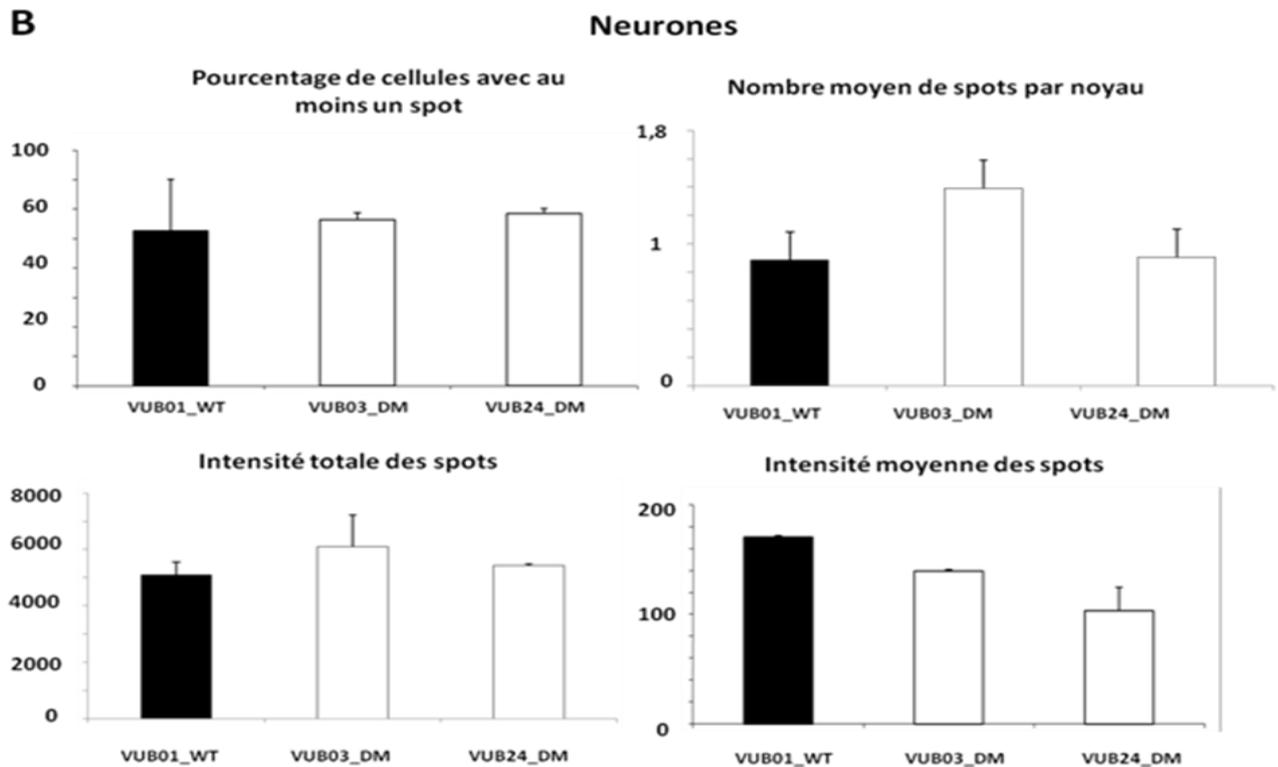
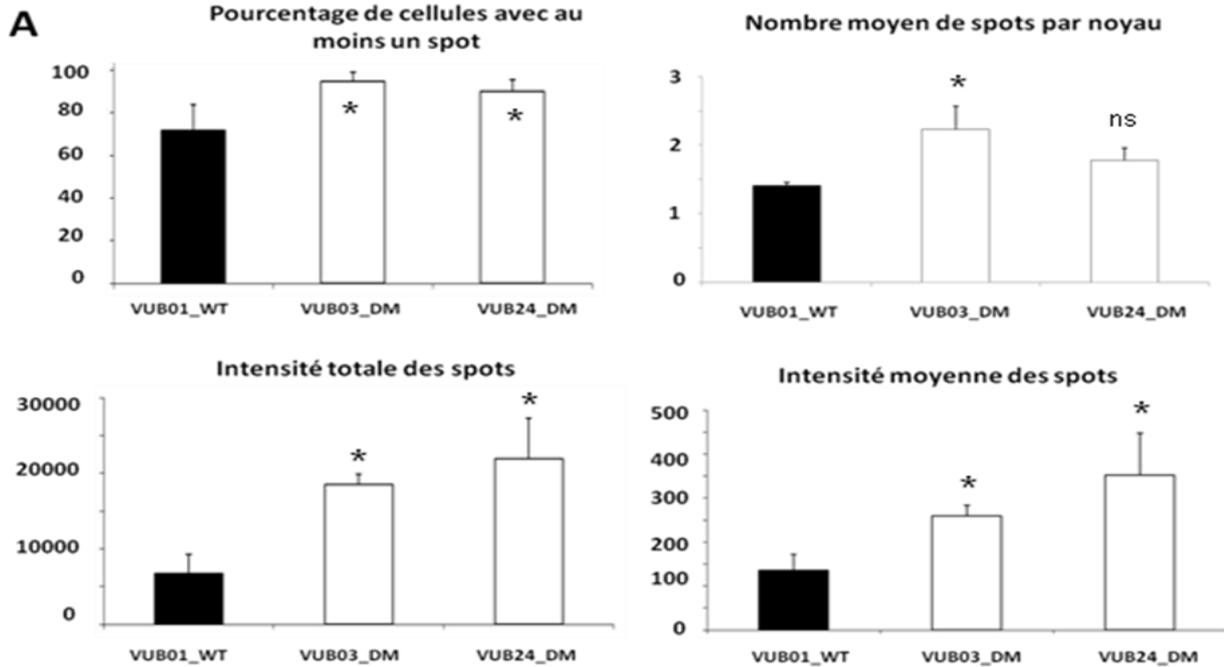
Nous avons ensuite poursuivi l'analyse de l'expression de Tau en immunomarquage dans les NSC en utilisant l'anticorps de souris monoclonal Tau-1 qui reconnaît un épitope non phosphorylé de la protéine entre les acides aminés 189 et 207. Nous avons observé un marquage ponctiforme nucléaire dans toutes les lignées NSC normales et mutantes que nous avons testées mais aussi dans les neurones (**Figure 81**). En revanche, ces accumulations nucléaires n'ont pas été détectées dans les fibroblastes ou dans les MPC. L'ensemble de ces résultats suggèrent que ces accumulations semblent liées au phénotype neural de ces cellules.



**Figure 81 : Localisation de la protéine Tau dans les cellules NSC, les neurones et des types cellulaires non neuronaux comme les cellules MPC et les fibroblastes provenant de cellules normales et pathologiques.**

Les accumulations nucléaires de la protéine Tau sont détectées par l'anticorps Tau-1 en vert ((A-C) ou en rouge (D). Les noyaux sont marqués par le DAPI. (A) grossissement d'un noyau de cellules NSC (lignée VUB01\_WT) montrant les accumulations de la protéine Tau dans les noyaux. (B) Présence d'accumulations nucléaires de la protéine Tau dans les lignées contrôles VUB01\_WT ; H9\_WT et SA01\_WT et les lignées mutantes VUB19\_DM ; VUB03\_DM et VUB24\_DM. (C) Absence d'accumulation de la protéine Tau nucléaire dans les fibroblastes normaux et DM1 (Fibroblaste\_DM<sub>900</sub> : Fibroblastes mutants contenant 900 répétitions CTG) et absence d'accumulation nucléaire dans les MSC WT (lignée VUB01\_WT). (D) Présence d'accumulation nucléaire de Tau (en rouge) dans les neurones détectés par l'anticorps TUJ1 (en vert).

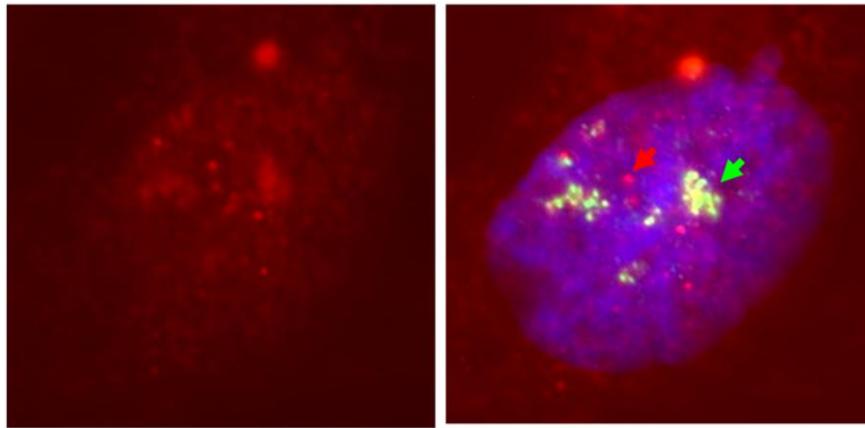
## Cellules souches neurales



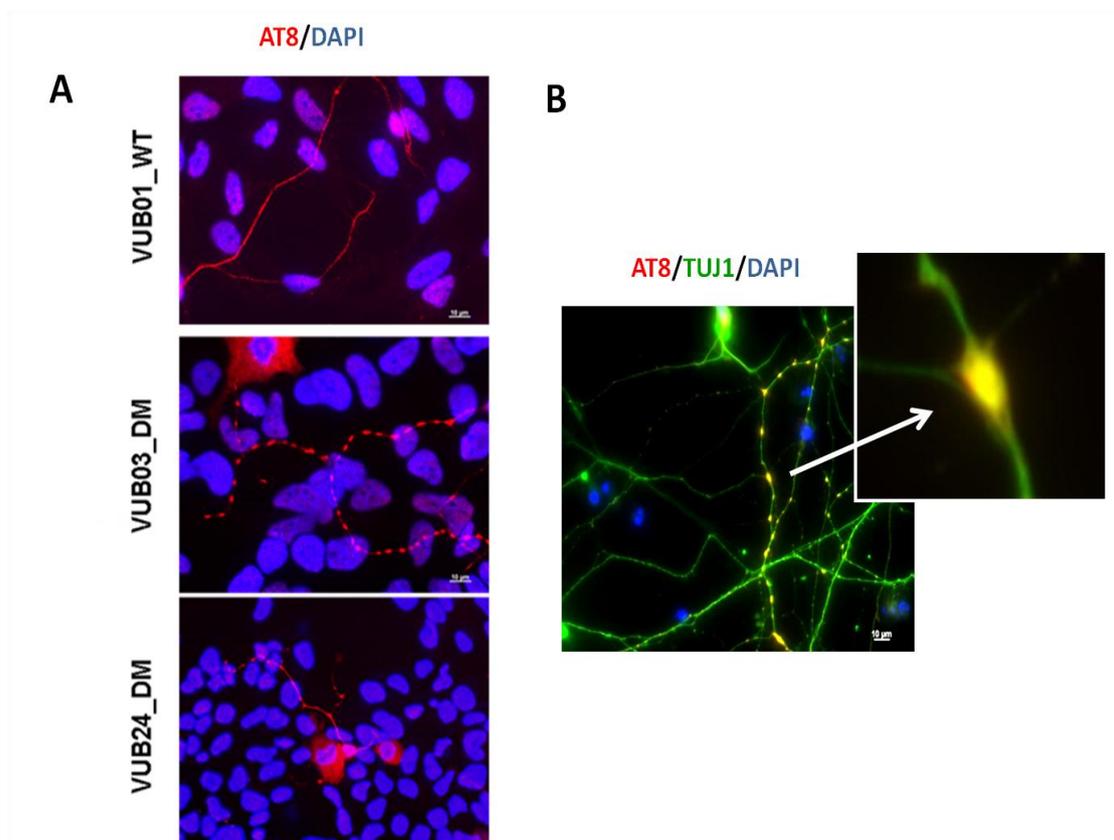
**Figure 82 : Etudes multiparamétriques des caractéristiques de l'accumulation de Tau nucléaire par l'Array-scan.**

(A) Dans les NSC. (B) Dans les neurones. (n=500 noyaux en triplicats par lignées ; t-test apparié \*p<0,05).

Foci/TAU-1/DAPI



**Figure 83 : Absence de co-localisation entre la protéine Tau et les accumulations nucléaires de la DMPK mutée sous forme de foci.** La protéine Tau est détectée par l'anticorps Tau-1 (en vert) et les foci par hybridation *in situ* (en rouge).



**Figure 84 : Localisation dans les neurites des cellules des lignées mutées VUB03\_DM et VUB24\_DM d'une forme phosphorylée de la protéine Tau.** La forme phosphorylée de la protéine Tau est reconnue par l'anticorps monoclonal AT8 (en rouge). Les neurites des neurones sont marquées avec l'anticorps TUJ1 (en vert).

Afin de poursuivre l'analyse de ces accumulations en recherchant des différences entre les NSC normales et mutantes, nous avons effectué une quantification de ces structures en utilisant l'Array Scan (**Figure 82A**). Cette analyse montre une augmentation du nombre et de l'intensité des spots entre les NSC des 2 lignées mutantes VUB03\_DM et VUB24\_DM et la lignée normale VUB01\_WT.

Nous avons également réalisé le même type d'analyse pour quantifier ces accumulations dans les neurones (**Figure 82B**). Cette quantification ne montre pas de différence du nombre et de l'intensité des spots entre les neurones normaux et mutants. En revanche, nous avons observé que la moitié seulement des neurones présentait ces accumulations de la protéine Tau nucléaire suggérant leur possible disparition au cours de la différenciation neuronale.

En nous basant sur certaines études qui avaient démontré que la protéine Tau pouvait reconnaître l'ADN, nous avons recherché une possible co-localisation entre la protéine Tau et les foci intranucléaires de l'ARNm muté. La **Figure 83** montre l'absence de co-localisation entre ces deux structures nucléaires.

- **Etude de la phosphorylation de la protéine Tau**

Comme cela a été décrit plus haut, il existe de nombreux sites de phosphorylation sur la protéine Tau. Nous avons réalisé l'analyse de l'expression des formes phosphorylées de Tau par immunomarquage, en utilisant l'anticorps monoclonal de souris AT8 qui reconnaît les épitopes Ser202/Thr205. Alors qu'aucun marquage n'a pu être mis en évidence au stade de cellules NSC, une forte expression de phospho-Tau a été observée dans le cytoplasme et les neurites des neurones (**Figure 84A**). De plus, nous avons noté la présence d'un marquage discontinu le long des neurites des neurones DM1 des lignées VUB03\_DM et VUB24\_DM qui n'est pas présent dans les neurones contrôles de la lignée VUB01\_WT (**Figure 84B**). Ce type de renflement neuritique (boursoufflure) évoque une possible souffrance neuronale de type axonopathie correspondant à une désorganisation microtubulaire.

Pour étudier la phosphorylation de la protéine Tau une autre approche, plus indirecte, consiste à analyser les kinases responsables de cette phosphorylation afin de mettre en évidence une possible hyperphosphorylation pouvant être reliée au mécanisme de neurodégénérescence.



Notre choix s'est porté sur la Glycogène Synthase Kinase 3 beta (GSK3) qui est une enzyme capable de phosphoryler le site reconnu par l'anticorps AT8 que nous avons utilisé dans les expériences d'immunomarquage présentées ci-contre (**Tableau 14**). De plus la phosphorylation de cette enzyme sur la sérine 9 (P-GSK3 $\beta$  Ser9) a été décrite pour être diminuée dans le cœur des souris DMPK  $-/-$  (Llagostera et al., 2007). Cette phosphorylation est inhibitrice de sorte que sa diminution reflète une augmentation de son activité, pouvant corrélérer avec une augmentation de la phosphorylation de la protéine Tau dans la DM1.

Par Western Blot, nous avons retrouvé cette diminution de l'expression de la P-GSK3 $\beta$  Ser9 dans les cellules NSC porteuses de la mutation DM1 par rapport aux cellules contrôles alors que l'expression de la GSK3 $\beta$  totale reste inchangée (**Figure 85A**). Enfin, lorsque les cellules NSC normales de la lignée VUB01\_WT sont nucléofectées par le plasmide contenant une répétition de 960 CTG (pCTG), une diminution l'expression de la P-GSK3 $\beta$  ser9 est également observée dans ces cellules (**Figure 85B et C**). Ce résultat permet donc de relier cette anomalie à la présence de la mutation dans les cellules DM1.

L'ensemble de ces résultats est cohérent avec l'hypothèse selon laquelle Tau est hyperphosphorylé dans la DM1 résultant de l'augmentation de l'activité de la GSK3.

### ***3.2.3. Discussion et perspectives***

Les cellules neurales (NSC et neurones) porteuses d'une anomalie génétique héritée naturellement, obtenues par différenciation guidée à partir des cellules hES, offrent la possibilité théorique de pouvoir étudier la dégénérescence neurofibrillaire liée à la protéine Tau impliquée dans le processus physiopathologique de nombreuses maladies génétiques incluant la DM1. Au cours de cette étude, nous avons principalement mis en évidence : (1) La présence de la protéine Tau dans le noyau des cellules NSC et des neurones normaux et mutants ; (2) L'accumulation d'une forme phosphorylée de la protéine Tau uniquement dans les neurites des neurones mutants évoquant une désorganisation microtubulaire ; (3) La diminution de la phosphorylation inhibitrice de la Sérine 9 de la GSK3 $\beta$  reflétant une augmentation de l'activité de l'enzyme.



- **Tau nucléaire dans les NSC et les neurones**

Les différentes isoformes de Tau sont des protéines de liaison aux microtubules, majoritairement cytoplasmiques, qui participent à leur stabilisation et à la polarité neuronale. Toutefois, plusieurs études ont décrit la présence de cette protéine dans le noyau de neurones humains en situation normale ou pathologique (Brady et al., 1995) ainsi que dans des lignées de neuroblastomes (Loomis et al., 1990; Tsukane et al., 2007) et dans des cellules de phénotype non-neuronal, comme les cellules HeLa (Rossi et al., 2008; Sjoberg et al., 2006).

Par ailleurs, il a été montré que les différents isoformes de la protéine tau étaient capables de reconnaître avec une forte affinité le sillon mineur de la molécule d'ADN double brin (Corces et al., 1980; Hua et al., 2003; Wei et al., 2008). Dans la cellule, ces isoformes de la protéine Tau s'accumulent pour former des structures qui co-localisent avec les régions fibrillaires denses du nucléole pendant l'interphase et avec les régions organisatrices du nucléole (NORs) pendant la mitose (Loomis et al., 1990; Thurston et al., 1996). Les NORs sont constitués par des séquences répétées d'hétérochromatine (séquence satellite  $\alpha$ ) localisées sur les bras courts des chromosomes acrocentriques adjacents aux centromères. Ces régions codent pour les ARN ribosomiaux.

Nous n'avons pas encore exploré de manière approfondie les conséquences de ces accumulations nucléaires de la protéine Tau détectées dans nos cellules mais nos résultats sont en accord avec ceux décrits dans la littérature mais mettent en évidence pour la première fois la présence de ces accumulations dans des cellules NSC. Aussi, il pourrait être intéressant de poursuivre leur caractérisation en situation normale et pathologique. En effet, même si le rôle de la protéine Tau dans le noyau est encore incertain, certaines études ont proposé son implication dans des mécanismes de protection contre la dénaturation de l'ADN en présence de DNase-I ou par la chaleur (Hua and He, 2003; Li et al., 2005a; Wei et al., 2008).

Nous avons retrouvé cette accumulation de tau nucléaire dans les cellules à la fois normales et mutantes pour la DM1 mais l'analyse quantitative a révélé une augmentation des accumulations de Tau dans les noyaux des cellules malades. Ceci pourrait être mis en relation avec un possible mécanisme de protection de l'intégrité de l'ADN dans les cellules NSC et les neurones mutants.



- **Accumulation de la forme phosphorylée de Tau dans les neurites.**

L'étude par immunohistochimie réalisée avec l'aide de l'anticorps AT8, un anticorps reconnaissant un épitope phosphorylé des formes normales et pathologiques de Tau (PHF-tau), a révélé la présence d'accumulation de cette protéine dans l'espace somato-dendritique des neurones mutants pour la DM1 entraînant une boursoufflure au niveau de l'axone. Ce marquage en « collier de perles » est très particulier et évoque des anomalies du transport axonal. Les protéines Tau peuvent inhiber le transport axonal rapide dans des modèles de culture cellulaire (Ebner et al., 1998; Mandelkow et al., 2003; Stamer et al., 2002). Le mécanisme est dû à la réduction de la fréquence d'attachement des protéines motrices (kinésines) aux microtubules mais la protéine n'a pas d'effet sur la vitesse ou la longueur de déplacement des kinésines une fois attachées aux microtubules (Seitz et al., 2002).

Dans les modèles animaux où la protéine Tau est sur-exprimée dans le système nerveux central, c'est-à-dire dans une situation reproduisant la présence d'une grande quantité de Tau phosphorylé, il y a presque toujours une axonopathie dans les neurones avec invariablement une dégénération axonale accompagnée de boursoufflures axonales (« axonal swellings ») contenant des éléments du cytosquelette (Ishihara et al., 1999; Probst et al., 2000; Spittaels et al., 1999). Dans ce mécanisme impliquant des anomalies de phosphorylation de la protéine Tau, il existe une perte de fonction de la protéine caractérisée par une diminution de la reconnaissance de certaines de ses isoformes avec les microtubules.

L'effet stabilisateur de la protéine serait alors perdu entraînant un défaut du transport axonal ainsi que des dysfonctions synaptiques. Cet effet peut se produire en l'absence de filaments de Tau et serait un événement précédent la mort neuronale. La découverte de ce type de marquage dans les neurones DM1 est un fait nouveau. Il serait intéressant suite à ce résultat d'analyser plus en détail cette anomalie en étudiant la désorganisation microtubulaire avec des anticorps dirigés contre la  $\beta$ -tubuline tyrosinée. Cette étude pourra être élargie par l'utilisation d'autres anticorps dirigés contre la forme phosphorylée de Tau dont l'AD2 qui reconnaît la sérine Ser396-404 à l'extrémité C-terminale de la protéine. Cet anticorps pourrait être particulièrement utile car il a été développé pour reconnaître les formes PHF-Tau, constituant ainsi un outil pour détecter les formes pathologiques de la protéine.

- **Implication de la protéine GSK3**



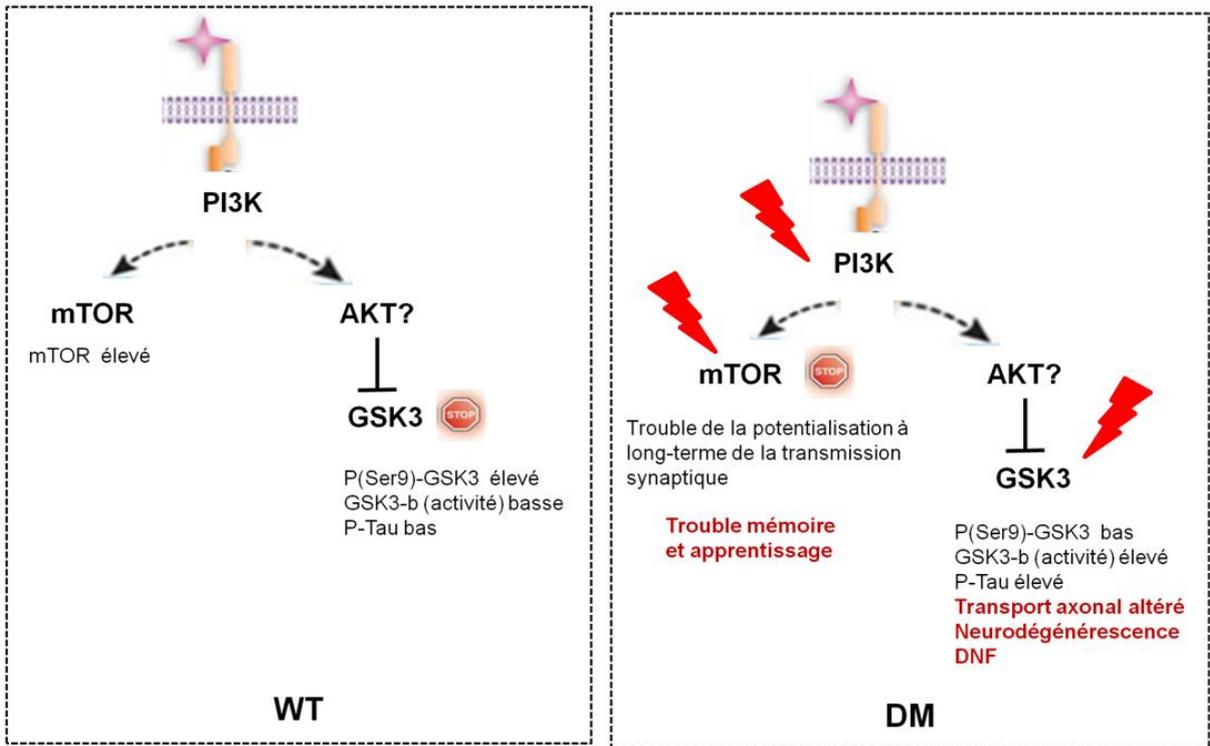
Un des rôles de la GSK3 dans les neurones consiste à moduler le transport antérograde rapide, mais pas le transport rétrograde, grâce à la phosphorylation des chaînes légères de la kinésine (Morfini, 2002). La kinésine est l'une des protéines motrices principales du système nerveux. Lorsqu'elle est inhibée par phosphorylation, le transport axonal général est très perturbé pouvant être responsable d'anomalies importantes dans les neurones. En effet, la nécessité pour les neurones d'échanger rapidement des informations entre des compartiments cellulaires éloignés fait de ce mécanisme un point clé de leur physiologie. Ainsi, la dérégulation de ces échanges pourrait être suffisante pour entraîner des neuropathies.

L'altération du transport axonal dans les neurones est impliquée dans plusieurs maladies neurodégénératives incluant le diabète neuropathique, la maladie d'Alzheimer, l'ALS et la maladie d'Huntington. Dans la maladie d'Alzheimer, les changements dans l'activité des kinases et le profil de phosphorylation de Tau impliquent spécifiquement la GSK3 (Cross et al., 1994; Baum, 1996; Cross et al., 1997; Eldar-Finkelman et al., 1999; Ishiguro et al., 1993; Mandelkow et al., 1992).

L'activité de la GSK3 peut être régulée par de multiples voies de signalisation, de sorte que de nombreuses hypothèses physiopathologiques peuvent expliquer l'altération de la phosphorylation de la kinésine dans les neurones et les anomalies de la motilité. Dans la DM1, la relation entre la pathologie et la dérégulation de la GSK3 n'est pas évidente mais comme nous l'avons déjà évoqué dans deux études, l'une dans des cellules PC12 et l'autre concernant la souris DMPK<sup>-/-</sup>, ont rapporté respectivement une augmentation de la phosphorylation de la protéine Tau et une diminution de la phosphorylation inhibitrice Ser9 de la GSK3.

Dans nos expériences, nous avons observé par PCR quantitative, une diminution de l'expression du gène DMPK dans les neurones mutants DM1 mais ce n'était pas le cas dans les cellules NSC (données non montrées). Par conséquent, cette observation n'est pas corrélée à la modulation de la GSK3 dans les cellules NSC. La diminution de l'expression de la DMPK n'est donc probablement pas impliquée dans l'hyperactivation de la GSK3. En revanche, l'équipe de Hernandez propose que la phosphorylation de la protéine Tau soit due à un mécanisme basé sur la toxicité en *trans* des répétitions CTG. Ainsi, si les deux événements, -sur-activation de la GSK3 et phosphorylation de Tau- sont corrélés, la présence de répétitions CTG dans les cellules devrait avoir un effet sur l'expression de la GSK3.

C'est ce que nous observons dans notre modèle où la nucléofection d'un plasmide contenant des répétitions CTG dans les cellules NSC normales entraîne une diminution de la P-GSK3 $\beta$  Ser9.



**Figure 86 : Hypothèse physiopathologique expliquant certaines anomalies neurologiques dans la DM1.**

Par ailleurs, la GSK3 semble être un bon candidat comme responsable de la phosphorylation de la protéine Tau (Doble and Woodgett, 2003). Elle est exprimée à haut niveau dans le cerveau (Woodgett, 1990) où elle est localisée dans les neurones (Leroy and Brion, 1999). Lorsque cette protéine kinase est surexprimée dans les cellules, le niveau de phosphorylation de Tau augmente de manière considérable (Cho and Johnson, 2003; Lovestone et al., 1996). Une faible modulation de l'ordre de 20 à 50% serait suffisante pour moduler la phosphorylation de Tau (Spittaels et al., 2000; Lucas et al., 2001). Un autre argument vient de la diminution significative de la phosphorylation médiée par le chlorure de lithium, un inhibiteur spécifique de la GSK3 $\beta$  (reviewed by Jope, 2003), à la fois dans les cellules Hong et al., 1997; Lovestone et al., 1999; Stambolic et al., 1996) mais aussi dans des modèles animaux comme le modèle de souris où une protéine tau mutante est surexprimée (FTDP-17 mutant) (Perez et al., 2003). Ces données montrent que la protéine Tau est un substrat de la GSK3 $\beta$  aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* et que sa phosphorylation anormale par la GSK3 peut engendrer un processus pathologique.

### 3.3 Conclusions

L'ensemble des données présentées ci-dessus, obtenues dans un modèle cellulaire original de cellules souches neurales mutantes pour la DM1, suggère une altération de deux protéines impliquées dans deux voies de signalisation cellulaire différentes, la voie mTOR et la voie de la GSK3.

La voie de la PI3K que nous avons identifiée comme responsable du signal d'activation de la voie mTOR dans les cellules NSC normales et qui est également impliquée en amont de la GSK3 pourrait être la cause d'une dérégulation commune à ces deux voies avec les conséquences délétères diverses que nous avons présentées précédemment (**Figure 86**).

Les perspectives générales de ce travail seront de confirmer la pertinence de ces données dans les neurones dérivés des NSC mais aussi dans d'autres modèles de DM1, incluant des modèles animaux, en particulier ceux où des anomalies neurologiques ont pu être mises en évidence.

En conclusion, ces résultats apportent des arguments en faveur d'une nouvelle hypothèse mécanistique permettant de progresser dans la compréhension des mécanismes neurologiques intervenant dans la DM1 qui reste encore à ce jour mal connue.



## **Discussion et conclusion générale**

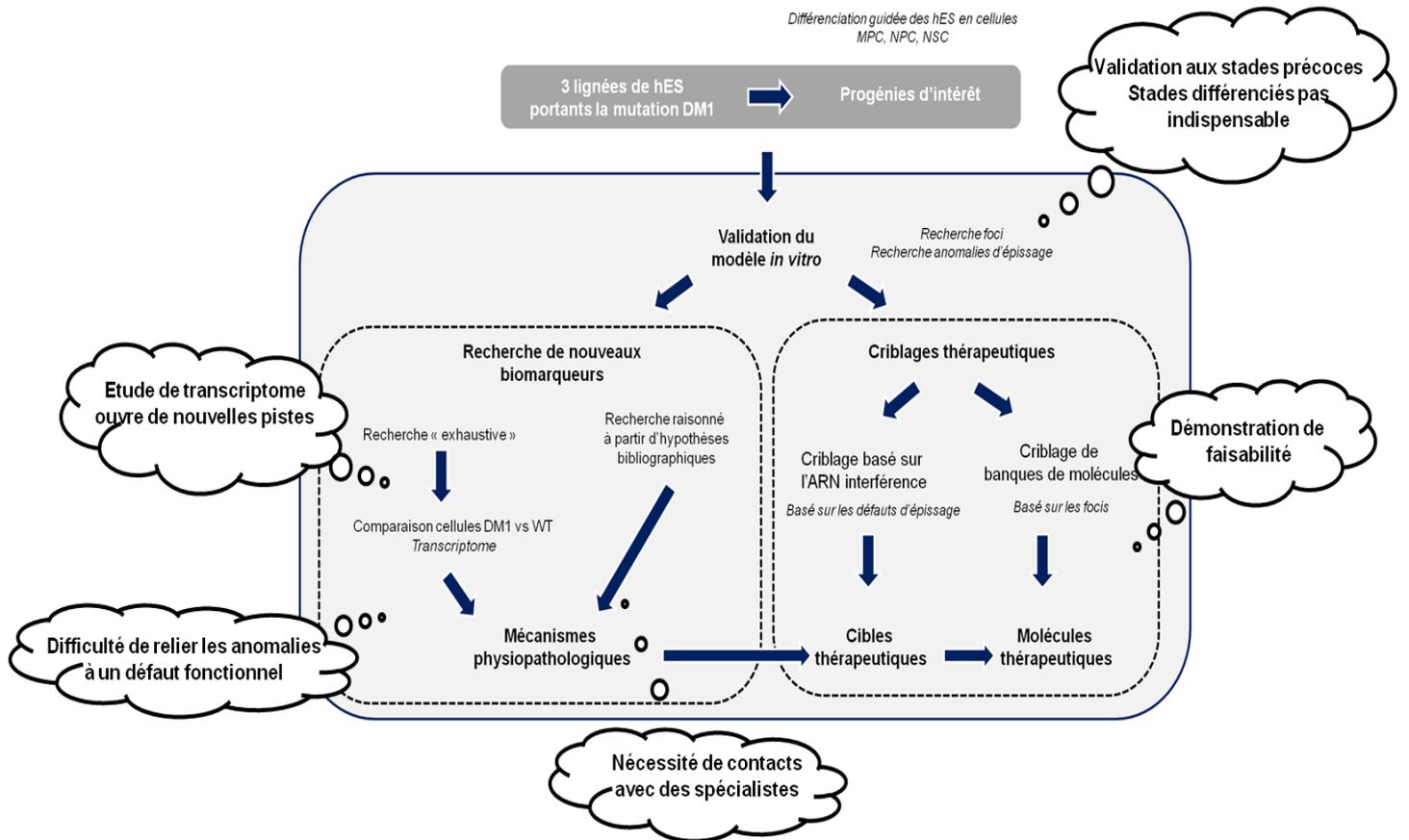


Figure 87 : Expérience aqise au cours du projet de Modélisation pathologique de la DM1.

L'utilisation des cellules souches pluripotentes pour de nouvelles approches thérapeutiques est une technologie naissante qui est actuellement en plein développement. Parmi les applications possibles, l'approche de modélisation pathologique d'une maladie monogénique que nous avons décrite dans cette thèse représente un paradigme nouveau.

L'expérience que nous avons acquise pendant les cinq ans de travaux réalisés à I-STEM dans le cadre de la modélisation pathologique de la DM1 permet d'apporter des éléments de réflexion sur l'intérêt et les limites d'une telle approche.

## **I. La modélisation pathologique de la DM1 par les cellules souches pluripotentes : qu'avons nous appris ?**

En se basant sur les étapes du schéma présentant la stratégie générale du projet, nous proposons de commenter les avancées réalisées et les difficultés rencontrées (**Figure 87**).

### **1.1. Validation du modèle**

Au début de ce projet, nous pensions que l'impossibilité de pouvoir guider la différenciation des cellules hES vers un phénotype musculaire, le tissu le plus affecté par la maladie, pourrait représenter un obstacle majeur entraînant une impossibilité d'observer les anomalies liées à la pathologie. Nous avons démontré que ce point n'était pas indispensable à la poursuite du projet puisque l'ensemble des cellules mutantes à l'état indifférencié ou après différenciation guidée vers un phénotype de progéniteurs mésenchymateux ou neuraux présentaient les foci pathognomoniques.

L'étude de l'épissage nous a appris qu'en fonction du phénotype mésenchymateux ou neural, il a été possible d'identifier la présence de l'anomalie d'épissage du récepteur de l'insuline (dans les MPC) ou son absence (dans les NSC et NPC). Ceci illustre la possibilité à partir d'une même source cellulaire, les cellules hES, d'établir des sous modèles de la maladie en fonction du type de lignage obtenu *in vitro* et ainsi de pouvoir étudier différents aspects de la maladie. Cela est particulièrement adapté au cas des maladies multisystémiques.

De plus, nous avons montré avec la DM1 qu'il était possible de reproduire dans des cellules « très jeunes », c'est-à-dire dès les premiers stades du développement, des anomalies et leurs conséquences physiopathologiques simulant à l'identique ce qu'il se passait dans les cellules adultes de patients, validant ainsi ce modèle cellulaire.



## 1.2. Recherche de nouveaux biomarqueurs

L'obtention de biomarqueurs, déjà connus ou de nouveaux biomarqueurs, est une étape décisive de la recherche de cibles thérapeutiques permettant à la fois d'étudier les mécanismes moléculaires et d'identifier par criblages HTS des molécules pouvant servir à l'élaboration de nouveaux médicaments. Dans notre projet, en plus des deux biomarqueurs connus dans la pathologie, nous avons choisi d'identifier de nouveaux biomarqueurs en menant en parallèle deux stratégies complémentaires, l'approche dite guidée par la ressource et celle guidée par l'hypothèse. L'avantage principal d'une approche guidée par la ressource est de faire une étude exhaustive sans *a priori* pour identifier de nouveaux acteurs impliqués dans la pathologie. L'approche par transcriptome que nous avons menée en comparant les profils d'expression des cellules normales et mutantes à différents stades de développement a permis d'identifier des nouveaux gènes candidats biomarqueurs pour la DM1. L'hypothèse associée à l'identification de gènes dont l'expression est modulée dans les cellules mutantes est la possibilité que ceux-ci puissent refléter un mécanisme toxique ou au contraire un mécanisme de compensation lié à l'expression de la mutation. Cette stratégie est potentiellement très puissante car elle permet d'extraire de la masse d'informations que représente les modulations simultanées de près de 25.000 gènes celles pouvant être reliées à la présence de la mutation. Il est important de signaler cependant que certains gènes candidats identifiés par cette approche se révéleront être des faux-positifs et reflètent des modulations indépendantes de cette mutation. En effet, ces modulations peuvent refléter des différences entre les lignées ou de l'état physiologique des cellules comme par exemple la réponse aux conditions de culture. Une seconde difficulté intrinsèque à notre système est que la différenciation des cellules hES vers un phénotype différencié est accompagnée de la modulation de plusieurs centaines, voir de milliers de gènes, ce que nous avons montré dans l'article I. Il est donc extrêmement important de s'assurer que les populations cellulaires utilisées pour ce type d'étude sont dépourvues de cellules correspondant à des états de maturation différente qui engendreraient des différences d'expression génique. Dans notre cas, les modulations d'expression observées entre les cellules normales et mutantes aux différents stades ne concernaient qu'un nombre de gènes très restreint, moins de 100, ce qui laissait penser que nous étions dans des conditions expérimentales permettant d'observer le phénomène recherché. Dans toutes études transcriptomiques, il est nécessaire de valider la robustesse des modulations géniques



observées. Une PCR quantitative permet de confirmer les résultats mais uniquement sur le plan technique. La validation de la modulation de ces biomarqueurs sur plusieurs lignées mutantes est également nécessaire.

D'autre part, il est indispensable d'introduire une autre approche permettant de relier ces variations d'expression à la présence de la mutation. Il peut s'agir d'échantillons provenant de biopsies de patients lorsqu'ils sont accessibles ou des modèles de perte ou de gain de fonction.

Nous avons ainsi validé une partie de nos résultats dans un modèle de gain de fonction dans lequel était introduite dans les cellules normales une expansion de 960 CTG permettant de mimer la mutation DM1. La liste des gènes modulés que nous avons retenue se limitait à une quinzaine de gènes déterminant ainsi un nombre de biomarqueurs candidats de la DM1 accessibles à une étude plus approfondie.

Une des difficultés majeures à laquelle nous nous sommes trouvés confrontés dans ce type d'approche a été de faire le lien entre la modulation de ces gènes et un phénotype pathologique sous-jacent. Cela est particulièrement vrai pour des gènes dont la fonction n'est pas connue comme le facteur de transcription ZNF37A<sup>††</sup> qui a demandé un investissement considérable de la part des chercheurs dans le développement d'outils permettant son exploration. Par contre, pour des gènes dont la fonction était mieux définie comme la cathepsine B ou le gène SLITRK, nous avons pu établir une corrélation entre la modulation du gène et un phénotype, respectivement la présence de vacuoles cytoplasmiques suggérant l'induction d'un mécanisme autophagique et l'augmentation du réseau neuritique<sup>††</sup>.

Ce type d'approche exhaustive à partir de populations cellulaires parfaitement définies permet donc d'identifier des biomarqueurs potentiels totalement nouveaux et de les relier à un phénotype pathologique ouvrant ainsi des nouvelles pistes pour la compréhension des mécanismes de la maladie. En revanche, il est souhaitable de combiner cette approche avec celle basée sur l'hypothèse. La recherche de phénotypes informatifs peut alors être facilitée si elle se fonde sur des données solides publiées dans la littérature et des connaissances approfondies de la pathologie.

---

<sup>††</sup> Ce gène a été identifié comme fortement modulé dans les ES, MPC et NPC mutant par rapport au contrôle (Voir Tableau 13)

<sup>††</sup> Ce travail fait l'objet d'un article soumis pour lequel je suis co-signataire.



Les progrès des technologies basées sur l'utilisation des cellules hES ou d'iPS vont élargir à un grand nombre de maladies génétiques l'accès à la modélisation pathologique. Il sera alors indispensable d'établir des collaborations entre les laboratoires spécialisés dans la biotechnologie des cellules souches comme I-STEM et des consortiums d'experts pour chacune des pathologies étudiées.

### **1.3. Criblage par l'utilisation des cellules souches pluripotentes**

La plateforme de criblage à haut débit développée à I-STEM couplée à un système cellulaire innovant offrant une solution de systématisation des procédés permet d'imaginer des programmes de criblages sur des maladies monogéniques qui sont par définition des maladies orphelines qui intéressent peu l'industrie pharmaceutique.

Comme nous l'avons brièvement décrit dans les résultats, nous avons apporté la preuve de concept que les cellules souches porteuses d'une mutation pouvaient être utilisées pour des criblages HTS. Nous avons ainsi criblé une banque de molécules et identifiés des composés potentiellement thérapeutiques<sup>§§</sup>. Nous avons également identifié par une autre approche de génomique fonctionnelle utilisant des siRNA (*Small interfering RNA*) (extinction) de possibles "portes d'entrée" dans la maladie permettant de proposer des cibles thérapeutiques. Ces deux stratégies ont été validées sur le plan technologique sur des cribles pilotes et les équipes concernées se préparent pour des cribles de plus grande taille respectivement de plusieurs dizaines de milliers de molécules pour le criblage thérapeutique et l'extinction « *genome wide* » pour l'approche de génomique fonctionnelle.

En résumé, l'ensemble des travaux réalisés à d'I-STEM a fait la preuve du concept que l'on pouvait effectuer une modélisation pathologique d'une maladie génétique. La question est maintenant de savoir si ce concept que nous avons établi pour la DM1 est généralisable à l'ensemble des maladies monogéniques.

---

<sup>§§</sup> Voir la partie 2.3 des résultats. Ces résultats font l'objet d'un travail collaboratif impliquant plusieurs équipes du laboratoire et un article est en préparation pour lequel je suis co-signataire.



## **II. Modélisation pathologique par les cellules souches pluripotentes : vers une généralisation du concept ?**

Les premières limitations de cette généralisation viennent du fait que l'accès aux lignées de cellules hES mutantes soit restreint d'une part par les indications du diagnostic pré-implantatoire mais aussi par des questions d'ordre éthique. La génération de cellules iPS spécifiques de patients que nous avons présentée lors de la revue bibliographique et qui possède des propriétés très proches des cellules hES, devrait permettre de contourner ces deux limitations<sup>\*\*\*</sup>.

Par contre si au moins en théorie, toutes les maladies sont potentiellement modélisables, certaines de part leurs caractéristiques peuvent présenter un choix intéressant ou au contraire des limitations.

- **Les maladies où il n'y a pas de modèles animaux disponibles**

Les modèles de souris transgéniques ont apporté et continueront d'apporter des informations pertinentes sur la physiopathologie des maladies, y compris chez l'Homme. Cependant, malgré un haut niveau d'homologie génétique existant entre la souris et l'Homme, certains modèles de souris échouent à reproduire ou ne reproduisent que partiellement le ou les phénotypes de la maladie humaine. De nombreux exemples existent, comme par exemple le cas de l'anémie de Fanconi. Il s'agit d'une maladie autosomique récessive caractérisée par une aplasie de la moelle osseuse, des anomalies congénitales touchant le squelette avec une pigmentation de la peau et une malformation de l'appareil urinaire (Alter, 1996). D'un point de vue moléculaire, la mutation responsable de la maladie entraîne des anomalies de réparation de l'ADN. Les animaux modèles de la maladie reproduisent ces défauts moléculaires, mais il n'y a pas d'aplasie de la moelle osseuse qui représente l'anomalie centrale de la maladie (Chen et al.,

---

<sup>\*\*\*</sup> Dans le cas de la DM1, les équipes des Drs. Yacine Laâbi et Mathilde Girard ont d'ores et déjà pu obtenir au laboratoire I-STEM plusieurs clones iPS mutants pour la DM1 par reprogrammation de fibroblastes de malades. Dans notre équipe, nous avons ensuite pu les différencier en progéniteurs mésenchymateux qui présentent des foci et reproduisent les anomalies du récepteur à l'insuline récepteur.



1996). Aussi, la possibilité de différencier les cellules hES ou les iPS mutantes en cellules progénitrices hématopoïétiques offrirait la possibilité d'étudier cette anomalie. Un deuxième exemple est celui du syndrome de Lesch Nyhan. Dans ce cas, des cellules hES normales ont été modifiées en introduisant une mutation dans le gène causal de la maladie, le gène *HPRT1* (Urbach and Benvenisty, 2009; Zwaka and Thomson, 2003). Il s'agit d'un déficit génétique impliquant l'enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyltransférase entraînant une accumulation d'acide urique et un retard de développement avec hypotonie généralisée de l'enfant. Dans le cas de cette maladie, il n'existe pas de modèle animaux murins car l'acide urique est métabolisé différemment chez la souris. Ainsi le modèle de cellules hES qui reproduit cette augmentation d'acide urique en mimant la maladie observée chez les patients peut permettre de d'étudier la physiopathologie de ce syndrome.

En ce qui concerne les maladies neurodégénératives, ce sont généralement des maladies difficiles à modéliser car, pour plusieurs d'entre elles, les animaux mutants ne reproduisent pas de phénotype pathologique. Par exemple, les animaux portant des mutations associées aux formes familiales de la maladie de Parkinson, ne reproduisent pas la perte sélective de neurones dopaminergiques de la substance noire. Dans l'atrophie musculaire spinale (SMA), la pathogénèse nécessite la co-expression de deux gènes *SMN1* et *SMN2*, ce dernier étant absent des modèles de souris.

Comme nous l'avons mentionné dans la revue bibliographique, les premières lignées iPS générées à partir de fibroblastes de patients ont concerné précisément ce type de maladies neurodégénératives dont l'Atrophie spinale musculaire (SMA) (Ebert et al., 2009), l'amyotrophie sclérosante latérale (ALS) (Dimos et al., 2008) et la maladie de Parkinson (PD) (Soldner et al., 2009). Cependant, ces premiers travaux n'ont pas permis de mettre en évidence de phénotypes pathognomoniques de ces maladies. Par exemple dans le cas de la maladie de Parkinson, il n'y avait pas dans les neurones de corps de Lewy, les inclusions caractéristiques de cette maladie (Soldner et al., 2009).

- **Les maladies monogéniques d'apparition tardive**

Ces premiers éléments amènent à réfléchir sur la pertinence de l'utilisation de cellules d'origine embryonnaire pour modéliser des maladies de l'adulte.

En utilisant les cellules hES dans le cas de la DM1, nous avons pu observer la présence de foci dans la lignée VUB19\_DM qui présente moins de 1000 CTG, mimant les mécanismes



intervenant dans la forme classique de la maladie dont les symptômes cliniques n'apparaissent que tardivement. Ceci suggère que les manifestations toxiques débutent dès les premiers stades du développement. Le corolaire est que l'on peut imaginer l'existence de mécanisme de protection mis en place dans la cellule pour lutter contre les effets délétères de la mutation et que l'apparition de la maladie soit en réalité le résultat d'une décompensation de ces systèmes.

L'identification de tels mécanismes pourrait offrir des solutions thérapeutiques à visée préventive dans ce type de maladie

Par contre, en ce qui concerne les iPS, on sait maintenant qu'au cours de la reprogrammation, bien que l'information génétique ne soit pas modifiée, le processus s'accompagne d'un « effacement » de la signature épigénétique des fibroblastes malades. Ces cellules, ainsi reprogrammées dans un état embryonnaire, ne seraient alors pas toujours associées aux mêmes mécanismes pathologiques que la cellule à l'état adulte. Ces observations ont conduit certains auteurs à considérer que les maladies génétiques héréditaires à pénétrance élevée et d'apparition précoce seraient plus faciles à modéliser que les maladies de survenue tardive (« Late onset disease ») (Yamanaka, 2009).

- **Les maladies monogéniques altérant le développement embryonnaire**

Le modèle de cellules souches embryonnaires représente certainement une opportunité unique pour la modélisation des anomalies du développement humain causées par une mutation. Comme nous l'avons décrit dans la revue bibliographique, il existe de nombreux arguments qui permettent de considérer que les cellules hES -et on peut penser qu'il en est de même avec les cellules iPS- reproduisent *in vitro* les stades précoces du développement. Une seule étude a été rapportée à ce jour et concerne les changements épigénétiques intervenant dans le contexte du syndrome de l'X fragile (Eiges et al., 2007). Ce syndrome résulte de l'inactivation du gène *FMRI* due à l'expansion de triplet CGG dans la région 5'UTR du gène. Les événements responsables de l'inhibition de *FMRI* n'ont pas été complètement élucidés notamment à cause de l'absence de modèle animal ou cellulaire. Ce modèle reproduit au cours de la différenciation des cellules hES la diminution pathologique du gène accompagnée par des anomalies épigénétiques et permet ainsi de disséquer la séquence des événements accompagnant ces modifications. Cette étude pose les bases de cette preuve de concept.



Les maladies associées à des malformations congénitales ont pour la plupart une cause génétique<sup>†††</sup> et concernent le plus souvent des mutations sur des gènes du développement. Il est vraisemblable que les cellules pluripotentes humaines mutantes pour l'un de ces gènes puissent participer à une meilleure dissection des mécanismes physiopathologiques mis en jeu.

- **Autres méthodes innovantes de modélisation pathologique : les neurones induits (iN)**

Très récemment, une nouvelle stratégie, les neurones induits, a été développée et pourrait constituer une alternative pour l'obtention de neurones mutants. Dans cette approche, les fibroblastes de patients ont été reprogrammés en neurones sans passage par un stade « embryonnaire ». Le principe est basé sur une approche similaire à celle mise au point pour obtenir les iPS. Les fibroblastes sont transduits par des constructions lentivirales et des neurones peuvent être générés de cette façon. Cette étude est intéressante mais préliminaire et les rendements sont relativement faibles nécessitant de recommencer la manipulation à chaque fois que l'on a besoin de neurones mutants. Sur le plan conceptuel, en revanche, cette reprogrammation de fibroblastes adultes vers des neurones adultes pourrait permettre de détecter plus facilement des phénotypes pathologiques dans les maladies d'apparition tardive.

Comme nous l'avons décrit tout au long de cette thèse, les cellules souches embryonnaires et maintenant les cellules souches pluripotentes induites possèdent des propriétés uniques ouvrant des perspectives à plus ou moins long terme. Parmi, les applications en plein développement, l'utilisation de ce type de cellules comme outil biologique pour l'étude des maladies génétiques et dans le cycle de recherche de nouveaux médicaments offrira très certainement un moyen d'industrialisation des procédés permettant de faire progresser d'autant plus rapidement la recherche sur ce sujet et d'offrir à ces malades des solutions thérapeutiques.

---

<sup>†††</sup> Hors causes environnementales, iatrogéniques ou tératogéniques



## **Bibliographie**



Aasen, T., Raya, A., Barrero, M. J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilic, 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.

Adeyemi, O., Aflatoonian, B., Ahrlund-Richter, L., Amit, M., Andrews, P. W., Beighton, G., Bello, P. A., Benvenisty, N., Berry, L. S., Bevan, S., *et al.* (2007). Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol* 25, 803-816.

Adrian, R. H., and Bryant, S. H. (1974) On the repetitive discharge in myotonic muscle fibres.

Agarwal, S., Holton, K. L., and Lanza, R. (2008). Efficient differentiation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 26, 1117-1127.

Alper, J. (2009). Geron gets green light for human trial of ES cell-derived product. *Nat Biotechnol* 27, 213-214.

Alter, B. P. (1996). Fanconi's anemia and malignancies. *Am J Hematol* 53, 99-110.

Alwazzan, M., Newman, E., Hamshere, M. G., and Brook, J. D. (1999). Myotonic dystrophy is associated with a reduced level of RNA from the DMWD allele adjacent to the expanded repeat. *Hum Mol Genet* 8, 1491-1497.

Amabile, G., and Meissner, A. (2009). Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends Mol Med* 15, 59-68.

Amack, J. D., Paguio, A. P., and Mahadevan, M. S. (1999). Cis and trans effects of the myotonic dystrophy (DM) mutation in a cell culture model. *Hum Mol Genet* 8, 1975-1984.

Amit, M., Carpenter, M. K., Inokuma, M. S., Chiu, C. P., Harris, C. P., Waknitz, M. A., Itskovitz-Eldor, J., and Thomson, J. A. (2000). Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 227, 271-278.

Andrews, P. W. (1998). Teratocarcinomas and human embryology: pluripotent human EC cell lines. Review article. *Apms* 106, 158-167; discussion 167-158.

Armstrong, L., Lako, M., Lincoln, J., Cairns, P. M., and Hole, N. (2000). mTert expression correlates with telomerase activity during the differentiation of murine embryonic stem cells. *Mech Dev* 97, 109-116.

Assady, S., Maor, G., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., Skorecki, K. L., and Tzukerman, M. (2001). Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 50, 1691-1697.

Assou, S., Le Carrouer, T., Tondeur, S., Strom, S., Gabelle, A., Marty, S., Nadal, L., Pantesco, V., Reme, T., Hugnot, J. P., *et al.* (2007). A meta-analysis of human embryonic stem cells transcriptome integrated into a web-based expression atlas. *Stem Cells* 25, 961-973.

Aubry, L., Bugi, A., Lefort, N., Rousseau, F., Peschanski, M., and Perrier, A. L. (2008). Striatal progenitors derived from human ES cells mature into DARPP32 neurons in vitro and in quinolinic acid-lesioned rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 16707-16712.

Avery, S., Zafarana, G., Gokhale, P. J., and Andrews, P. W. The Role of SMAD4 in Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Stem Cell Fate. *Stem Cells*.

Bachoud-Levi, A. C. (2009). Neural grafts in Huntington's disease: viability after 10 years. *Lancet Neurol* 8, 979-981.

Baharvand, H., Hashemi, S. M., Kazemi Ashtiani, S., and Farrokhi, A. (2006). Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro. *Int J Dev Biol* 50, 645-652.

Barberi, T., Willis, L. M., Socci, N. D., and Studer, L. (2005). Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. *PLoS Med* 2, e161.



- Barker, N., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2008). The intestinal stem cell. *Genes Dev* 22, 1856-1864.
- Barton, E. R., Morris, L., Musaro, A., Rosenthal, N., and Sweeney, H. L. (2002). Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *J Cell Biol* 157, 137-148.
- Ben-Yosef, D., Malcov, M., and Eiges, R. (2008). PGD-derived human embryonic stem cell lines as a powerful tool for the study of human genetic disorders. *Mol Cell Endocrinol* 282, 153-158.
- Bernstein, B. E., Mikkelsen, T. S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D. J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., *et al.* (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125, 315-326.
- Bernstein, E., Kim, S. Y., Carmell, M. A., Murchison, E. P., Alcorn, H., Li, M. Z., Mills, A. A., Elledge, S. J., Anderson, K. V., and Hannon, G. J. (2003). Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 35, 215-217.
- Berul, C. I., Maguire, C. T., Aronovitz, M. J., Greenwood, J., Miller, C., Gehrman, J., Housman, D., Mendelsohn, M. E., and Reddy, S. (1999). DMPK dosage alterations result in atrioventricular conduction abnormalities in a mouse myotonic dystrophy model. *J Clin Invest* 103, R1-7.
- Bhakta, D., Lowe, M. R., and Groh, W. J. (2004). Prevalence of structural cardiac abnormalities in patients with myotonic dystrophy type I. *Am Heart J* 147, 224-227.
- Blackburn, E. H. (1991). Structure and function of telomeres. *Nature* 350, 569-573.
- Blin, G., Nury, D., Stefanovic, S., Neri, T., Guillevic, O., Brinon, B., Bellamy, V., Rucker-Martin, C., Barbry, P., Bel, A., *et al.* A purified population of multipotent cardiovascular progenitors derived from primate pluripotent stem cells engrafts in postmyocardial infarcted nonhuman primates. *J Clin Invest*.
- Bolos, M., Fernandez, S., and Torres-Aleman, I. Oral administration of a GSK3 inhibitor increases brain insulin-like growth factor I levels. *J Biol Chem* 285, 17693-17700.
- Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., *et al.* (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122, 947-956.
- Boyer, L. A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L. A., Lee, T. I., Levine, S. S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M. K., *et al.* (2006). Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 441, 349-353.
- Brady, R. M., Zinkowski, R. P., and Binder, L. I. (1995). Presence of tau in isolated nuclei from human brain. *Neurobiol Aging* 16, 479-486.
- Brimble, S. N., Zeng, X., Weiler, D. A., Luo, Y., Liu, Y., Lyons, I. G., Freed, W. J., Robins, A. J., Rao, M. S., and Schulz, T. C. (2004). Karyotypic stability, genotyping, differentiation, feeder-free maintenance, and gene expression sampling in three human embryonic stem cell lines derived prior to August 9, 2001. *Stem Cells Dev* 13, 585-597.
- Brook, J. D., McCurrach, M. E., Harley, H. G., Buckler, A. J., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V. P., Thirion, J. P., Hudson, T., and *et al.* (1992). Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 68, 799-808.
- Brunner, H. G., Bruggenwirth, H. T., Nillesen, W., Jansen, G., Hamel, B. C., Hoppe, R. L., de Die, C. E., Howeler, C. J., van Oost, B. A., Wieringa, B., and *et al.* (1993). Influence of sex of the transmitting parent as well as of parental allele size on the CTG expansion in myotonic dystrophy (DM). *Am J Hum Genet* 53, 1016-1023.



- Bushati, N., and Cohen, S. M. (2007). microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 175-205.
- Buxton, J., Shelbourne, P., Davies, J., Jones, C., Van Tongeren, T., Aslanidis, C., de Jong, P., Jansen, G., Anvret, M., Riley, B., and et al. (1992). Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy. *Nature* 355, 547-548.
- Buyalos, R. P., Jackson, R. V., Grice, G. I., Hockings, G. I., Torpy, D. J., Fox, L. M., Boots, L. R., and Azziz, R. (1998). Androgen response to hypothalamic-pituitary-adrenal stimulation with naloxone in women with myotonic muscular dystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 3219-3224.
- Byrne, J. A., Pedersen, D. A., Clepper, L. L., Nelson, M., Sanger, W. G., Gokhale, S., Wolf, D. P., and Mitalipov, S. M. (2007). Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* 450, 497-502.
- Cai, J., Zhao, Y., Liu, Y., Ye, F., Song, Z., Qin, H., Meng, S., Chen, Y., Zhou, R., Song, X., et al. (2007). Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology* 45, 1229-1239.
- Calhoun, J. D., Rao, R. R., Warrenfeltz, S., Rekaya, R., Dalton, S., McDonald, J., and Stice, S. L. (2004). Transcriptional profiling of initial differentiation events in human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 323, 453-464.
- Candi, E., Dinsdale, D., Rufini, A., Salomoni, P., Knight, R. A., Mueller, M., Krammer, P. H., and Melino, G. (2007). TAp63 and DeltaNp63 in cancer and epidermal development. *Cell Cycle* 6, 274-285.
- Carango, P., Noble, J. E., Marks, H. G., and Funanage, V. L. (1993). Absence of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) mRNA as a result of a triplet repeat expansion in myotonic dystrophy. *Genomics* 18, 340-348.
- Carpenter, M. K., Inokuma, M. S., Denham, J., Mujtaba, T., Chiu, C. P., and Rao, M. S. (2001). Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells. *Exp Neurol* 172, 383-397.
- Carpenter, M. K., Rosler, E. S., Fisk, G. J., Brandenberger, R., Ares, X., Miura, T., Lucero, M., and Rao, M. S. (2004). Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system. *Dev Dyn* 229, 243-258.
- Carrera, A. C. (2004). TOR signaling in mammals. *J Cell Sci* 117, 4615-4616.
- Cazillis, M., Rasika, S., Mani, S., Gressens, P., and Lelievre, V. (2006). In vitro induction of neural differentiation of embryonic stem (ES) cells closely mimics molecular mechanisms of embryonic brain development. *Pediatr Res* 59, 48R-53R.
- 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.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113, 643-655.
- Chambers, S. M., Fasano, C. A., Papapetrou, E. P., Tomishima, M., Sadelain, M., and Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol* 27, 275-280.
- Charlet, B. N., Savkur, R. S., Singh, G., Philips, A. V., Grice, E. A., and Cooper, T. A. (2002). Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol Cell* 10, 45-53.
- Chen, H. Y., Kathirvel, P., Yee, W. C., and Lai, P. S. (2009). Correction of dystrophin myotonia type 1 pre-mRNA transcripts by artificial trans-splicing. *Gene Ther* 16, 211-217.



Chen, M., Tomkins, D. J., Auerbach, W., McKerlie, C., Youssoufian, H., Liu, L., Gan, O., Carreau, M., Auerbach, A., Groves, T., *et al.* (1996). Inactivation of Fac in mice produces inducible chromosomal instability and reduced fertility reminiscent of Fanconi anaemia. *Nat Genet* *12*, 448-451.

Chin, M. H., Mason, M. J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsumyan, G., Aimiwu, O., Richter, L., Zhang, J., *et al.* (2009). Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell* *5*, 111-123.

Cho, D. H., Thienes, C. P., Mahoney, S. E., Analau, E., Filippova, G. N., and Tapscott, S. J. (2005). Antisense transcription and heterochromatin at the DM1 CTG repeats are constrained by CTCF. *Mol Cell* *20*, 483-489.

Cho, J. H., and Johnson, G. V. (2003). Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates tau at both primed and unprimed sites. Differential impact on microtubule binding. *J Biol Chem* *278*, 187-193.

Chung, S., Shin, B. S., Hedlund, E., Pruszek, J., Ferree, A., Kang, U. J., Isacson, O., and Kim, K. S. (2006). Genetic selection of sox1GFP-expressing neural precursors removes residual tumorigenic pluripotent stem cells and attenuates tumor formation after transplantation. *J Neurochem* *97*, 1467-1480.

Ciceri, F., Bonini, C., Gallo-Stampino, C., and Bordignon, C. (2005). Modulation of GvHD by suicide-gene transduced donor T lymphocytes: clinical applications in mismatched transplantation. *Cytotherapy* *7*, 144-149.

Collins, C. A., Olsen, I., Zammit, P. S., Heslop, L., Petrie, A., Partridge, T. A., and Morgan, J. E. (2005). Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* *122*, 289-301.

Conti, L., and Cattaneo, E. Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities? *Nat Rev Neurosci* *11*, 176-187.

Corces, V. G., Manso, R., De La Torre, J., Avila, J., Nasr, A., and Wiche, G. (1980). Effects of DNA on microtubule assembly. *Eur J Biochem* *105*, 7-16.

Cortes, J. L., Sanchez, L., Catalina, P., Cobo, F., Bueno, C., Martinez-Ramirez, A., Barroso, A., Cabrera, C., Ligerio, G., Montes, R., *et al.* (2008). Whole-blastocyst culture followed by laser drilling technology enhances the efficiency of inner cell mass isolation and embryonic stem cell derivation from good- and poor-quality mouse embryos: new insights for derivation of human embryonic stem cell lines. *Stem Cells Dev* *17*, 255-267.

Cowan, C. A., Atienza, J., Melton, D. A., and Eggan, K. (2005). Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* *309*, 1369-1373.

Cross, D. A., Alessi, D. R., Vandenheede, J. R., McDowell, H. E., Hundal, H. S., and Cohen, P. (1994). The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor 1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf. *Biochem J* *303* (Pt 1), 21-26.

Cross, D. A., Watt, P. W., Shaw, M., van der Kaay, J., Downes, C. P., Holder, J. C., and Cohen, P. (1997). Insulin activates protein kinase B, inhibits glycogen synthase kinase-3 and activates glycogen synthase by rapamycin-insensitive pathways in skeletal muscle and adipose tissue. *FEBS Lett* *406*, 211-215.

Cudia, P., Bernasconi, P., Chiodelli, R., Mangiola, F., Bellocci, F., Dello Russo, A., Angelini, C., Romeo, V., Melacini, P., Politano, L., *et al.* (2009). Risk of arrhythmia in type I myotonic dystrophy: the role of clinical and genetic variables. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *80*, 790-793.

D'Amour, K. A., Bang, A. G., Eliazar, S., Kelly, O. G., Agulnick, A. D., Smart, N. G., Moorman, M. A., Kroon, E., Carpenter, M. K., and Baetge, E. E. (2006). Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* *24*, 1392-1401.



- Dansithong, W., Wolf, C. M., Sarkar, P., Paul, S., Chiang, A., Holt, I., Morris, G. E., Branco, D., Sherwood, M. C., Comai, L., *et al.* (2008). Cytoplasmic CUG RNA foci are insufficient to elicit key DM1 features. *PLoS One* 3, e3968.
- Davis, B. M., McCurrach, M. E., Taneja, K. L., Singer, R. H., and Housman, D. E. (1997). Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7388-7393.
- Day, J. W., Roelofs, R., Leroy, B., Pech, I., Benzow, K., and Ranum, L. P. (1999). Clinical and genetic characteristics of a five-generation family with a novel form of myotonic dystrophy (DM2). *Neuromuscul Disord* 9, 19-27.
- de Haro, M., Al-Ramahi, I., De Gouyon, B., Ukani, L., Rosa, A., Faustino, N. A., Ashizawa, T., Cooper, T. A., and Botas, J. (2006). MBNL1 and CUGBP1 modify expanded CUG-induced toxicity in a *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 15, 2138-2145.
- de Lange, T. (2002). Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* 21, 532-540.
- DeJong, E. S., Luy, B., and Marino, J. P. (2002). RNA and RNA-protein complexes as targets for therapeutic intervention. *Curr Top Med Chem* 2, 289-302.
- Delorme, B., Ringe, J., Pontikoglou, C., Gaillard, J., Langonne, A., Sensebe, L., Noel, D., Jorgensen, C., Haupl, T., and Charbord, P. (2009). Specific lineage-priming of bone marrow mesenchymal stem cells provides the molecular framework for their plasticity. *Stem Cells* 27, 1142-1151.
- Dhaenens, C. M., Schraen-Maschke, S., Tran, H., Vingtdoux, V., Ghanem, D., Leroy, O., Delplanque, J., Vanbrussel, E., Delacourte, A., Vermersch, P., *et al.* (2008). Overexpression of MBNL1 fetal isoforms and modified splicing of Tau in the DM1 brain: two individual consequences of CUG trinucleotide repeats. *Exp Neurol* 210, 467-478.
- Dhar, A., and Lahue, R. S. (2008). Rapid unwinding of triplet repeat hairpins by Srs2 helicase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 36, 3366-3373.
- Dimos, J. T., Rodolfa, K. T., Niakan, K. K., Weisenthal, L. M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G. F., Saphier, G., Leibel, R., Golland, R., *et al.* (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321, 1218-1221.
- Ding, V., Choo, A. B., and Oh, S. K. (2006). Deciphering the importance of three key media components in human embryonic stem cell cultures. *Biotechnol Lett* 28, 491-495.
- Do, J. T., and Scholer, H. R. Cell fusion-induced reprogramming. *Methods Mol Biol* 636, 179-190.
- Doble, B. W., and Woodgett, J. R. (2003). GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* 116, 1175-1186.
- Du, H., Cline, M. S., Osborne, R. J., Tuttle, D. L., Clark, T. A., Donohue, J. P., Hall, M. P., Shiue, L., Swanson, M. S., Thornton, C. A., and Ares, M., Jr. Aberrant alternative splicing and extracellular matrix gene expression in mouse models of myotonic dystrophy. *Nat Struct Mol Biol* 17, 187-193.
- Du, L., and Gatti, R. A. (2009). Progress toward therapy with antisense-mediated splicing modulation. *Curr Opin Mol Ther* 11, 116-123.
- Duan, Y., Catana, A., Meng, Y., Yamamoto, N., He, S., Gupta, S., Gambhir, S. S., and Zern, M. A. (2007). Differentiation and enrichment of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells in vitro and in vivo. *Stem Cells* 25, 3058-3068.
- Dvash, T., Ben-Yosef, D., and Eiges, R. (2006). Human embryonic stem cells as a powerful tool for studying human embryogenesis. *Pediatr Res* 60, 111-117.



- Dvash, T., Mayshar, Y., Darr, H., McElhaney, M., Barker, D., Yanuka, O., Kotkow, K. J., Rubin, L. L., Benvenisty, N., and Eiges, R. (2004). Temporal gene expression during differentiation of human embryonic stem cells and embryoid bodies. *Hum Reprod* *19*, 2875-2883.
- Ebert, A. D., Yu, J., Rose, F. F., Jr., Mattis, V. B., Lorson, C. L., Thomson, J. A., and Svendsen, C. N. (2009). Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* *457*, 277-280.
- Ebneth, A., Godemann, R., Stamer, K., Illenberger, S., Trinczek, B., and Mandelkow, E. (1998). Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J Cell Biol* *143*, 777-794.
- Ebralidze, A., Wang, Y., Petkova, V., Ebralidse, K., and Junghans, R. P. (2004). RNA leaching of transcription factors disrupts transcription in myotonic dystrophy. *Science* *303*, 383-387.
- Eiges, R., Schuldiner, M., Drukker, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., and Benvenisty, N. (2001). Establishment of human embryonic stem cell-transfected clones carrying a marker for undifferentiated cells. *Curr Biol* *11*, 514-518.
- Eiges, R., Urbach, A., Malcov, M., Frumkin, T., Schwartz, T., Amit, A., Yaron, Y., Eden, A., Yanuka, O., Benvenisty, N., and Ben-Yosef, D. (2007). Developmental study of fragile X syndrome using human embryonic stem cells derived from preimplantation genetically diagnosed embryos. *Cell Stem Cell* *1*, 568-577.
- Eiselleova, L., Peterkova, I., Neradil, J., Slaninova, I., Hampl, A., and Dvorak, P. (2008). Comparative study of mouse and human feeder cells for human embryonic stem cells. *Int J Dev Biol* *52*, 353-363.
- Eldar-Finkelman, H., Schreyer, S. A., Shinohara, M. M., LeBoeuf, R. C., and Krebs, E. G. (1999). Increased glycogen synthase kinase-3 activity in diabetes- and obesity-prone C57BL/6J mice. *Diabetes* *48*, 1662-1666.
- Elkabetz, Y., Panagiotakos, G., Al Shamy, G., Socci, N. D., Tabar, V., and Studer, L. (2008). Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes Dev* *22*, 152-165.
- Endoh, M., Endo, T. A., Endoh, T., Fujimura, Y., Ohara, O., Toyoda, T., Otte, A. P., Okano, M., Brockdorff, N., Vidal, M., and Koseki, H. (2008). Polycomb group proteins Ring1A/B are functionally linked to the core transcriptional regulatory circuitry to maintain ES cell identity. *Development* *135*, 1513-1524.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2008). Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* *132*, 9-14.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., Nishihara, T., Rehwinkel, J., Fauser, M., and Izaurralde, E. (2009). Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *Rna* *15*, 21-32.
- Fardaei, M., Larkin, K., Brook, J. D., and Hamshere, M. G. (2001). In vivo co-localisation of MBNL protein with DMPK expanded-repeat transcripts. *Nucleic Acids Res* *29*, 2766-2771.
- Fardaei, M., Rogers, M. T., Thorpe, H. M., Larkin, K., Hamshere, M. G., Harper, P. S., and Brook, J. D. (2002). Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Hum Mol Genet* *11*, 805-814.
- Farh, K. K., Grimson, A., Jan, C., Lewis, B. P., Johnston, W. K., Lim, L. P., Burge, C. B., and Bartel, D. P. (2005). The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* *310*, 1817-1821.
- Faustino, N. A., and Cooper, T. A. (2005). Identification of putative new splicing targets for ETR-3 using sequences identified by systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Mol Cell Biol* *25*, 879-887.



- Foiry, L., Dong, L., Savouret, C., Hubert, L., te Riele, H., Junien, C., and Gourdon, G. (2006). Msh3 is a limiting factor in the formation of intergenerational CTG expansions in DM1 transgenic mice. *Hum Genet* *119*, 520-526.
- Forner, F., Furlan, S., and Salvatori, S. Mass spectrometry analysis of complexes formed by myotonic dystrophy protein kinase (DMPK). *Biochim Biophys Acta* *1804*, 1334-1341.
- French, A. J., Adams, C. A., Anderson, L. S., Kitchen, J. R., Hughes, M. R., and Wood, S. H. (2008). Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts. *Stem Cells* *26*, 485-493.
- Friedrich Ben-Nun, I., and Benvenisty, N. (2006). Human embryonic stem cells as a cellular model for human disorders. *Mol Cell Endocrinol* *252*, 154-159.
- Frisch, R., Singleton, K. R., Moses, P. A., Gonzalez, I. L., Carango, P., Marks, H. G., and Funanage, V. L. (2001). Effect of triplet repeat expansion on chromatin structure and expression of DMPK and neighboring genes, SIX5 and DMWD, in myotonic dystrophy. *Mol Genet Metab* *74*, 281-291.
- Frumkin, T., Malcov, M., Telias, M., Gold, V., Schwartz, T., Azem, F., Amit, A., Yaron, Y., and Ben-Yosef, D. Human embryonic stem cells carrying mutations for severe genetic disorders. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* *46*, 327-336.
- Fu, Y. H., Friedman, D. L., Richards, S., Pearlman, J. A., Gibbs, R. A., Pizzuti, A., Ashizawa, T., Perryman, M. B., Scarlato, G., Fenwick, R. G., Jr., and et al. (1993). Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy. *Science* *260*, 235-238.
- Fu, Y. H., Pizzuti, A., Fenwick, R. G., Jr., King, J., Rajnarayan, S., Dunne, P. W., Dubel, J., Nasser, G. A., Ashizawa, T., de Jong, P., and et al. (1992). An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* *255*, 1256-1258.
- Furling, D., Doucet, G., Langlois, M. A., Timchenko, L., Belanger, E., Cossette, L., and Puymirat, J. (2003). Viral vector producing antisense RNA restores myotonic dystrophy myoblast functions. *Gene Ther* *10*, 795-802.
- Gambaro, K., Aberdam, E., Virolle, T., Aberdam, D., and Rouleau, M. (2006). BMP-4 induces a Smad-dependent apoptotic cell death of mouse embryonic stem cell-derived neural precursors. *Cell Death Differ* *13*, 1075-1087.
- Garcia-Castro, J., Trigueros, C., Madrenas, J., Perez-Simon, J. A., Rodriguez, R., and Menendez, P. (2008). Mesenchymal stem cells and their use as cell replacement therapy and disease modelling tool. *J Cell Mol Med* *12*, 2552-2565.
- Ghanem, D., Tran, H., Dhaenens, C. M., Schraen-Maschke, S., Sablonniere, B., Buee, L., Sergeant, N., and Caillet-Boudin, M. L. (2009). Altered splicing of Tau in DM1 is different from the foetal splicing process. *FEBS Lett* *583*, 675-679.
- Glass, D. J. PI3 Kinase Regulation of Skeletal Muscle Hypertrophy and Atrophy. *Curr Top Microbiol Immunol*.
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Jakes, R., Rutherford, D., and Crowther, R. A. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* *3*, 519-526.
- Gonzalez, R., Jennings, L. L., Knuth, M., Orth, A. P., Klock, H. E., Ou, W., Feuerhelm, J., Hull, M. V., Koesema, E., Wang, Y., et al. Screening the mammalian extracellular proteome for regulators of embryonic human stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 3552-3557.
- Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P., and Pevny, L. (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* *39*, 749-765.



- Griggs, R. C., Jozefowicz, R., Kingston, W., Nair, K. S., Herr, B. E., and Halliday, D. (1990). Mechanism of muscle wasting in myotonic dystrophy. *Ann Neurol* 27, 505-512.
- Groh, W. J., Groh, M. R., Saha, C., Kincaid, J. C., Simmons, Z., Ciafaloni, E., Pourmand, R., Otten, R. F., Bhakta, D., Nair, G. V., *et al.* (2008). Electrocardiographic abnormalities and sudden death in myotonic dystrophy type 1. *N Engl J Med* 358, 2688-2697.
- Guenou, H., Nissan, X., Larcher, F., Feteira, J., Lemaitre, G., Saidani, M., Del Rio, M., Barrault, C. C., Bernard, F. X., Peschanski, M., *et al.* (2009). Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. *Lancet* 374, 1745-1753.
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., *et al.* (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302, 415-419.
- Halliday, D., Ford, G. C., Edwards, R. H., Rennie, M. J., and Griggs, R. C. (1985). In vivo estimation of muscle protein synthesis in myotonic dystrophy. *Ann Neurol* 17, 65-69.
- Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C. W., Meissner, A., Cassady, J. P., Beard, C., Brambrink, T., Wu, L. C., Townes, T. M., and Jaenisch, R. (2007). Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 318, 1920-1923.
- Harley, H. G., Brook, J. D., Rundle, S. A., Crow, S., Reardon, W., Buckler, A. J., Harper, P. S., Housman, D. E., and Shaw, D. J. (1992a). Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic dystrophy. *Nature* 355, 545-546.
- Harley, H. G., Rundle, S. A., Reardon, W., Myring, J., Crow, S., Brook, J. D., Harper, P. S., and Shaw, D. J. (1992b). Unstable DNA sequence in myotonic dystrophy. *Lancet* 339, 1125-1128.
- Harris, T. E., Albrecht, J. H., Nakanishi, M., and Darlington, G. J. (2001). CCAAT/enhancer-binding protein- $\alpha$  cooperates with p21 to inhibit cyclin-dependent kinase-2 activity and induces growth arrest independent of DNA binding. *J Biol Chem* 276, 29200-29209.
- Hartshorne, D. J., Ito, M., and Erdodi, F. (1998). Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *J Muscle Res Cell Motil* 19, 325-341.
- Hashem, V. I., Pytlos, M. J., Klysik, E. A., Tsuji, K., Khajavi, M., Ashizawa, T., and Sinden, R. R. (2004). Chemotherapeutic deletion of CTG repeats in lymphoblast cells from DM1 patients. *Nucleic Acids Res* 32, 6334-6346.
- Hayflick, L., and Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25, 585-621.
- Heins, N., Englund, M. C., Sjoblom, C., Dahl, U., Tønning, A., Bergh, C., Lindahl, A., Hanson, C., and Semb, H. (2004). Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 22, 367-376.
- Hemmati-Brivanlou, A., and Melton, D. (1997). Vertebrate neural induction. *Annu Rev Neurosci* 20, 43-60.
- Hiromasa, S., Ikeda, T., Kubota, K., Hattori, N., Coto, H., Maldonado, C., and Kupersmith, J. (1988). Ventricular tachycardia and sudden death in myotonic dystrophy. *Am Heart J* 115, 914-915.
- Hoffman, L. M., and Carpenter, M. K. (2005). Human embryonic stem cell stability. *Stem Cell Rev* 1, 139-144.
- Hofmann-Radvanyi, H., Lavedan, C., Rabes, J. P., Savoy, D., Duros, C., Johnson, K., and Junien, C. (1993). Myotonic dystrophy: absence of CTG enlarged transcript in congenital forms, and low expression of the normal allele. *Hum Mol Genet* 2, 1263-1266.
- Holt, I., Mittal, S., Furling, D., Butler-Browne, G. S., Brook, J. D., and Morris, G. E. (2007). Defective mRNA in myotonic dystrophy accumulates at the periphery of nuclear splicing speckles. *Genes Cells* 12, 1035-1048.



Hotta, R., Pepdjonovic, L., Anderson, R. B., Zhang, D., Bergner, A. J., Leung, J., Pebay, A., Young, H. M., Newgreen, D. F., and Dottori, M. (2009). Small-molecule induction of neural crest-like cells derived from human neural progenitors. *Stem Cells* 27, 2896-2905.

Houbaviy, H. B., Dennis, L., Jaenisch, R., and Sharp, P. A. (2005). Characterization of a highly variable eutherian microRNA gene. *Rna* 11, 1245-1257.

Houbaviy, H. B., Murray, M. F., and Sharp, P. A. (2003). Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell* 5, 351-358.

Hua, Q., and He, R. Q. (2003). Tau could protect DNA double helix structure. *Biochim Biophys Acta* 1645, 205-211.

Hua, Q., He, R. Q., Haque, N., Qu, M. H., del Carmen Alonso, A., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2003). Microtubule associated protein tau binds to double-stranded but not single-stranded DNA. *Cell Mol Life Sci* 60, 413-421.

Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., and Melton, D. A. (2008). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 26, 1269-1275.

Ishiguro, K., Shiratsuchi, A., Sato, S., Omori, A., Arioka, M., Kobayashi, S., Uchida, T., and Imahori, K. (1993). Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett* 325, 167-172.

Ishihara, T., Hong, M., Zhang, B., Nakagawa, Y., Lee, M. K., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (1999). Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform. *Neuron* 24, 751-762.

Jaks, V., Kasper, M., and Toftgard, R. The hair follicle-a stem cell zoo. *Exp Cell Res* 316, 1422-1428.

Jansen, G., Bachner, D., Coerwinkel, M., Wormskamp, N., Hameister, H., and Wieringa, B. (1995). Structural organization and developmental expression pattern of the mouse WD-repeat gene DMR-N9 immediately upstream of the myotonic dystrophy locus. *Hum Mol Genet* 4, 843-852.

Jansen, G., Groenen, P. J., Bachner, D., Jap, P. H., Coerwinkel, M., Oerlemans, F., van den Broek, W., Gohlsch, B., Pette, D., Plomp, J. J., *et al.* (1996). Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice. *Nat Genet* 13, 316-324.

Jensen, J., Hyllner, J., and Bjorquist, P. (2009). Human embryonic stem cell technologies and drug discovery. *J Cell Physiol* 219, 513-519.

Jiang, H., Mankodi, A., Swanson, M. S., Moxley, R. T., and Thornton, C. A. (2004). Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons. *Hum Mol Genet* 13, 3079-3088.

Junghans, R. P. (2009). Dystrophia myotonia: why focus on foci? *Eur J Hum Genet* 17, 543-553.

Kaibuchi, K., Kuroda, S., and Amano, M. (1999). Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 68, 459-486.

Kanadia, R. N., Johnstone, K. A., Mankodi, A., Lungu, C., Thornton, C. A., Esson, D., Timmers, A. M., Hauswirth, W. W., and Swanson, M. S. (2003). A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science* 302, 1978-1980.

Kanadia, R. N., Shin, J., Yuan, Y., Beattie, S. G., Wheeler, T. M., Thornton, C. A., and Swanson, M. S. (2006). Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11748-11753.



Kanellopoulou, C., Muljo, S. A., Kung, A. L., Ganesan, S., Drapkin, R., Jenuwein, T., Livingston, D. M., and Rajewsky, K. (2005). Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev* 19, 489-501.

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.

Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., Kaneko, S., Kuwana, Y., Nakanishi, S., Nishikawa, S. I., and Sasai, Y. (2000). Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 28, 31-40.

Kehat, I., Gepstein, A., Spira, A., Itskovitz-Eldor, J., and Gepstein, L. (2002). High-resolution electrophysiological assessment of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: a novel in vitro model for the study of conduction. *Circ Res* 91, 659-661.

Kehat, I., Kenyagin-Karsenti, D., Snir, M., Segev, H., Amit, M., Gepstein, A., Livne, E., Binah, O., Itskovitz-Eldor, J., and Gepstein, L. (2001). Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 108, 407-414.

Kerr, C. L., Gearhart, J. D., Elliott, A. M., and Donovan, P. J. (2006a). Embryonic germ cells: when germ cells become stem cells. *Semin Reprod Med* 24, 304-313.

Kerr, C. L., Shamblott, M. J., and Gearhart, J. D. (2006b). Pluripotent stem cells from germ cells. *Methods Enzymol* 419, 400-426.

Kim, D. H., Langlois, M. A., Lee, K. B., Riggs, A. D., Puymirat, J., and Rossi, J. J. (2005a). HnRNP H inhibits nuclear export of mRNA containing expanded CUG repeats and a distal branch point sequence. *Nucleic Acids Res* 33, 3866-3874.

Kim, H. S., Oh, S. K., Park, Y. B., Ahn, H. J., Sung, K. C., Kang, M. J., Lee, L. A., Suh, C. S., Kim, S. H., Kim, D. W., and Moon, S. Y. (2005b). Methods for derivation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 23, 1228-1233.

Klesert, T. R., Cho, D. H., Clark, J. I., Maylie, J., Adelman, J., Snider, L., Yuen, E. C., Soriano, P., and Tapscott, S. J. (2000). Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy. *Nat Genet* 25, 105-109.

Koch, P., Kokaia, Z., Lindvall, O., and Brustle, O. (2009a). Emerging concepts in neural stem cell research: autologous repair and cell-based disease modelling. *Lancet Neurol* 8, 819-829.

Koch, P., Opitz, T., Steinbeck, J. A., Ladewig, J., and Brustle, O. (2009b). A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3225-3230.

Koga, R., Nakao, Y., Kurano, Y., Tsukahara, T., Nakamura, A., Ishiura, S., Nonaka, I., and Arahata, K. (1994). Decreased myotonin-protein kinase in the skeletal and cardiac muscles in myotonic dystrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 202, 577-585.

Koike, M., Shibata, M., Tadakoshi, M., Gotoh, K., Komatsu, M., Waguri, S., Kawahara, N., Kuida, K., Nagata, S., Kominami, E., *et al.* (2008). Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. *Am J Pathol* 172, 454-469.

Koivisto, H., Hyvarinen, M., Stromberg, A. M., Inzunza, J., Matilainen, E., Mikkola, M., Hovatta, O., and Teerijoki, H. (2004). Cultures of human embryonic stem cells: serum replacement medium or serum-containing media and the effect of basic fibroblast growth factor. *Reprod Biomed Online* 9, 330-337.

Kola, I., and Landis, J. (2004). Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov* 3, 711-715.

Krek, A., Grun, D., Poy, M. N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E. J., MacMenamin, P., da Piedade, I.,



- Gunsalus, K. C., Stoffel, M., and Rajewsky, N. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 37, 495-500.
- Krichevsky, A. M., Sonntag, K. C., Isacson, O., and Kosik, K. S. (2006). Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem Cells* 24, 857-864.
- Ku, M., Koche, R. P., Rheinbay, E., Mendenhall, E. M., Endoh, M., Mikkelsen, T. S., Presser, A., Nusbaum, C., Xie, X., Chi, A. S., *et al.* (2008). Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. *PLoS Genet* 4, e1000242.
- Kumari, D., and Usdin, K. (2009). Chromatin remodeling in the noncoding repeat expansion diseases. *J Biol Chem* 284, 7413-7417.
- Laberge, L., Dauvilliers, Y., Begin, P., Richer, L., Jean, S., and Mathieu, J. (2009). Fatigue and daytime sleepiness in patients with myotonic dystrophy type 1: to lump or split? *Neuromuscul Disord* 19, 397-402.
- Ladd, A. N., Charlet, N., and Cooper, T. A. (2001). The CELF family of RNA binding proteins is implicated in cell-specific and developmentally regulated alternative splicing. *Mol Cell Biol* 21, 1285-1296.
- Langlois, M. A., Boniface, C., Wang, G., Alluin, J., Salvaterra, P. M., Puymirat, J., Rossi, J. J., and Lee, N. S. (2005). Cytoplasmic and nuclear retained DMPK mRNAs are targets for RNA interference in myotonic dystrophy cells. *J Biol Chem* 280, 16949-16954.
- Langlois, M. A., Lee, N. S., Rossi, J. J., and Puymirat, J. (2003). Hammerhead ribozyme-mediated destruction of nuclear foci in myotonic dystrophy myoblasts. *Mol Ther* 7, 670-680.
- Latres, E., Amini, A. R., Amini, A. A., Griffiths, J., Martin, F. J., Wei, Y., Lin, H. C., Yancopoulos, G. D., and Glass, D. J. (2005). Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway. *J Biol Chem* 280, 2737-2744.
- Laustriat, D., Gide, J., Hechard, C., and Peschanski, M. (2009). [Embryonic stem cells in pharmacology]. *Med Sci (Paris)* 25 *Spec No 2*, 32-38.
- Lee, G., Chambers, S. M., Tomishima, M. J., and Studer, L. Derivation of neural crest cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 5, 688-701.
- Lee, G., Kim, H., Elkabetz, Y., Al Shamy, G., Panagiotakos, G., Barberi, T., Tabar, V., and Studer, L. (2007). Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 25, 1468-1475.
- Lee, G., Papapetrou, E. P., Kim, H., Chambers, S. M., Tomishima, M. J., Fasano, C. A., Ganat, Y. M., Menon, J., Shimizu, F., Viale, A., *et al.* (2009a). Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 461, 402-406.
- Lee, M. Y., Lim, H. W., Lee, S. H., and Han, H. J. (2009b). Smad, PI3K/Akt, and Wnt-dependent signaling pathways are involved in BMP-4-induced ESC self-renewal. *Stem Cells* 27, 1858-1868.
- Lefort, N., Feyeux, M., Bas, C., Feraud, O., Bennaceur-Griscelli, A., Tachdjian, G., Peschanski, M., and Perrier, A. L. (2008). Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nat Biotechnol* 26, 1364-1366.
- Lefort, N., Perrier, A. L., Laabi, Y., Varela, C., and Peschanski, M. (2009). Human embryonic stem cells and genomic instability. *Regen Med* 4, 899-909.
- Leroy, K., and Brion, J. P. (1999). Developmental expression and localization of glycogen synthase kinase-3beta in rat brain. *J Chem Neuroanat* 16, 279-293.
- Leroy, O., Dhaenens, C. M., Schraen-Maschke, S., Belarbi, K., Delacourte, A., Andreadis, A., Sablonniere, B., Buee, L., Sergeant, N., and Caillet-Boudin, M. L. (2006a). ETR-3 represses Tau exons 2/3 inclusion, a splicing event abnormally enhanced in myotonic dystrophy type I. *J Neurosci Res* 84, 852-859.



- Leroy, O., Wang, J., Maurage, C. A., Parent, M., Cooper, T., Buee, L., Sergeant, N., Andreadis, A., and Caillet-Boudin, M. L. (2006b). Brain-specific change in alternative splicing of Tau exon 6 in myotonic dystrophy type 1. *Biochim Biophys Acta* 1762, 460-467.
- Leschik, J., Stefanovic, S., Brinon, B., and Puceat, M. (2008). Cardiac commitment of primate embryonic stem cells. *Nat Protoc* 3, 1381-1387.
- 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* 24, 568-574.
- Lewis, B. P., Burge, C. B., and Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15-20.
- Li, H., Liu, Y., Shin, S., Sun, Y., Loring, J. F., Mattson, M. P., Rao, M. S., and Zhan, M. (2006). Transcriptome coexpression map of human embryonic stem cells. *BMC Genomics* 7, 103.
- Li, J., Wang, G., Wang, C., Zhao, Y., Zhang, H., Tan, Z., Song, Z., Ding, M., and Deng, H. (2007). MEK/ERK signaling contributes to the maintenance of human embryonic stem cell self-renewal. *Differentiation* 75, 299-307.
- Li, W., Wang, X. S., Qu, M. H., Liu, Y., and He, R. Q. (2005a). Human protein tau represses DNA replication in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1726, 280-286.
- Li, X., Chen, Y., Scheele, S., Arman, E., Haffner-Krausz, R., Ekblom, P., and Lonai, P. (2001). Fibroblast growth factor signaling and basement membrane assembly are connected during epithelial morphogenesis of the embryoid body. *J Cell Biol* 153, 811-822.
- Li, X. J., Du, Z. W., Zarnowska, E. D., Pankratz, M., Hansen, L. O., Pearce, R. A., and Zhang, S. C. (2005b). Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23, 215-221.
- Liang, H., Matzkies, M., Schunkert, H., Tang, M., Bonnemeier, H., Hescheler, J., and Reppel, M. Human and murine embryonic stem cell-derived cardiomyocytes serve together as a valuable model for drug safety screening. *Cell Physiol Biochem* 25, 459-466.
- Lim, L. P., Lau, N. C., Garrett-Engle, P., Grimson, A., Schelter, J. M., Castle, J., Bartel, D. P., Linsley, P. S., and Johnson, J. M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433, 769-773.
- Lindenbaum, M. H., and Grosveld, F. (1990). An in vitro globin gene switching model based on differentiated embryonic stem cells. *Genes Dev* 4, 2075-2085.
- Liquori, C. L., Ricker, K., Moseley, M. L., Jacobsen, J. F., Kress, W., Naylor, S. L., Day, J. W., and Ranum, L. P. (2001). Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science* 293, 864-867.
- Liu, Y., Shin, S., Zeng, X., Zhan, M., Gonzalez, R., Mueller, F. J., Schwartz, C. M., Xue, H., Li, H., Baker, S. C., *et al.* (2006). Genome wide profiling of human embryonic stem cells (hESCs), their derivatives and embryonal carcinoma cells to develop base profiles of U.S. Federal government approved hESC lines. *BMC Dev Biol* 6, 20.
- Llagostera, E., Carmona, M. C., Vicente, M., Escorihuela, R. M., and Kaliman, P. (2009). High-fat diet induced adiposity and insulin resistance in mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase. *FEBS Lett* 583, 2121-2125.
- Llagostera, E., Catalucci, D., Marti, L., Liesa, M., Camps, M., Ciaraldi, T. P., Kondo, R., Reddy, S., Dillmann, W. H., Palacin, M., *et al.* (2007). Role of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) in glucose homeostasis and muscle insulin action. *PLoS One* 2, e1134.



- Lo, C. W. (2000). Role of gap junctions in cardiac conduction and development: insights from the connexin knockout mice. *Circ Res* 87, 346-348.
- Loomis, P. A., Howard, T. H., Castleberry, R. P., and Binder, L. I. (1990). Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8422-8426.
- Lopez Castel, A., Cleary, J. D., and Pearson, C. E. Repeat instability as the basis for human diseases and as a potential target for therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 165-170.
- Lovestone, S., Hartley, C. L., Pearce, J., and Anderton, B. H. (1996). Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3 beta in intact mammalian cells: the effects on the organization and stability of microtubules. *Neuroscience* 73, 1145-1157.
- Lucas, J. J., Hernandez, F., Gomez-Ramos, P., Moran, M. A., Hen, R., and Avila, J. (2001). Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *Embo J* 20, 27-39.
- Lueck, J. D., Lungu, C., Mankodi, A., Osborne, R. J., Welle, S. L., Dirksen, R. T., and Thornton, C. A. (2007a). Chloride channelopathy in myotonic dystrophy resulting from loss of posttranscriptional regulation for CLCN1. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C1291-1297.
- Lueck, J. D., Mankodi, A., Swanson, M. S., Thornton, C. A., and Dirksen, R. T. (2007b). Muscle chloride channel dysfunction in two mouse models of myotonic dystrophy. *J Gen Physiol* 129, 79-94.
- Ma, Y., Ramezani, A., Lewis, R., Hawley, R. G., and Thomson, J. A. (2003). High-level sustained transgene expression in human embryonic stem cells using lentiviral vectors. *Stem Cells* 21, 111-117.
- Machuca-Tzili, L., Brook, D., and Hilton-Jones, D. (2005). Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies: a review. *Muscle Nerve* 32, 1-18.
- Mahadevan, M., Tsilfidis, C., Sabourin, L., Shutler, G., Amemiya, C., Jansen, G., Neville, C., Narang, M., Barcelo, J., O'Hoy, K., and et al. (1992). Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* 255, 1253-1255.
- Mahadevan, M. S., Yadava, R. S., Yu, Q., Balijepalli, S., Frenzel-McCardell, C. D., Bourne, T. D., and Phillips, L. H. (2006). Reversible model of RNA toxicity and cardiac conduction defects in myotonic dystrophy. *Nat Genet* 38, 1066-1070.
- Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., et al. (2007). Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 1, 55-70.
- Mallon, B. S., Park, K. Y., Chen, K. G., Hamilton, R. S., and McKay, R. D. (2006). Toward xeno-free culture of human embryonic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 1063-1075.
- Mandelkow, E. M., Drewes, G., Biernat, J., Gustke, N., Van Lint, J., Vandenheede, J. R., and Mandelkow, E. (1992). Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. *FEBS Lett* 314, 315-321.
- Mandelkow, E. M., Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., and Mandelkow, E. (2003). Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses. *Neurobiol Aging* 24, 1079-1085.
- Mankodi, A., Logigian, E., Callahan, L., McClain, C., White, R., Henderson, D., Krym, M., and Thornton, C. A. (2000). Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* 289, 1769-1773.
- Mankodi, A., Takahashi, M. P., Jiang, H., Beck, C. L., Bowers, W. J., Moxley, R. T., Cannon, S. C., and Thornton, C. A. (2002). Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of CIC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol Cell* 10, 35-44.



- Mankodi, A., Urbinati, C. R., Yuan, Q. P., Moxley, R. T., Sansone, V., Krym, M., Henderson, D., Schalling, M., Swanson, M. S., and Thornton, C. A. (2001). Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Hum Mol Genet* *10*, 2165-2170.
- Marson, A., Levine, S. S., Cole, M. F., Frampton, G. M., Brambrink, T., Johnstone, S., Guenther, M. G., Johnston, W. K., Wernig, M., Newman, J., *et al.* (2008). Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell* *134*, 521-533.
- Martin, G. R. (1980). Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. *Science* *209*, 768-776.
- Mastrogiacomo, I., Bonanni, G., Menegazzo, E., Santarossa, C., Pagani, E., Gennarelli, M., and Angelini, C. (1996). Clinical and hormonal aspects of male hypogonadism in myotonic dystrophy. *Ital J Neurol Sci* *17*, 59-65.
- Mastrogiacomo, I., Pagani, E., Novelli, G., Angelini, C., Gennarelli, M., Menegazzo, E., Bonanni, G., and Dallapiccola, B. (1994). Male hypogonadism in myotonic dystrophy is related to (CTG)<sub>n</sub> triplet mutation. *J Endocrinol Invest* *17*, 381-383.
- Mastroiannopoulos, N. P., Chrysanthou, E., Kyriakides, T. C., Uney, J. B., Mahadevan, M. S., and Phylactou, L. A. (2008). The effect of myotonic dystrophy transcript levels and location on muscle differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* *377*, 526-531.
- Mastroiannopoulos, N. P., Feldman, M. L., Uney, J. B., Mahadevan, M. S., and Phylactou, L. A. (2005). Woodchuck post-transcriptional element induces nuclear export of myotonic dystrophy 3' untranslated region transcripts. *EMBO Rep* *6*, 458-463.
- Mateizel, I., De Temmerman, N., Ullmann, U., Cauffman, G., Sermon, K., Van de Velde, H., De Rycke, M., Degreef, E., Devroey, P., Liebaers, I., and Van Steirteghem, A. (2006). Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. *Hum Reprod* *21*, 503-511.
- Mathieu, J., De Braekeleer, M., and Prevost, C. (1990). Genealogical reconstruction of myotonic dystrophy in the Saguenay-Lac-Saint-Jean area (Quebec, Canada). *Neurology* *40*, 839-842.
- Matsui, T., Leung, D., Miyashita, H., Maksakova, I. A., Miyachi, H., Kimura, H., Tachibana, M., Lorincz, M. C., and Shinkai, Y. Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature* *464*, 927-931.
- Matsumura, T., Iwahashi, H., Funahashi, T., Takahashi, M. P., Saito, T., Yasui, K., Saito, T., Iyama, A., Toyooka, K., Fujimura, H., and Shinno, S. (2009). A cross-sectional study for glucose intolerance of myotonic dystrophy. *J Neurol Sci* *276*, 60-65.
- Maurage, C. A., Udd, B., Ruchoux, M. M., Vermersch, P., Kalimo, H., Krahe, R., Delacourte, A., and Sergeant, N. (2005). Similar brain tau pathology in DM2/PROMM and DM1/Steinert disease. *Neurology* *65*, 1636-1638.
- Maurer, J., Nelson, B., Cecena, G., Bajpai, R., Mercola, M., Terskikh, A., and Oshima, R. G. (2008). Contrasting expression of keratins in mouse and human embryonic stem cells. *PLoS One* *3*, e3451.
- McLean, A. B., D'Amour, K. A., Jones, K. L., Krishnamoorthy, M., Kulik, M. J., Reynolds, D. M., Sheppard, A. M., Liu, H., Xu, Y., Baetge, E. E., and Dalton, S. (2007). Activin efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signaling is suppressed. *Stem Cells* *25*, 29-38.
- Meissner, A., and Jaenisch, R. (2006). Generation of nuclear transfer-derived pluripotent ES cells from cloned Cdx2-deficient blastocysts. *Nature* *439*, 212-215.
- Menasche, P., Alfieri, O., Janssens, S., McKenna, W., Reichenspurner, H., Trinquart, L., Vilquin, J. T.,



Marolleau, J. P., Seymour, B., Larghero, J., *et al.* (2008). The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* *117*, 1189-1200.

Miller, J. W., Urbinati, C. R., Teng-Umnuay, P., Stenberg, M. G., Byrne, B. J., Thornton, C. A., and Swanson, M. S. (2000). Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *Embo J* *19*, 4439-4448.

Mirkin, S. M. (2007). Expandable DNA repeats and human disease. *Nature* *447*, 932-940.

Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* *113*, 631-642.

Modoni, A., Silvestri, G., Pomponi, M. G., Mangiola, F., Tonali, P. A., and Marra, C. (2004). Characterization of the pattern of cognitive impairment in myotonic dystrophy type 1. *Arch Neurol* *61*, 1943-1947.

Modoni, A., Silvestri, G., Vita, M. G., Quaranta, D., Tonali, P. A., and Marra, C. (2008). Cognitive impairment in myotonic dystrophy type 1 (DM1): a longitudinal follow-up study. *J Neurol* *255*, 1737-1742.

Moe, S. E., Sorbo, J. G., and Holen, T. (2008). Huntingtin triplet-repeat locus is stable under long-term Fen1 knockdown in human cells. *J Neurosci Methods* *171*, 233-238.

Moore, K. A., and Lemischka, I. R. (2006). Stem cells and their niches. *Science* *311*, 1880-1885.

Moraes, K. C., Wilusz, C. J., and Wilusz, J. (2006). CUG-BP binds to RNA substrates and recruits PARN deadenylase. *Rna* *12*, 1084-1091.

Mounsey, J. P., John, J. E., 3rd, Helmke, S. M., Bush, E. W., Gilbert, J., Roses, A. D., Perryman, M. B., Jones, L. R., and Moorman, J. R. (2000). Phospholemman is a substrate for myotonic dystrophy protein kinase. *J Biol Chem* *275*, 23362-23367.

Muranyi, A., Zhang, R., Liu, F., Hirano, K., Ito, M., Epstein, H. F., and Hartshorne, D. J. (2001). Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates the myosin phosphatase targeting subunit and inhibits myosin phosphatase activity. *FEBS Lett* *493*, 80-84.

Murchison, E. P., Partridge, J. F., Tam, O. H., Cheloufi, S., and Hannon, G. J. (2005). Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 12135-12140.

Murry, C. E., and Keller, G. (2008). Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* *132*, 661-680.

Musaro, A., McCullagh, K., Paul, A., Houghton, L., Dobrowolny, G., Molinaro, M., Barton, E. R., Sweeney, H. L., and Rosenthal, N. (2001). Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet* *27*, 195-200.

Musaro, A., McCullagh, K. J., Naya, F. J., Olson, E. N., and Rosenthal, N. (1999). IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature* *400*, 581-585.

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.

Nakayama, M. (2009). Cell Therapy Using Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells Meets Next-Next Generation DNA Sequencing Technology. *Curr Genomics* *10*, 303-305.

Newman, M. A., and Hammond, S. M. Emerging paradigms of regulated microRNA processing. *Genes Dev* *24*, 1086-1092.



Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95, 379-391.

Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24, 372-376.

Norstrom, A., Akesson, K., Hardarson, T., Hamberger, L., Bjorquist, P., and Sartipy, P. (2006). Molecular and pharmacological properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Exp Biol Med (Maywood)* 231, 1753-1762.

Novelli, G., Gennarelli, M., Zelano, G., Pizzuti, A., Fattorini, C., Caskey, C. T., and Dallapiccola, B. (1993). Failure in detecting mRNA transcripts from the mutated allele in myotonic dystrophy muscle. *Biochem Mol Biol Int* 29, 291-297.

O'Malley, J., Woltjen, K., and Kaji, K. (2009). New strategies to generate induced pluripotent stem cells. *Curr Opin Biotechnol* 20, 516-521.

Ohyama, M. (2007). Hair follicle bulge: a fascinating reservoir of epithelial stem cells. *J Dermatol Sci* 46, 81-89.

Okita, K., and Yamanaka, S. (2006). Intracellular signaling pathways regulating pluripotency of embryonic stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 1, 103-111.

Oude Ophuis, R. J., Wijers, M., Bennink, M. B., van de Loo, F. A., Fransen, J. A., Wieringa, B., and Wansink, D. G. (2009). A tail-anchored myotonic dystrophy protein kinase isoform induces perinuclear clustering of mitochondria, autophagy, and apoptosis. *PLoS One* 4, e8024.

Oyamada, R., Hayashi, M., Katoh, Y., Tsuchiya, K., Mizutani, T., Tominaga, I., and Kashima, H. (2006). Neurofibrillary tangles and deposition of oxidative products in the brain in cases of myotonic dystrophy. *Neuropathology* 26, 107-114.

Pall, G. S., Johnson, K. J., and Smith, G. L. (2003). Abnormal contractile activity and calcium cycling in cardiac myocytes isolated from DMPK knockout mice. *Physiol Genomics* 13, 139-146.

Park, I. H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M. W., Cowan, C., Hochedlinger, K., and Daley, G. Q. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134, 877-886.

Park, J. H., Kim, S. J., Oh, E. J., Moon, S. Y., Roh, S. I., Kim, C. G., and Yoon, H. S. (2003). Establishment and maintenance of human embryonic stem cells on STO, a permanently growing cell line. *Biol Reprod* 69, 2007-2014.

Pascual, M., Vicente, M., Monferrer, L., and Artero, R. (2006). The Muscleblind family of proteins: an emerging class of regulators of developmentally programmed alternative splicing. *Differentiation* 74, 65-80.

Patani, R., Compston, A., Puddifoot, C. A., Wyllie, D. J., Hardingham, G. E., Allen, N. D., and Chandran, S. (2009). Activin/Nodal inhibition alone accelerates highly efficient neural conversion from human embryonic stem cells and imposes a caudal positional identity. *PLoS One* 4, e7327.

Patel, M., and Yang, S. Advances in Reprogramming Somatic Cells to Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rev*.

Pattingre, S., Espert, L., Biard-Piechaczyk, M., and Codogno, P. (2008). Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie* 90, 313-323.

Pelargonio, G., Dello Russo, A., Sanna, T., De Martino, G., and Belloci, F. (2002). Myotonic dystrophy and the heart. *Heart* 88, 665-670.

Penisson-Besnier, I., Devillers, M., Porcher, R., Orlikowski, D., Doppler, V., Desnuelle, C., Ferrer, X., Bes, M. C., Bouhour, F., Tranchant, C., *et al.* (2008). Dehydroepiandrosterone for myotonic dystrophy type 1. *Neurology* 71, 407-412.



- Pera, M. F., Andrade, J., Houssami, S., Reubinoff, B., Trounson, A., Stanley, E. G., Ward-van Oostwaard, D., and Mummery, C. (2004). Regulation of human embryonic stem cell differentiation by BMP-2 and its antagonist noggin. *J Cell Sci* *117*, 1269-1280.
- Perrier, A. L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M. E., Bruses, J., Topf, N., Harrison, N. L., and Studer, L. (2004). Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 12543-12548.
- Peschanski, M. (2000). [Treatment of neurodegenerative diseases]. *Pathol Biol (Paris)* *48*, 447-448.
- Peschanski, M. (2001). [10 years of substitution therapy for neurodegenerative diseases using fetal neuron grafts: a positive outcome but with questions for the future]. *J Soc Biol* *195*, 51-55.
- Peschanski, M., Hantraye, P., Bachoud-Levi, A. C., and Cesaro, P. (2000). [Therapeutic potential of fetal neuron grafts in neurodegenerative diseases]. *Bull Acad Natl Med* *184*, 1213-1217; discussion 1218-1220.
- Peters, C., Cornish, J. M., Parikh, S. H., and Kurtzberg, J. Stem cell source and outcome after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in children and adolescents with acute leukemia. *Pediatr Clin North Am* *57*, 27-46.
- Pevny, L., and Placzek, M. (2005). SOX genes and neural progenitor identity. *Curr Opin Neurobiol* *15*, 7-13.
- Pevny, L. H., Sockanathan, S., Placzek, M., and Lovell-Badge, R. (1998). A role for SOX1 in neural determination. *Development* *125*, 1967-1978.
- Pfeifer, A., Ikawa, M., Dayn, Y., and Verma, I. M. (2002). Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 2140-2145.
- Philips, A. V., Timchenko, L. T., and Cooper, T. A. (1998). Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* *280*, 737-741.
- Phylactou, L. A., Darrah, C., and Wood, M. J. (1998). Ribozyme-mediated trans-splicing of a trinucleotide repeat. *Nat Genet* *18*, 378-381.
- Pickering, S. J., Minger, S. L., Patel, M., Taylor, H., Black, C., Burns, C. J., Ekonomou, A., and Braude, P. R. (2005). Generation of a human embryonic stem cell line encoding the cystic fibrosis mutation deltaF508, using preimplantation genetic diagnosis. *Reprod Biomed Online* *10*, 390-397.
- Probst, A., Gotz, J., Wiederhold, K. H., Tolnay, M., Mistl, C., Jatou, A. L., Hong, M., Ishihara, T., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., *et al.* (2000). Axonopathy and amyotrophy in mice transgenic for human four-repeat tau protein. *Acta Neuropathol* *99*, 469-481.
- Puceat, M. (2008). Protocols for cardiac differentiation of embryonic stem cells. *Methods* *45*, 168-171.
- Puyal, J., Ginet, V., Vaslin, A., Truttmann, A. C., and Clarke, P. G. (2009). [The two faces of autophagy in the nervous system]. *Med Sci (Paris)* *25*, 383-390.
- Rajala, K., Hakala, H., Panula, S., Aivio, S., Pihlajamaki, H., Suuronen, R., Hovatta, O., and Skottman, H. (2007). Testing of nine different xeno-free culture media for human embryonic stem cell cultures. *Hum Reprod* *22*, 1231-1238.
- Rambhatla, L., Chiu, C. P., Kundu, P., Peng, Y., and Carpenter, M. K. (2003). Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplant* *12*, 1-11.
- Ranum, L. P., Rasmussen, P. F., Benzow, K. A., Koob, M. D., and Day, J. W. (1998). Genetic mapping of a second myotonic dystrophy locus. *Nat Genet* *19*, 196-198.
- Rao, M. (2004). Conserved and divergent paths that regulate self-renewal in mouse and human embryonic stem cells. *Dev Biol* *275*, 269-286.



Razidlo, D. F., and Lahue, R. S. (2008). Mrc1, Tof1 and Csm3 inhibit CAG.CTG repeat instability by at least two mechanisms. *DNA Repair (Amst)* 7, 633-640.

Reddy, S., Smith, D. B., Rich, M. M., Leferovich, J. M., Reilly, P., Davis, B. M., Tran, K., Rayburn, H., Bronson, R., Cros, D., *et al.* (1996). Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy. *Nat Genet* 13, 325-335.

Relaix, F., and Marcelle, C. (2009). Muscle stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 21, 748-753.

Ren, X. (2006). Comments on control of developmental regulators by polycomb in human embryonic stem cells. *Med Hypotheses* 67, 1469-1470.

Reppel, M., Pillekamp, F., Brockmeier, K., Matzkies, M., Bekcioglu, A., Lipke, T., Nguemo, F., Bonnemeier, H., and Hescheler, J. (2005). The electrocardiogram of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *J Electrocardiol* 38, 166-170.

Reubinoff, B. E., Itsykson, P., Turetsky, T., Pera, M. F., Reinhartz, E., Itzik, A., and Ben-Hur, T. (2001). Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19, 1134-1140.

Richards, M., Fong, C. Y., Chan, W. K., Wong, P. C., and Bongso, A. (2002). Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 20, 933-936.

Rochon, C., Frouin, V., Bortoli, S., Giraud-Triboulet, K., Duverger, V., Vaigot, P., Petat, C., Fouchet, P., Lassalle, B., Alibert, O., *et al.* (2006). Comparison of gene expression pattern in SP cell populations from four tissues to define common "stemness functions". *Exp Cell Res* 312, 2074-2082.

Rodda, D. J., Chew, J. L., Lim, L. H., Loh, Y. H., Wang, B., Ng, H. H., and Robson, P. (2005). Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem* 280, 24731-24737.

Rodriguez, R. T., Velkey, J. M., Lutzko, C., Seerke, R., Kohn, D. B., O'Shea, K. S., and Firpo, M. T. (2007). Manipulation of OCT4 levels in human embryonic stem cells results in induction of differential cell types. *Exp Biol Med (Maywood)* 232, 1368-1380.

Rosler, E. S., Fisk, G. J., Ares, X., Irving, J., Miura, T., Rao, M. S., and Carpenter, M. K. (2004). Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Dev Dyn* 229, 259-274.

Rossi, G., Dalpra, L., Crosti, F., Lissoni, S., Sciacca, F. L., Catania, M., Di Fede, G., Mangieri, M., Giaccone, G., Croci, D., and Tagliavini, F. (2008). A new function of microtubule-associated protein tau: involvement in chromosome stability. *Cell Cycle* 7, 1788-1794.

Rubinsztein, D. C., DiFiglia, M., Heintz, N., Nixon, R. A., Qin, Z. H., Ravikumar, B., Stefanis, L., and Tolkovsky, A. (2005). Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair. *Autophagy* 1, 11-22.

Ruthenburg, A. J., Allis, C. D., and Wysocka, J. (2007). Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Mol Cell* 25, 15-30.

Salvatori, S., Fanin, M., Trevisan, C. P., Furlan, S., Reddy, S., Nagy, J. I., and Angelini, C. (2005).

Decreased expression of DMPK: correlation with CTG repeat expansion and fibre type composition in myotonic dystrophy type 1. *Neurol Sci* 26, 235-242.

Sarkar, P. S., Appukuttan, B., Han, J., Ito, Y., Ai, C., Tsai, W., Chai, Y., Stout, J. T., and Reddy, S. (2000). Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts. *Nat Genet* 25, 110-114.

Sarkar, P. S., Paul, S., Han, J., and Reddy, S. (2004). Six5 is required for spermatogenic cell survival and spermiogenesis. *Hum Mol Genet* 13, 1421-1431.

Sarkar, S., Ravikumar, B., Floto, R. A., and Rubinsztein, D. C. (2009). Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies. *Cell Death Differ* 16, 46-56.



- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., and Brivanlou, A. H. (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 10, 55-63.
- Sato, N., Sanjuan, I. M., Heke, M., Uchida, M., Naef, F., and Brivanlou, A. H. (2003). Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse. *Dev Biol* 260, 404-413.
- Savkur, R. S., Philips, A. V., and Cooper, T. A. (2001). Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet* 29, 40-47.
- Savouret, C., Brisson, E., Essers, J., Kanaar, R., Pastink, A., te Riele, H., Junien, C., and Gourdon, G. (2003). CTG repeat instability and size variation timing in DNA repair-deficient mice. *Embo J* 22, 2264-2273.
- Savouret, C., Garcia-Cordier, C., Megret, J., te Riele, H., Junien, C., and Gourdon, G. (2004). MSH2-dependent germinal CTG repeat expansions are produced continuously in spermatogonia from DM1 transgenic mice. *Mol Cell Biol* 24, 629-637.
- Schara, U., and Schoser, B. G. (2006). Myotonic dystrophies type 1 and 2: a summary on current aspects. *Semin Pediatr Neurol* 13, 71-79.
- Schickel, R., Boyerinas, B., Park, S. M., and Peter, M. E. (2008). MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death. *Oncogene* 27, 5959-5974.
- Seitz, A., Kojima, H., Oiwa, K., Mandelkow, E. M., Song, Y. H., and Mandelkow, E. (2002). Single-molecule investigation of the interference between kinesin, tau and MAP2c. *Embo J* 21, 4896-4905.
- Sergeant, N., Sablonniere, B., Schraen-Maschke, S., Ghestem, A., Maurage, C. A., Wattez, A., Vermersch, P., and Delacourte, A. (2001). Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 10, 2143-2155.
- Seznec, H., Agbulut, O., Sergeant, N., Savouret, C., Ghestem, A., Tabti, N., Willer, J. C., Ourth, L., Duros, C., Brisson, E., *et al.* (2001). Mice transgenic for the human myotonic dystrophy region with expanded CTG repeats display muscular and brain abnormalities. *Hum Mol Genet* 10, 2717-2726.
- Shamblott, M. J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E. M., Littlefield, J. W., Donovan, P. J., Blumenthal, P. D., Huggins, G. R., and Gearhart, J. D. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13726-13731.
- Shilatifard, A. (2008). Molecular implementation and physiological roles for histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation. *Curr Opin Cell Biol* 20, 341-348.
- Shimizu, M., Wang, W., Walch, E. T., Dunne, P. W., and Epstein, H. F. (2000). Rac-1 and Raf-1 kinases, components of distinct signaling pathways, activate myotonic dystrophy protein kinase. *FEBS Lett* 475, 273-277.
- Silva, J., Barrandon, O., Nichols, J., Kawaguchi, J., Theunissen, T. W., and Smith, A. (2008). Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol* 6, e253.
- Siomi, H., and Siomi, M. C. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Mol Cell* 38, 323-332.
- Sjoberg, M. K., Shestakova, E., Mansuroglu, Z., Maccioni, R. B., and Bonnefoy, E. (2006). Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *J Cell Sci* 119, 2025-2034.
- Smith, J. R., Vallier, L., Lupo, G., Alexander, M., Harris, W. A., and Pedersen, R. A. (2008). Inhibition of Activin/Nodal signaling promotes specification of human embryonic stem cells into neuroectoderm. *Dev Biol* 313, 107-117.
- Smukler, S. R., Runciman, S. B., Xu, S., and van der Kooy, D. (2006). Embryonic stem cells assume a primitive neural stem cell fate in the absence of extrinsic influences. *J Cell Biol* 172, 79-90.



- Snir, M., Kehat, I., Gepstein, A., Coleman, R., Itskovitz-Eldor, J., Livne, E., and Gepstein, L. (2003). Assessment of the ultrastructural and proliferative properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285, H2355-2363.
- Soderdahl, T., Koppers-Munther, B., Heins, N., Edsbacke, J., Bjorquist, P., Cotgreave, I., and Jernstrom, B. (2007). Glutathione transferases in hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells. *Toxicol In Vitro* 21, 929-937.
- 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.
- Spittaels, K., Van den Haute, C., Van Dorpe, J., Bruynseels, K., Vandezande, K., Laenen, I., Geerts, H., Mercken, M., Sciot, R., Van Lommel, A., *et al.* (1999). Prominent axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein. *Am J Pathol* 155, 2153-2165.
- Spittaels, K., Van den Haute, C., Van Dorpe, J., Geerts, H., Mercken, M., Bruynseels, K., Lasrado, R., Vandezande, K., Laenen, I., Boon, T., *et al.* (2000). Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates protein tau and rescues the axonopathy in the central nervous system of human four-repeat tau transgenic mice. *J Biol Chem* 275, 41340-41349.
- Squazzo, S. L., O'Geen, H., Komashko, V. M., Krig, S. R., Jin, V. X., Jang, S. W., Margueron, R., Reinberg, D., Green, R., and Farnham, P. J. (2006). Suz12 binds to silenced regions of the genome in a cell-type-specific manner. *Genome Res* 16, 890-900.
- Stacey, G. N., Cobo, F., Nieto, A., Talavera, P., Healy, L., and Concha, A. (2006). The development of 'feeder' cells for the preparation of clinical grade hES cell lines: challenges and solutions. *J Biotechnol* 125, 583-588.
- Stadtfeld, M., Apostolou, E., Akutsu, H., Fukuda, A., Follett, P., Natesan, S., Kono, T., Shioda, T., and Hochedlinger, K. Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature* 465, 175-181.
- Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., Mandelkow, E., and Mandelkow, E. M. (2002). Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol* 156, 1051-1063.
- Stefanovic, S., Abboud, N., Desilets, S., Nury, D., Cowan, C., and Puceat, M. (2009). Interplay of Oct4 with Sox2 and Sox17: a molecular switch from stem cell pluripotency to specifying a cardiac fate. *J Cell Biol* 186, 665-673.
- Stephenson, E. L., Mason, C., and Braude, P. R. (2009). Preimplantation genetic diagnosis as a source of human embryonic stem cells for disease research and drug discovery. *Bjog* 116, 158-165.
- Stojkovic, P., Lako, M., Stewart, R., Przyborski, S., Armstrong, L., Evans, J., Murdoch, A., Strachan, T., and Stojkovic, M. (2005). An autogeneic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells* 23, 306-314.
- Strelchenko, N., Verlinsky, O., Kukhareno, V., and Verlinsky, Y. (2004). Morula-derived human embryonic stem cells. *Reprod Biomed Online* 9, 623-629.
- Sugino, M., Ohsawa, N., Ito, T., Ishida, S., Yamasaki, H., Kimura, F., and Shinoda, K. (1998). A pilot study of dehydroepiandrosterone sulfate in myotonic dystrophy. *Neurology* 51, 586-589.
- Suh, M. R., Lee, Y., Kim, J. Y., Kim, S. K., Moon, S. H., Lee, J. Y., Cha, K. Y., Chung, H. M., Yoon, H. S., Moon, S. Y., *et al.* (2004). Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol* 270, 488-498.
- 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.



- 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.
- Taneja, K. L., McCurrach, M., Schalling, M., Housman, D., and Singer, R. H. (1995). Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *J Cell Biol* 128, 995-1002.
- Tenzen, T., Zembowicz, F., and Cowan, C. A. Genome modification in human embryonic stem cells. *J Cell Physiol* 222, 278-281.
- Thomas, J. R., and Hergenrother, P. J. (2008). Targeting RNA with small molecules. *Chem Rev* 108, 1171-1224.
- 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.
- Thomson, J. A., Kalishman, J., Golos, T. G., Durning, M., Harris, C. P., Becker, R. A., and Hearn, J. P. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7844-7848.
- Thurston, V. C., Zinkowski, R. P., and Binder, L. I. (1996). Tau as a nucleolar protein in human nonneural cells in vitro and in vivo. *Chromosoma* 105, 20-30.
- Timchenko, L. T., Miller, J. W., Timchenko, N. A., DeVore, D. R., Datar, K. V., Lin, L., Roberts, R., Caskey, C. T., and Swanson, M. S. (1996). Identification of a (CUG)<sub>n</sub> triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Res* 24, 4407-4414.
- Timchenko, N. A., Iakova, P., Cai, Z. J., Smith, J. R., and Timchenko, L. T. (2001). Molecular basis for impaired muscle differentiation in myotonic dystrophy. *Mol Cell Biol* 21, 6927-6938.
- Timchenko, N. A., Patel, R., Iakova, P., Cai, Z. J., Quan, L., and Timchenko, L. T. (2004). Overexpression of CUG triplet repeat-binding protein, CUGBP1, in mice inhibits myogenesis. *J Biol Chem* 279, 13129-13139.
- Tome, S., Holt, I., Edelmann, W., Morris, G. E., Munnich, A., Pearson, C. E., and Gourdon, G. (2009). MSH2 ATPase domain mutation affects CTG\**CAG* repeat instability in transgenic mice. *PLoS Genet* 5, e1000482.
- Tropepe, V., Hitoshi, S., Sirard, C., Mak, T. W., Rossant, J., and van der Kooy, D. (2001). Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron* 30, 65-78.
- Tsai, Z. Y., Singh, S., Yu, S. L., Kao, L. P., Chen, B. Z., Ho, B. C., Yang, P. C., and Li, S. S. Identification of microRNAs regulated by activin A in human embryonic stem cells. *J Cell Biochem* 109, 93-102.
- Tsukane, M., Yoshizaki, C., and Yamauchi, T. (2007). Development and specific induction of apoptosis of cultured cell models overexpressing human tau during neural differentiation: Implication in Alzheimer's disease. *Anal Biochem* 360, 114-122.
- Uchiyama, Y., Koike, M., and Shibata, M. (2008). Autophagic neuron death in neonatal brain ischemia/hypoxia. *Autophagy* 4, 404-408.
- Uchiyama, Y., Koike, M., Shibata, M., and Sasaki, M. (2009). Autophagic neuron death. *Methods Enzymol* 453, 33-51.
- Urbach, A., and Benvenisty, N. (2009). Studying early lethality of 45,XO (Turner's syndrome) embryos using human embryonic stem cells. *PLoS One* 4, e4175.
- Valdimarsdottir, G., and Mummery, C. (2005). Functions of the TGFbeta superfamily in human embryonic stem cells. *Apms* 113, 773-789.
- Vallier, L., Alexander, M., and Pedersen, R. A. (2005). Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 118, 4495-4509.



Verlinsky, Y., Strelchenko, N., Kukhareno, V., Rechitsky, S., Verlinsky, O., Galat, V., and Kuliev, A. (2005). Human embryonic stem cell lines with genetic disorders. *Reprod Biomed Online* 10, 105-110.

Vermersch, P., Sergeant, N., Ruchoux, M. M., Hofmann-Radvanyi, H., Watzet, A., Petit, H., Dwailly, P., and Delacourte, A. (1996). Specific tau variants in the brains of patients with myotonic dystrophy. *Neurology* 47, 711-717.

Vlachopapadopoulou, E., Zachwieja, J. J., Gertner, J. M., Manzione, D., Bier, D. M., Matthews, D. E., and Slonim, A. E. (1995). Metabolic and clinical response to recombinant human insulin-like growth factor I in myotonic dystrophy--a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 3715-3723.

Wagner, K. R., Fleckenstein, J. L., Amato, A. A., Barohn, R. J., Bushby, K., Escolar, D. M., Flanigan, K. M., Pestronk, A., Tawil, R., Wolfe, G. I., *et al.* (2008). A phase I/II trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy. *Ann Neurol* 63, 561-571.

Walter, M. C., Reilich, P., Lochmuller, H., Kohnen, R., Schlotter, B., Hautmann, H., Dunkl, E., Pongratz, D., and Muller-Felber, W. (2002). Creatine monohydrate in myotonic dystrophy: a double-blind, placebo-controlled clinical study. *J Neurol* 249, 1717-1722.

Wang, G., Zhang, H., Zhao, Y., Li, J., Cai, J., Wang, P., Meng, S., Feng, J., Miao, C., Ding, M., *et al.* (2005). Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Biochem Biophys Res Commun* 330, 934-942.

Wang, G. S., Kearney, D. L., De Biasi, M., Taffet, G., and Cooper, T. A. (2007). Elevation of RNA-binding protein CUGBP1 is an early event in an inducible heart-specific mouse model of myotonic dystrophy. *J Clin Invest* 117, 2802-2811.

Wang, G. S., Kuyumcu-Martinez, M. N., Sarma, S., Mathur, N., Wehrens, X. H., and Cooper, T. A. (2009). PKC inhibition ameliorates the cardiac phenotype in a mouse model of myotonic dystrophy type 1. *J Clin Invest* 119, 3797-3806.

Wang, J., Pegoraro, E., Menegazzo, E., Gennarelli, M., Hoop, R. C., Angelini, C., and Hoffman, E. P. (1995). Myotonic dystrophy: evidence for a possible dominant-negative RNA mutation. *Hum Mol Genet* 4, 599-606.

Wang, Y. H. (2007). Chromatin structure of repeating CTG/CAG and CGG/CCG sequences in human disease. *Front Biosci* 12, 4731-4741.

Wansink, D. G., van Herpen, R. E., Coerwinkel-Driessen, M. M., Groenen, P. J., Hemmings, B. A., and Wieringa, B. (2003). Alternative splicing controls myotonic dystrophy protein kinase structure, enzymatic activity, and subcellular localization. *Mol Cell Biol* 23, 5489-5501.

Wei, M. L., Memmott, J., Screaton, G., and Andreadis, A. (2000). The splicing determinants of a regulated exon in the axonal MAP tau reside within the exon and in its upstream intron. *Brain Res Mol Brain Res* 80, 207-218.

Wei, Y., Qu, M. H., Wang, X. S., Chen, L., Wang, D. L., Liu, Y., Hua, Q., and He, R. Q. (2008). Binding to the minor groove of the double-strand, tau protein prevents DNA from damage by peroxidation. *PLoS One* 3, e2600.

Weinrich, S. L., Pruzan, R., Ma, L., Ouellette, M., Tesmer, V. M., Holt, S. E., Bodnar, A. G., Lichtsteiner, S., Kim, N. W., Trager, J. B., *et al.* (1997). Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT. *Nat Genet* 17, 498-502.

Wheeler, T. M. (2008). Myotonic dystrophy: therapeutic strategies for the future. *Neurotherapeutics* 5, 592-600.

Wheeler, T. M., Krym, M. C., and Thornton, C. A. (2007a). Ribonuclear foci at the neuromuscular junction in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord* 17, 242-247.



- Wheeler, T. M., Lueck, J. D., Swanson, M. S., Dirksen, R. T., and Thornton, C. A. (2007b). Correction of CIC-1 splicing eliminates chloride channelopathy and myotonia in mouse models of myotonic dystrophy. *J Clin Invest* *117*, 3952-3957.
- Winblad, S., Mansson, J. E., Blennow, K., Jensen, C., Samuelsson, L., and Lindberg, C. (2008). Cerebrospinal fluid tau and amyloid beta42 protein in patients with myotonic dystrophy type 1. *Eur J Neurol* *15*, 947-952.
- Wood, M. J., Gait, M. J., and Yin, H. RNA-targeted splice-correction therapy for neuromuscular disease. *Brain* *133*, 957-972.
- Woodgett, J. R. (1990). Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *Embo J* *9*, 2431-2438.
- Xiao, L., Yuan, X., and Sharkis, S. J. (2006). Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells. *Stem Cells* *24*, 1476-1486.
- Xu, C., Inokuma, M. S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J. D., and Carpenter, M. K. (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* *19*, 971-974.
- Xu, C., Rosler, E., Jiang, J., Lebkowski, J. S., Gold, J. D., O'Sullivan, C., Delavan-Boorsma, K., Mok, M., Bronstein, A., and Carpenter, M. K. (2005). Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. *Stem Cells* *23*, 315-323.
- Yadava, R. S., Frenzel-McCardell, C. D., Yu, Q., Srinivasan, V., Tucker, A. L., Puymirat, J., Thornton, C. A., Prall, O. W., Harvey, R. P., and Mahadevan, M. S. (2008). RNA toxicity in myotonic muscular dystrophy induces NKX2-5 expression. *Nat Genet* *40*, 61-68.
- Yamanaka, S. (2009). A fresh look at iPS cells. *Cell* *137*, 13-17.
- Yang, C., Di, W., and Zhang, F. X. [Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider, Jack W. Szostak]. *Yi Chuan* *32*, 1-3.
- Yang, L., Soonpaa, M. H., Adler, E. D., Roepke, T. K., Kattman, S. J., Kennedy, M., Henckaerts, E., Bonham, K., Abbott, G. W., Linden, R. M., *et al.* (2008). Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature* *453*, 524-528.
- Yotova, V., Labuda, D., Zietkiewicz, E., Gehl, D., Lovell, A., Lefebvre, J. F., Bourgeois, S., Lemieux-Blanchard, E., Labuda, M., Vezina, H., *et al.* (2005). Anatomy of a founder effect: myotonic dystrophy in Northeastern Quebec. *Hum Genet* *117*, 177-187.
- 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.
- Zeesman, S., Carson, N., and Whelan, D. T. (2002). Paternal transmission of the congenital form of myotonic dystrophy type 1: a new case and review of the literature. *Am J Med Genet* *107*, 222-226.
- Zeng, X., and Rao, M. S. (2007). Human embryonic stem cells: long term stability, absence of senescence and a potential cell source for neural replacement. *Neuroscience* *145*, 1348-1358.
- Zhang, L., Lee, J. E., Wilusz, J., and Wilusz, C. J. (2008). The RNA-binding protein CUGBP1 regulates stability of tumor necrosis factor mRNA in muscle cells: implications for myotonic dystrophy. *J Biol Chem* *283*, 22457-22463.
- Zhang, S. C., Wernig, M., Duncan, I. D., Brustle, O., and Thomson, J. A. (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* *19*, 1129-1133.
- Zheng, J. K., Wang, Y., Karandikar, A., Wang, Q., Gai, H., Liu, A. L., Peng, C., and Sheng, H. Z. (2006). Skeletal myogenesis by human embryonic stem cells. *Cell Res* *16*, 713-722.



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.

Zwaka, T. P., and Thomson, J. A. (2003). Homologous recombination in human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 21, 319-321.



# **Article I**

## **GENE EXPRESSION PATTERNS ASSOCIATED WITH ALTERNATIVE FATE COMMITMENT OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS TOWARDS NEURAL OR MESODERMAL LINEAGES**

Jérôme Denis, Christelle Rochon-Beaucourt, Benoite Champon, Geneviève Pietu

**(Article Soumis)**

**Les figures supplémentaires ne sont pas incluses dans cette version en raison de leurs tailles importantes.**



## ABSTRACT

Human embryonic stem cells can be differentiated along different lineages, providing the possibility of a precise analysis of genes profiles associated with specific commitments.

Subtractive gene expression profiling between differentiated and undifferentiated cells provides lists of potential actors in this commitment. This combines, however, genes that are specifically associated with development and others that are overexpressed as a result of non-lineage-specific differentiation systems. As a way to establish gene profiles associated with the neural and/or to the mesodermal commitments of human embryonic stem cells more precisely, we have carried out a two-step analysis. We first performed a subtractive analysis of gene profiles of each of these lineages as compared to the undifferentiated stage. Then, we extended the analysis by comparing the two sets of results with each other. This strategy has allowed us to eliminate large numbers of genes that were overexpressed in both sets of results and to uniquely associate different gene networks with either the neural or the mesodermal commitments.



## INTRODUCTION

For one decade, human embryonic stem cells (hES) have been recognized as a valuable model for studies of early the steps of human development since the acquisition of a defined phenotype *in vitro* follows sequential activation of gene networks and epigenetic changes that closely mimic events occurring *in vivo* during embryogenesis. Despite the absence of 3-dimensional organisation *in vitro*, hES have proved to be a valuable model for studies of early steps in human development since the acquisition of a specific phenotype *in vitro* follows sequential activation of gene networks and epigenetic changes that closely mimic events which occur *in vivo* during embryogenesis<sup>1-4</sup>.

Identification of culture conditions that specifically direct hES toward unique phenotypes provides new ways to analyse molecular correlates of early developmental transition phases.

One of the major technical advances for the study of such transitions is the development of efficient technologies which enable monitoring gene expression at the level of the whole genome. Analysis of how genes are controlled during transition toward a dedicated developmental path is of particular relevance but is restricted mainly by the ability to obtain homogeneous populations of cells because the phenotypes of cells are continuously changing. Despite this, several studies clearly demonstrate that such approaches can useful information about gene expression in the developmental processes.

Over the last few years, important efforts focused on the possibility of controlling the differentiation of hES *in-vitro*, as it is now well established that hES could be driven efficiently in a way that would closely mimic the physiological which occur *in vivo*.

For neural fate, using protocols based on the co-culture of hES with defined stromal cell lines exhibiting neural inducing activity, it is possible to directly visualize the process of neural



conversion by forming neural tube-like structures named neural rosettes<sup>5-8</sup>. These neuroectodermic clusters of cells are greatly enriched in neural progenitor cells (NPC) which have the ability to differentiate into various subtypes of neurons, astrocytes and oligodendrocytes<sup>9</sup>.

Although this system of culture is considered to be relevant for neural induction, neural cells differentiated *in vitro* from hES are widely heterogeneous, probably due to no synchronized processes<sup>10</sup>. Consequently, neural rosettes represent structures which contain a mixture of cells, including neuroepithelial progenitor cells (NEPC), neural stem cells (NSC), committed neurons at different stages of their development and probably neural crest derivatives at their periphery. For this reason, several groups have attempted to develop cell selection strategies including the use of fluorescence-activated cell sorting (FACS)<sup>11</sup>. To date, the Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM/CD56) has been used to enrich cultures in neural precursors and neurons<sup>12</sup>.

The production of mesenchymal precursors has not been as widely reported as that of neural precursors. By taking advantages of the recent development of protocols triggering the differentiation of hES toward mesenchymal progenitors<sup>13-16</sup>, a near-homogenous amplifiable population exhibiting a phenotype of Mesenchymal Stem Cells (MSC) can be obtained.

In this study, we produced highly homogenous cell populations for both neural and mesenchymal precursors by engagement of the hES cells into either the neural or the mesodermal lineages. The analysis of gene expression patterns of these two populations, sharing the same genetic background, compared to the same starting population that were hES cells, using strictly identical procedures for hybridization and statistical analysis, allowed us to select genes that were modulated in opposite directions during commitment to either neural or mesenchymal fates.



After this subtractive analysis, selected genes exhibiting modulations specific for either neural or mesenchymal precursors were used to build in *silico* global gene networks and, using a comparative strategy, to determine their implications as actors in the main signalling pathways involved in early steps of human development.



## **MATERIALS AND METHODS**

### **Human ES Cells Culture**

Two hES cell lines, SA01, (XY, passage 40, Cellartis, Sweden) and VUB01 (XY, passage 80, AZ-VUB, Belgium) were maintained and propagated on a feeder layer of STO (SIM mice Thioguanine and Quabaine resistant) murine embryonic fibroblast cells inactivated by Mitomycin C (Sigma Aldrich, 2.5 µg per mL overnight at 37°C). Cells were cultured in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C in a serum replacement medium (Knock-out DMEM, 20 % Knock-out Serum Replacement (KSR), 1% Glutamax 1mM, 1% Non Essential Amino Acid (NEAA), 0.1% Beta-Mercaptoethanol (BM) 0.1% and 1% Penicillin/streptomycin (P/S), all from GIBCO) supplemented with 8ng/mL of bFGF (Invitrogen).

The culture media was changed daily and routine passages routinely performed by mechanical cutting of hES cells on a fresh feeder layer every 4-5 days.

### **Differentiation of hES cells toward NPC**

The protocol for the differentiation of hES toward neurectodermal rosettes was adapted from the Stromal Differentiation Inducing Activity as described elsewhere <sup>8</sup>. Briefly, hES cells were manually dissociated from the STO feeder layer and plated at a density of approximately 10<sup>3</sup> cells per cm<sup>2</sup> on a confluent layer of mitotically inactivated murine stromal feeder cells (MS5). Cells were cultured in KSR medium (Knock-out DMEM, 15 % KSR; 1% Glutamax; 1% NEAA and 0.1% BM, all from GIBCO) for 14-16 DIV (Days *In Vitro*), when the medium was replaced by Neurobasal medium, N2 (DMEM-F12+ Glutamax, 1% N2 supplement and 1% P/S) until DIV21.

### *Cell sorting*



Cells were harvested at DIV21 using TrypLE Express (GIBCO) and about  $5 \cdot 10^6$  cells were suspended in PBS-2% Fetal Calf Serum containing 1% 7-amino-actinomycin D (7AAD) (Sigma) and then incubated with IgG1 $\kappa$  Direct conjugated Phyco-erythrin (PE) monoclonal anti human Neural Cell Adhesion Molecule (hNCAM) antibody diluted 1/10 provided by BD Biosciences Pharmingen™. This antibody recognizes an extracellular immunoglobulin-like domain common to three molecular weight forms –Mw 120, 140 and 180 kilodaltons –of the NCAM protein. The cell sorting was performed by a MoFlow Cell Sorter Cytometer from Cytomation and positive and negative fractions were collected in 1mL of N2 medium with 1% P/S.

#### *Differentiation of NCAM+ cells toward neurons and astrocytes*

After sorting, the NCAM+ cells were seeded on Poly-Ornithine (15 $\mu$ g/mL, Gibco)/laminin (1mg/mL, Sigma) coated dishes ( $50 \times 10^3$  /cm<sup>2</sup>) in N2 medium supplemented with growth factors bFGF (20ng/ml, Invitrogen), and EGF (10ng/ml, Abcys) to allow their proliferation for 10- 15 days. The medium was changed every two days. When confluent, they were passaged (P1) after exposure to collagenase 1mg/ml for 15 minutes at 37°C and plated in N2 medium supplemented for differentiation toward either neurons or astrocytes. For neuronal differentiation, BDNF (10 ng/mL) and AA ascorbic acid (10 ng/mL) was added in the N2 medium which was changed every 2-3 days for 2 weeks after which the cells were fixed. For differentiation toward astrocytes, medium was supplemented with EGF and CNTF (20ng/ml, R&D) for 15 days. After that, they were passaged and maintained in N2 medium containing only CNTF until around 100 DIV and then fixed for immunochemistry.



## **Differentiation of hES cells toward MPC**

Mesodermal differentiation was obtained based on a protocol described by Barberi *et al*<sup>13</sup>. Briefly, differentiation was induced by plating  $2 \times 10^4$  ES cells/cm<sup>2</sup> on 0.1% gelatin coated dishes in the presence of KO-DMEM medium supplemented with 20% Fetal Bovine Serum (FBS, Invitrogen), 1mM L-glutamine, 1% NEAA, 1% P/S and 0.1mM BM. Medium was changed every 3 days. Confluent cells were passed with trypsin/EDTA 1X (Invitrogen) in new gelatine coated dishes.

Immunophenotyping was carried out using a FACScalibur and the Cell Quest software (Becton&Dickinson Biosciences). More than 10,000 events were acquired for each sample and analysed. Cells were harvested as previously described and incubated for 30 minutes at room temperature with one of the following anti-human antibodies: CD73-PE (SH3/NT5E), CD44-PE, CD54-PE (I-CAM-1), CD29-PE (integrin  $\beta$ 1), CD106-PE (VCAM), CD166-PE (ALCAM), CD14-PE, CD31-PE (PECAM-1), CD56-PE (NCAM), HLA-ABC-PE, HLA-DR-PE, CD34-APC, CD45-FITC (all from Becton&Dickinson Biosciences/Pharmingen); CD105-PE (SH2/Endoglin; Caltag); Nestin-PE (R&D systems) and primary monoclonal antibody vimentin and Stro1 were used with mouse IgG- or IgM-Alexa as secondary antibody. Mouse isotype antibodies served as respective controls (Becton&Dickinson). The acquisition was performed by the FACScalibur cytometer and data were analyzed with Cell Quest Pro Software (Beckton-Dikinson).

## **Immunocytochemistry**

Cells were fixed in paraformaldehyde for 20 minutes at room temperature, rinsed with PBS and blocked with 1% BSA, 5% goat serum 0,1% triton in PBS solution for 1 hour and thereafter



were incubated with the appropriate primary antibodies overnight at 4°C. Rabbit polyclonal antibodies included Nestin (dilution 1/500; Chemicon) and GFAP (dilution 1/1000; DAKO). Mouse Monoclonal antibodies (IgG) included TujI (dilution 1/500, Covance), Stro-1 (dilution 1:100) and SMA (alpha smooth muscle: 1:100, DAKO). Appropriate Alexa 488 and Alexa 555 labeled secondary antibodies were used at 1/500 and 4',6-diamino-2-phenylindole at 2µg/ml (Sigma) for counterstaining.

The preparations were analyzed by epifluorescence microscopy (Zeiss Imager Z1 and Zeiss Axiovert 40CFL) and images were captured with AxioCam mRM (Zeiss).

### **RNA Sample preparation**

mRNA samples were extracted using the RNeasy Mini kit (Qiagen) according to the manufacturing protocols for undifferentiated hES cells, NPC and MPC. RNA samples were quantified using the Nanodrop photometer and quality controls were performed on BioAnalyzer 2100 (Agilent). For RT-PCR analysis, cDNAs were prepared by reverse transcription of 500 ng of mRNA using the SuperScript II Reverse Transcriptase kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Primers used in this study are shown in Supplementary Table S1. Quantitative RT-PCR analyses were performed with Chromo4 Analyser (Biorad) and calculations were performed using the delta-delta C(t) method.

### **Hybridization and data analysis**

RNA samples were labeled and hybridized on the GeneChip Human Genome HG\_U133\_Plus 2.0 Array (Affymetrix) by the RNG platform (Réseau National des Génopoles, Paris, France) according to the Affymetrix procedures.

Hybridization data were exploited using Array Assist 4.2 software (Stratagene). First, the software validated the quality controls. Next, the GC-RMA statistical algorithm procedure was



used to normalize hybridization intensity values. A one way-ANOVA test was applied on transformed logarithm base 2 data to retain values that did not change significantly ( $\alpha < 0.05$ ) among triplicate samples. Identification of modulated genes was performed using the Student parametric statistical test adjusted with the FDR Benjamini-Hodgberg correction. A gene was considered as modulated for a Fold Change (FC)  $> 2$  with a corrected p-value,  $\alpha_c < 0.05$ .

The final list of modulated genes was established by removing duplicate data (multiple probesets measuring the same gene) to retain the most modulated one.

GO biological processes and canonical pathways analysis enriched in differentially expressed genes were identified using the Fischer exact test as implemented in the Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity<sup>®</sup> Systems, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)) software.



## RESULTS

Two hES cell lines (SA\_01 and VUB\_01) were induced in triplicate toward the neural lineage using the SDIA protocol (see Material and Methods). Under these conditions, neural rosettes appeared around 16-18 days *in vitro* (DIV) (Supplementary Figure S1). To get a homogenous population, cell sorting was performed at DIV21 using the membrane marker Neural Cell Adhesion molecule (NCAM) known to be expressed in neural precursors but not expressed in MS5 mouse feeder cells and to a small extent in the undifferentiated hES cells. The NCAM positive cells, termed NPC, expressed a combination of markers known to be specific for the neuroectodermic precursors such as NESTIN and the transcription factors *SOX1*, *PAX6* and *OTX2*. Moreover, the NCAM positive cells exhibited a complete loss of *NANOG* expression, and did not express *GFAP* (Glial Fibrillary Acidic Protein) by RT-PCR or by immunocytochemistry (Supplementary Figure S1). The NCAM positive cell population was able to give rise to cells positive for TUJ1 ( $\beta$ III-tubulin) and for GFAP corresponding to neurons and astrocytes respectively.

Differentiation of ES cells into mesenchymal precursors (MPC) displaying a phenotype similar to that described by previous authors<sup>13-16</sup> was readily obtained after about 30 days of culture (two to three passages). Cells displayed a homogeneous fibroblast-like morphology (Supplementary Figure S2). At near homogeneity, they expressed CD29 ( $\alpha$ 1-integrin), CD44 (H-CAM), CD73 (SH-3, ecto-5'-nucleotidase), CD105 (SH-2, endoglin), CD166 (ALCAM), and were negative for hematopoietic markers (CD34, CD45 and CD14), neuronal markers (NCAM/CD56 and FORSE1), and the endothelial marker CD31. Cells were immunoreactive for Stro1 and  $\alpha$ -SMA (alpha smooth muscle actin) (Supplementary Figure S2).



## Global analysis of gene expression

To compare the expression patterns during the commitment of hES toward the neural and the mesenchymal fates, transcriptome analysis was performed in triplicate on the two undifferentiated hES cell lines SA01 and VUB01 and the two progenitor cell populations, NPC and MPC (Figure 1A). The global expression profiles of these three populations were compared by correlation plot and by the Principal Component Analysis (PCA). A high correlation coefficient was observed between the expression patterns of the three replicates for each cell line and between the two cell lines indicating a small variability between the biological samples for the same stage of differentiation (Figure 1B). Moreover, when the three distinct populations were plotted by PCA, samples for the same stage were very close (Figure 1C). This allowed us to group the results obtained for the two cell lines for further statistical analysis. A total of 3167 genes were found to be differentially expressed between NPC and hES cells, 1727 up-regulated and 1440 down-regulated (Supplementary Tables S2 and S3), including genes with no annotation, putative genes and expressed sequence tags (EST) that amounted to about a quarter of all modulated genes.

Parallel comparison between hES and MPC, revealed 5931 genes modulated including 2212 genes up-regulated and 3719 genes down-regulated in MPC (Supplementary Tables S3 and S4).

As expected, major markers of pluripotent hES cells including *NANOG*; *OCT4 [POU5F1]*; *REX1 [ZFP42]*; *FGF4*; *FOXD3*; *CLDN6*; *GDF3*; *DNMT3A* and *CD2* were down-regulated in both NPC and MPC. The expression of the pluripotency transcription factor *SOX2*, was maintained in neural progenitors whereas it was switched off in mesenchymal progenitors.

In NPC cells, *NCAM*, *PAX6*, *SOX1* and *OTX2* were found up-regulated. On the contrary, neither markers of mesoderm such as T/Brachyury, *HAND1*, *IGF2*, *CD45*, *FLK1*, *CD31*,



*MYOD*, *CALP* [Calponin] nor endodermal markers *SOX17*, *FOXA2*, *GATA4*, *AFP* were found modulated. Conversely, genes known to be implicated in the MSC phenotype, *CD73/NT5E*, *CD105/ENDOGLIN*, *CD44*, *INTEGRIN  $\beta$ 1/ITGB1*, *ALCAM/CD166* and *VIMENTIN*, were found to be up-regulated in MPC.

### **Subtractive gene expression profiling**

The lists of the modulated genes in the NPC and the MPC cell populations were compared (Figure 1D). The 785 genes which are up-regulated in NPC but not in MPC (Supplementary Table S6) and the subset of 306 genes which were up-regulated in NPC and down-regulated in MPC were selected as potential candidate genes involved in the neuralizing process (Supplementary Table S7).

Conversely, the 1479 genes which are up-regulated in MPC but not in NPC (Supplementary Table S8) and the subset of 94 genes which were up-regulated in MPC and down-regulated in NPC were selected as potential candidate genes involved in the mesenchymal differentiation (Supplementary Table S9).

Among the two selections of genes specifically implicated in the neuralization process or in the mesenchymal differentiation, we focused on transcription regulators which were up-regulated in both processes (Table 1). For the neuralization process, among the 127 up-regulated transcription regulators (Table 1, left panel), for the eleven most modulated genes with a FC > 10, eight were annotated in nervous system development (GO and IPA classifications) and genes such as *LHX2*, *PAX6*, *ZIC1*, *FOXP1B*, *TFAP2B*, *ZBTB16* and *EMX2* are implicated in the neural progenitor signature. Besides these genes, others were annotated to be involved in neural and other developmental processes, such *DACHI* and *LEF1* in neural tube development



or the Inhibitor of DNA binding members (*ID2* and *ID4*), POU domain family members (*POU3F2* and *POU4F1*) but also the homeobox family members HOX (*HOXA1* and *HOXA9*). In addition, genes found to be up-regulated in NPC and strongly down-regulated in MPC included SRY-related box protein members such as *SOX3* and *SOX11* which are also involved in neurogenesis as well as *OTX2* which encodes a member of the bicoid sub-family of homeodomain-containing transcription factors.

For the mesenchymal differentiation of the 118 up-regulated transcription regulators (Table 1, right panel), 25 were implicated in connective tissue development (IPA classification). The most modulated genes were *SIX1* which encodes of the homeobox gene superfamily and two genes related to TGF-beta signalling were highly up-regulated, *CDKN2B* and *TGF1B111*.

Other modulated genes involved in development included several members of the Forkhead-box family (*FOXD1*, *FOXF1*, *FOXF2*, *FOXJ2*, *FOXL1* and *FOXP1*), the basic helix-loop-helix family (*BHLHE40* and *BHLHE4*), the Kruppel-like factors (*KLF2*, *KLF7* and *KLF9*), signal transducers and activators of transcription (*STAT1*, *STAT2*, *STAT3* and *STAT6*), T-box members (*TBX2* and *TBX3*) and homeobox family members (*HOXB2* and *HOXB7*).

### **Transcriptional networks using an *in silico* approach**

Global gene networks were built based on selected genes exhibiting specific overexpression in each precursor, as described above, for either the neural (Figure 2A) or the mesenchymal differentiation (Figure 2B).

Starting from the core pluripotency gene network composed of the three transcription factors, *NANOG*, *OCT4* and *SOX2*, their potential targets were explored by selecting genes that were specifically up-regulated in each precursor cell population.



For the neural gene network, the starting point was the binding relationship of binding existing between the *PAX6* and *LHX2* promoters and NANOG, OCT4 and SOX2 proteins. Using this strategy, the construction of the gene network step by step revealed some nodes that included key transcription factors including downstream *NOTCH1* targets such as *HES1 HES5*, *LEF1* but also *SOX10* that may support a pivotal role with its complex partner *PAX3*. *NOTCH1* downstream signal was also connected with the SWI/SNF DNA remodelling complex (*SMARCC4* and *SMARCE1*).

For the mesenchymal gene network, *WWTR1* (also termed TAZ) implicated downstream of *TGFBI*, acted on the level of expression of *NANOG* and *POU5F1* and thus may control several developmental genes including *GATA6*. Moreover, *SOX2* (whose expression was maintained in neural but greatly decreased in mesenchymal differentiation) was connected with two critical genes involved in osteogenic differentiation, *JUN* and *TWIST1*. Organisation of the network also included *PPARG* which is involved in differentiation of mesenchymal stem cells toward adipocytes and *STAT3* which acts downstream of the FGF signalling pathway and is involved in differentiation process.

### **Alternative signalling pathways controlling cell fate decisions**

Levels of gene expression were explored in three signalling pathways, Notch, Wnt, and TGFβ/Activin/BMP that are involved in hES cell fates determination but involve different partners in a lineage-specific manner.

#### *Notch Signalling pathway*

Some genes encoding for ligands of Notch, such as *JAG1* and *DLL1* were found to be up-regulated in the NPC but not in the MPC cells (Figure 3A and 3B). *NOTCH1* was specifically up-regulated in the NPC cells whereas *NOTCH2* was found up-regulated in both progenitor cell



types. Genes involved in the modulation of the activity of NOTCH signalling such as *LFNG* was up-regulated in NPC cells whereas the expression of *NUMB*, a gene encoding for an inhibitor of the Notch pathway was found increased specifically during the mesenchymal differentiation. *HES1* and *HES5* were up-regulated only in NPC cells. On the contrary, some downstream genes presented similar expression profiles in the two progenitor cell types, such as *HEY1* and *HEY2*. Specific overexpression of *DLL1*, *NOTCH1*, *HES1* and *HES5* in NPC compared to hES and MPC was confirmed by quantitative RT-PCR (Figure 3C).

#### *Wnt Signalling pathway*

Most of the genes involved in the Wnt signalling pathway up-regulated in the NPC encoded negative regulators of this canonical pathway whereas genes modulated in MPC cells reflected its activation (Figure 4A and 4B). The up-regulated of Wnt inhibitors included secreted antagonists such as *DKK1*, *SFRP2* and *FRZB*. In contrast, *SFRP2* was strongly down-regulated during the differentiation of hES toward a mesenchymal fate. In addition, genes encoding for Wnt ligands such as *WNT2B*, reported to be a repressor of the canonical pathway, appeared to be specifically up-regulated in NPC cells whereas *WNT5A* and *WNT5B*, two non canonical ligands, were found to be modulated in the two types of progenitors and may be less specific. For the Wnt Receptors, notably Frizzled proteins, *FZD3* and *FZD5* were found up or not regulated in neural progenitors whereas they were switched off in mesenchymal progenitors. Genes involved in the repression of the  $\beta$ -catenin complex were found to be up-regulated only in NPC such as the SOX transcription factor *SOX3* but also *CTNNBIP1*, a gene encoding a small soluble inhibitory protein also termed *ICAT* (Inhibitory of beta-catenin and TCF) which prevents the interaction of  $\beta$ -catenin with different binding partners including *LEF1*. In addition, the gene encoding for the transcription repressor *TLE4*, a member of the Groucho family, was also found up-regulated only in the NPC cells. Finally, when looking for the



expression of genes known to be controlled directly downstream of the canonical  $\beta$ -catenin pathways, some genes, such as *DCT*, *POU3F2* and *NRCAM*, controlled downstream of the complex containing *LEF1* appeared to be induced in NPC cells whereas no modulation of these genes was observed in the MPC cells. On the contrary, genes encoding important mesenchymal markers such as *FOSL1*, *JUN*, *PPAR $\delta$* , *CD44* were all up-regulated in the MPC whereas the expression of these genes was not modulated in the NPC.

#### *TGF $\beta$ /Activin/BMP signalling pathway*

Among the genes involved in BMP/TGF $\beta$  signalling pathways (Figure 5A and 5B), *BMP7* expression was up-regulated during the differentiation of hESC toward NPC, whereas it was switched off during their differentiation toward MPC. In contrast, the up-regulation of inhibin beta A, *INHBA* (also termed activin A), which encoded a strong inducer of mesendoderm only in MPC, was observed. *INHBA* was confirmed by quantitative RT-PCR to be specifically up-regulated in independent samples only in MPC (Figure 5C). Differences between others modulated genes encoding for TGF-beta ligands were also found such as up- regulation of *TGFB1* specifically in MPC. An up-regulation of *SMAD3* was observed in NPC and MPC cells respectively whereas *SMAD5* was found slightly modulated only in NPC.



## DISCUSSION

The principal result of this study is the comparison of gene expression profiles in two homogenous populations of progenitors, neural and mesenchymal, by subtractive gene expression profiling during early differentiation in hES toward either neural or mesenchymal commitment. Genes whose expression is regulated in opposite directions might be of particular interest in molecular processes involved in the alternative cell fate decisions. Using a comparative strategy, we identified actors specific for each lineage which play an alternative role at the level of epigenetic modifications, implication of morphogens and through major developmental signalling pathways.

The integration of all these data allowed the construction of a global comprehensive developmental path between neurectoderm and mesoderm that is summarized in the Figure 6.

### **Specific gene expression pattern associated with each precursor cell**

For neural precursors, almost all genes identified *in vivo* in neuroepithelial precursors from neural plate or neural tube in mouse such as *LHX2*, *PAX6*, *SIX3*, *SIX6*, *SOX1* and *FOXP1B*<sup>8, 17</sup> were found specifically expressed. This was also the case for genes known to play a role in neural development, including genes of the Homeobox family, particularly important for the control of the rostro-caudal axis and acting as a developmental program to define the location and the appropriate period leading to alternative transcription such as *HOXA1*, involved in the differentiation of embryonic stem cells toward neurons<sup>18, 19</sup> and in development of efferent neurons in the hindbrain<sup>20</sup>. For mesenchymal precursors, we have identified genes specifically



up-regulated that may play a role in the formation of mesoderm including *TWIST1*<sup>21, 22</sup>, which was expressed in presumptive mesoderm and in invaginating cells in the ventral region of fruitfly embryos and functions in a signalling cascade to initiate mesodermal development during gastrulation in multicellular organisms ranging from *Drosophila* to vertebrates. *TWIST* plays a central role in dorsoventral patterning, which is essential for multiple steps of mesoderm development in *Drosophila*<sup>23, 24</sup>. Another interesting gene includes *WWTR1/TAZ* which was known to control the mechanism of self-renewal<sup>25, 26</sup> and thus may contribute to the cell fate choice by controlling mesodermal genes (Varelas et al., 2008). Among other genes that may represent important developmental nodes, *RUNX2*, *SQSTM1* that are both involved in skeletal development were highlighted suggesting that early mesodermal progenitors acquire a developmental context that enhances osteogenesis.

### **Epigenetic modification signatures**

The transcriptional signature also deciphers the role of another type of developmental regulation that concerns genes involved in epigenetic modifications.

Among genes that are differentially expressed during neural or mesoderm differentiation, genes encoding helicases that function to open chromatin to enhance transcription in the SWI/SNF DNA chromatin remodeling complex family including *SMARCC1* and *SMARCE1*, were found specifically up-regulated in the neural progenitors and may interact with proteins encoded by other specific genes such as *ARID2* and *ARID1B*<sup>27, 28</sup>. These proteins may play a role in enhancing differentiation by coupling gene repression with global and local changes in chromatin structure<sup>29</sup>. In mesenchymal precursors, specific up-regulation of *SMARCA2* was observed, that has been described to be specific of mesoderm in early post-implantation mouse embryos<sup>30</sup>.



## **Morphogen implications**

Another aspect of the transcriptional signatures concerns morphogens that act through signalling pathways. *BMP7* was found to be up-regulated in neural progenitors and therefore these cells may themselves produce morphogens that contribute to control downstream genes involved in neural development including *ZIC1*<sup>31</sup> and *GLI3*<sup>32</sup>.

In MPC, the up-regulation of *INHBA* encoding the beta A subunit that forms a homodimer named Activin-A was also identified confirming that it is one of the most important mesodermal morphogens including *Xenopus laevis*<sup>33</sup>. More recently, Willems and Leyns described that Activin A (or Nodal) supported self-renewal of hES and directed the nascent mesoderm toward axial mesoderm and mesendoderm<sup>34</sup>. This increase also coincides with up-regulation of the activin receptor type 1, *ACVRI*. Inversely, inhibition of Activin/Nodal signalling promotes specification of hES into neurectoderm. Altogether, these data suggest that once the mesenchymal phenotype has been acquired, these precursors may maintain the mesodermal identity by producing themselves important morphogens themselves.

## **Alternative pathway responses**

Wnt and Notch pathway responses occurred during both neural and mesenchymal differentiation. Although discussed, different studies described a “negative” effect of WNT/ $\beta$  catenin signalling pathways onto the neural induction process *in vivo*<sup>35</sup> and *in vitro* in mouse ES<sup>36, 37</sup>. Indeed, an up-regulation of expression of some modulators/inhibitors of the Wnt signalling was observed in NPC (but not in MPC) including *SFRP2*, identified elsewhere to enhance neural differentiation<sup>36</sup> but also *FRZB*, another Wnt inhibitor found expressed in neural plate and neural tube in overlapping areas like *SFRP2* during chick development<sup>38</sup>.



During and just after gastrulation, the Wnt pathway was also involved as an inducer of primary mesenchymal cells but specific genes involved in this process are still unknown or elusive due to differences between species. In this study, we found that gene expression modulations of Wnt pathway members in mesenchymal cells but not in neural cells including *DKK3* which is both temporally and spatially regulated<sup>39</sup> may play a role in mesoderm formation in humans has been demonstrated in *Xenopus laevis*<sup>40</sup>.

Additionally, a distinct profile of genes downstream of the Wnt signalling pathway was also observed. Neural progenitors did not express numerous genes known to be controlled by *CTNNB1* whereas they were expressed in MPC. In contrast, a possible mechanism would be due to the expression of the inhibitor of the interaction of  $\beta$ -catenin with *LEF1*. Thus, *LEF1* may interact with other proteins and control a neural gene network downstream.

Concerning the Notch signalling pathway, the central role of NOTCH1 specific pathway already described was confirmed as an important path for the maintenance of the neural progenitor state<sup>41, 42</sup> whereas the down-regulation of NOTCH1 was already reported to enhance the differentiation of mesodermal cardiogenic progeny<sup>27</sup>. Here, *DLL1*, one of the NOTCH1 ligands was found highly up-regulated in NPC and may contribute to induce *HES1* and *HES5* transcription factors acting by their dominant effect on neurogenic transcription factors and therefore to delay the differentiation of neural precursors in mature neurons maintaining a “neural precursor state”. Conversely, *DLL1* was down-regulated in MPC suggesting a process that closely controls this gene during the transition toward either neural or mesoderm identity.

Some genes connected to Notch signalling were also described that may support central interactions in the global neural gene network. For example, *SOX10* that interacts with *PAX3* may reflect some features of neural crest development as demonstrated in cells surrounding



neural rosettes in culture<sup>43</sup> and in the neural crest origin of the Waardenburg syndrome in humans<sup>44</sup>. WNT inhibition pathways associated with NOTCH1 activation may be involved in expression of *LEF1* specific expression contributing to an explanation of the specific regulation of downstream neural genes such as *NRCAM*, *DCT* and *POU3F2*. Concerning the acquisition of the mesenchymal phenotype, our data suggested that the differentiation involved a developmental process mimicking the TGF $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) process. Numerous genes involved downstream of TGFbeta1 signalling pathways which have already been described as major contributors of the EMT type 1 process were found to be up-regulated<sup>45,46</sup>. During embryonic development, the EMT is a crucial cellular process whereby adherent cells dissolve their intercellular contacts, organize their motility apparatus, and move to new locations. As observed *in vivo* during the EMT, during mesenchymal differentiation of hES, we found the loss of epithelial cell adhesion markers including E-box genes including E-cadherin [CDH1] but also claudin [CLDN3/6/10/23], occludin [OCLN] and loss of some polarity genes such as Discs Large (DLG3/7)<sup>47</sup>, Crumbs homolog3 (Crb3)<sup>48</sup> and conversely the acquisition of mesenchymal markers including Fibronectin [FN1], Vimentin [VIM] and thrombospondin-1 [THBS1]. It can be postulated that TGF $\beta$ 1 signalling may reflect in part the biology of the mesenchymal progenitors. Moreover, *SIX1* a developmental gene encoding for a homeodomain transcription factor was the most up-regulated transcription regulator in MPC. It is known to cooperate with TGF $\beta$  and to increase the downstream EMT-induced TGF $\beta$  signal leading to the acquisition and/or maintenance of the stem cell-like phenotype accompanying EMT<sup>49,50</sup>.

In conclusion, based on the production of precursor cell populations at near homogeneity, our data describing modulation of gene expression should contribute to a better comprehension of gene regulations involved in fate choices during differentiation of embryonic stem cells.



## **ACKNOWLEDGEMENTS:**

The authors wish to thank Dr Marc Peschanski for continuous support and input during this study. This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM), MediCen (IngeCell program) and Genopole. We thank the platform of RNG, Institut Curie, Paris, France, for performing Transcriptome experiments, Phillippe Rameau for cell sorting, Lina Kassar-Duchossoy for astrocytes differentiation and Drs Alexandra Benchoua, Anselme Perrier and Cécile Martinat for helpful discussions.

## **AUTHORS INFORMATIONS**

The gene expression data have been deposited in GEO Data Bank with the accession number **GSE8590**.



## REFERENCES

1. Aberdam D, Gambaro K, Medawar A, et al. Embryonic stem cells as a cellular model for neuroectodermal commitment and skin formation. *C R Biol.* Jun-Jul 2007;330(6-7):479-484.
2. Rugg-Gunn PJ, Ferguson-Smith AC, Pedersen RA. Human embryonic stem cells as a model for studying epigenetic regulation during early development. *Cell Cycle.* Oct 2005;4(10):1323-1326.
3. Vallier L, Pedersen RA. Human embryonic stem cells: an in vitro model to study mechanisms controlling pluripotency in early mammalian development. *Stem Cell Rev.* 2005;1(2):119-130.
4. Abranches E, Silva M, Pradier L, et al. Neural differentiation of embryonic stem cells in vitro: a road map to neurogenesis in the embryo. *PLoS One.* 2009;4(7):e6286.
5. Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, et al. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron.* Oct 2000;28(1):31-40.
6. Schulz TC, Palmarini GM, Noggle SA, Weiler DA, Mitalipova MM, Condie BG. Directed neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *BMC Neurosci.* Oct 22 2003;4:27.
7. Li XJ, Zhang SC. In vitro differentiation of neural precursors from human embryonic stem cells. *Methods Mol Biol.* 2006;331:169-177.
8. Perrier AL, Tabar V, Barberi T, et al. Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 24 2004;101(34):12543-12548.
9. Wilson PG, Stice SS. Development and differentiation of neural rosettes derived from human embryonic stem cells. *Stem Cell Rev.* 2006;2(1):67-77.
10. Stewart MH, Bosse M, Chadwick K, Menendez P, Bendall SC, Bhatia M. Clonal isolation of hESCs reveals heterogeneity within the pluripotent stem cell compartment. *Nat Methods.* Oct 2006;3(10):807-815.
11. Pruszak J, Sonntag KC, Aung MH, Sanchez-Pernaute R, Isacson O. Markers and methods for cell sorting of human embryonic stem cell-derived neural cell populations. *Stem Cells.* Sep 2007;25(9):2257-2268.



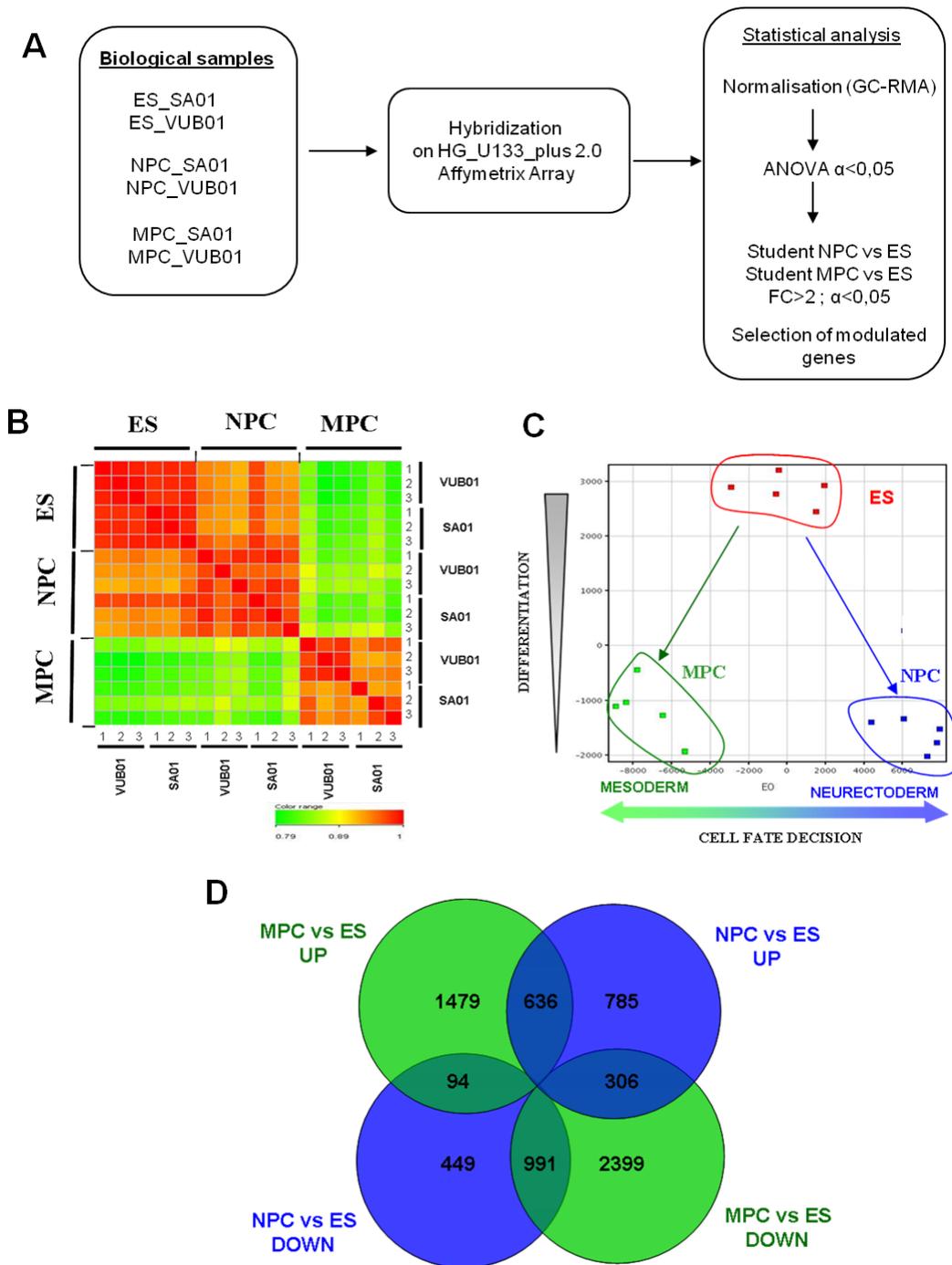
12. Carpenter MK, Inokuma MS, Denham J, Mujtaba T, Chiu CP, Rao MS. Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells. *Exp Neurol*. Dec 2001;172(2):383-397.
13. Barberi T, Willis LM, Socci ND, Studer L. Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. *PLoS Med*. Jun 2005;2(6):e161.
14. Olivier EN, Rybicki AC, Bouhassira EE. Differentiation of human embryonic stem cells into bipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. Aug 2006;24(8):1914-1922.
15. Mateizel I, De Becker A, Van de Velde H, et al. Efficient differentiation of human embryonic stem cells into a homogeneous population of osteoprogenitor-like cells. *Reprod Biomed Online*. May 2008;16(5):741-753.
16. de Peppo GM, Svensson S, Lenneras M, et al. Human Embryonic Mesodermal Progenitors Highly Resemble Human Mesenchymal Stem Cells and Display High Potential for Tissue Engineering Applications. *Tissue Eng Part A*. Mar 24.
17. Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brustle O, Thomson JA. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. Dec 2001;19(12):1129-1133.
18. Martinez-Ceballos E, Chambon P, Gudas LJ. Differences in gene expression between wild type and *Hoxa1* knockout embryonic stem cells after retinoic acid treatment or leukemia inhibitory factor (LIF) removal. *J Biol Chem*. Apr 22 2005;280(16):16484-16498.
19. Martinez-Ceballos E, Gudas LJ. *Hoxa1* is required for the retinoic acid-induced differentiation of embryonic stem cells into neurons. *J Neurosci Res*. Oct 2008;86(13):2809-2819.
20. Carpenter GA, Grossberg S. Normal and amnesic learning, recognition and memory by a neural model of cortico-hippocampal interactions. *Trends Neurosci*. Apr 1993;16(4):131-137.
21. Karreth F, Tuveson DA. Twist induces an epithelial-mesenchymal transition to facilitate tumor metastasis. *Cancer Biol Ther*. Nov 2004;3(11):1058-1059.
22. Yang J, Mani SA, Donaher JL, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*. Jun 25 2004;117(7):927-939.
23. Castanon I, Baylies MK. A Twist in fate: evolutionary comparison of Twist structure and function. *Gene*. Apr 3 2002;287(1-2):11-22.
24. Furlong EE, Andersen EC, Null B, White KP, Scott MP. Patterns of gene expression during *Drosophila* mesoderm development. *Science*. Aug 31 2001;293(5535):1629-1633.



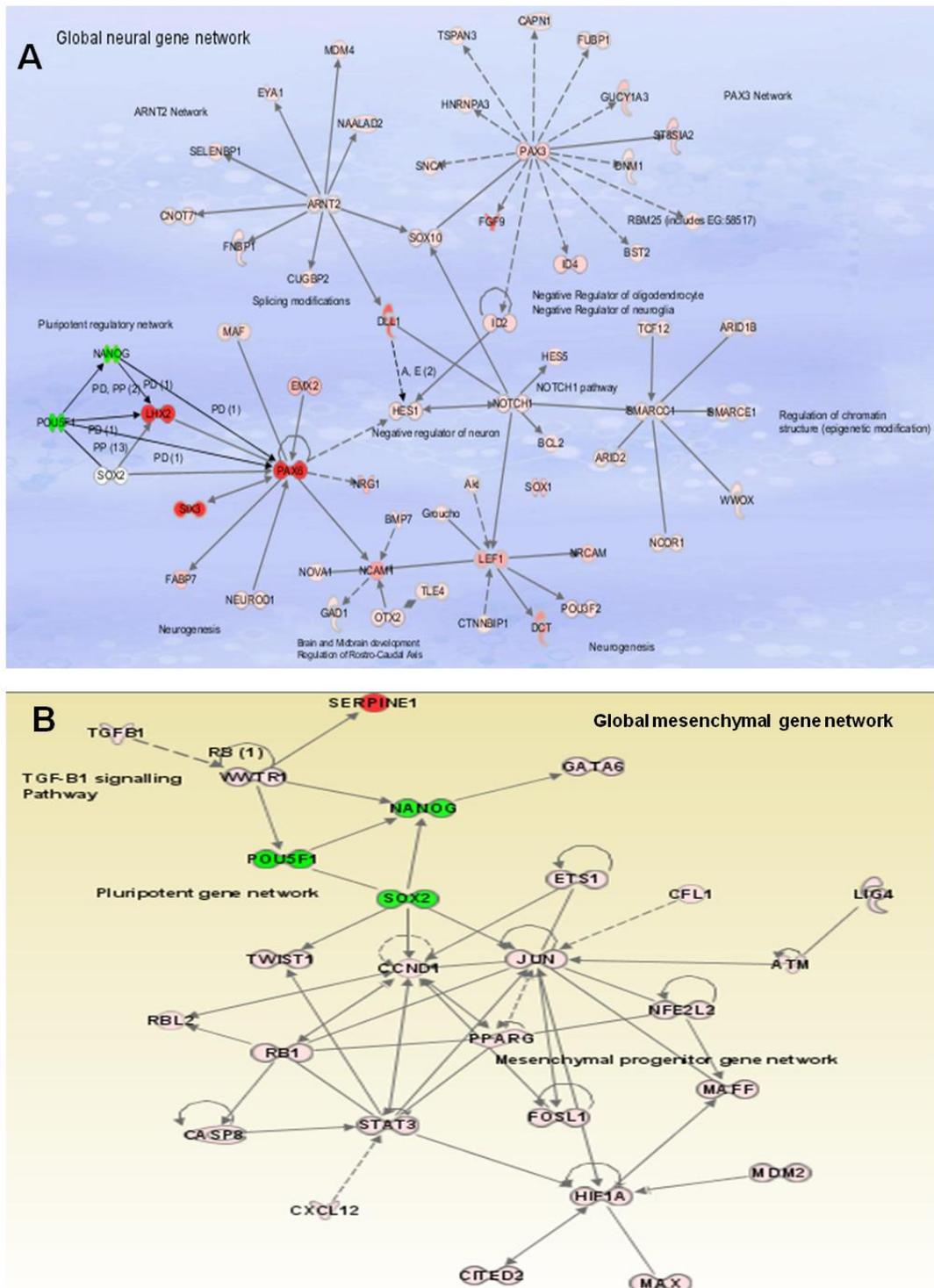
25. Hong JH, Hwang ES, McManus MT, et al. TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science*. Aug 12 2005;309(5737):1074-1078.
26. Varelas X, Sakuma R, Samavarchi-Tehrani P, et al. TAZ controls Smad nucleocytoplasmic shuttling and regulates human embryonic stem-cell self-renewal. *Nat Cell Biol*. Jul 2008;10(7):837-848.
27. Nemir M, Croquelois A, Pedrazzini T, Radtke F. Induction of cardiogenesis in embryonic stem cells via downregulation of Notch1 signaling. *Circ Res*. Jun 23 2006;98(12):1471-1478.
28. Wang X, Nagl NG, Wilsker D, et al. Two related ARID family proteins are alternative subunits of human SWI/SNF complexes. *Biochem J*. Oct 15 2004;383(Pt 2):319-325.
29. Schaniel C, Ang YS, Ratnakumar K, et al. Smarcc1/Baf155 couples self-renewal gene repression with changes in chromatin structure in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*. Dec 2009;27(12):2979-2991.
30. Dauvillier S, Ott MO, Renard JP, Legouy E. BRM (SNF2alpha) expression is concomitant to the onset of vasculogenesis in early mouse postimplantation development. *Mech Dev*. Mar 2001;101(1-2):221-225.
31. Aruga J, Tohmonda T, Homma S, Mikoshiba K. Zic1 promotes the expansion of dorsal neural progenitors in spinal cord by inhibiting neuronal differentiation. *Dev Biol*. Apr 15 2002;244(2):329-341.
32. Aruga J, Mizugishi K, Koseki H, et al. Zic1 regulates the patterning of vertebral arches in cooperation with Gli3. *Mech Dev*. Dec 1999;89(1-2):141-150.
33. Ninomiya H, Takahashi S, Tanegashima K, Yokota C, Asashima M. Endoderm differentiation and inductive effect of activin-treated ectoderm in *Xenopus*. *Dev Growth Differ*. Aug 1999;41(4):391-400.
34. Willems E, Leyns L. Patterning of mouse embryonic stem cell-derived pan-mesoderm by Activin A/Nodal and Bmp4 signaling requires Fibroblast Growth Factor activity. *Differentiation*. Sep 2008;76(7):745-759.
35. Heeg-Truesdell E, LaBonne C. Neural induction in *Xenopus* requires inhibition of Wnt-beta-catenin signaling. *Dev Biol*. Oct 1 2006;298(1):71-86.
36. Aubert J, Dunstan H, Chambers I, Smith A. Functional gene screening in embryonic stem cells implicates Wnt antagonism in neural differentiation. *Nat Biotechnol*. Dec 2002;20(12):1240-1245.
37. Kielman MF, Rindapaa M, Gaspar C, et al. Apc modulates embryonic stem-cell differentiation by controlling the dosage of beta-catenin signaling. *Nat Genet*. Dec 2002;32(4):594-605.



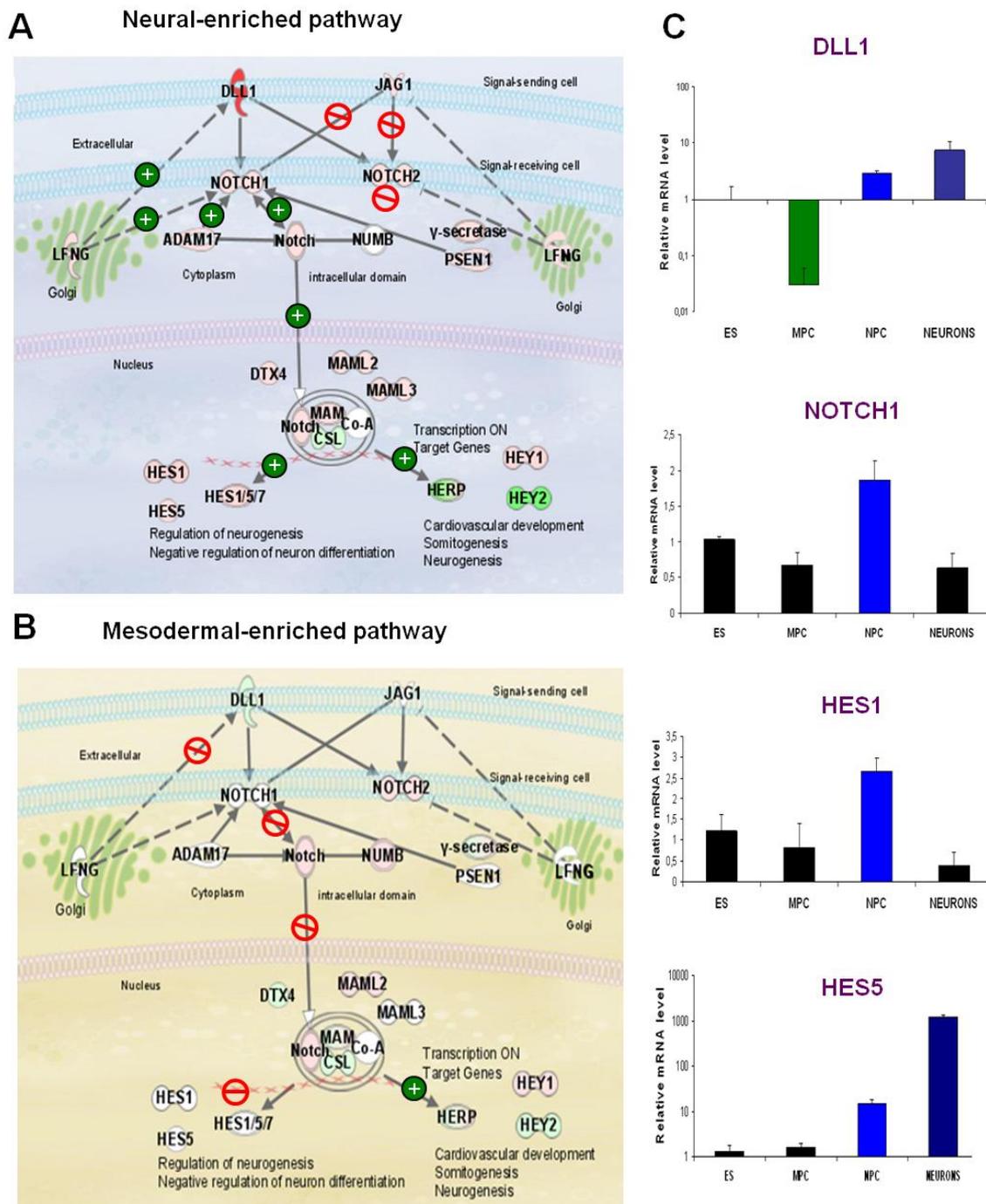
38. Ladher RK, Church VL, Allen S, et al. Cloning and expression of the Wnt antagonists Sfrp-2 and Frzb during chick development. *Dev Biol.* Feb 15 2000;218(2):183-198.
39. Monaghan AP, Kioschis P, Wu W, et al. Dickkopf genes are co-ordinately expressed in mesodermal lineages. *Mech Dev.* Sep 1999;87(1-2):45-56.
40. Pinho S, Niehrs C. Dkk3 is required for TGF-beta signaling during *Xenopus* mesoderm induction. *Differentiation.* Dec 2007;75(10):957-967.
41. Hitoshi S, Seaberg RM, Kosciuk C, et al. Primitive neural stem cells from the mammalian epiblast differentiate to definitive neural stem cells under the control of Notch signaling. *Genes Dev.* Aug 1 2004;18(15):1806-1811.
42. Lowell S, Benchoua A, Heavey B, Smith AG. Notch promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells. *PLoS Biol.* May 2006;4(5):e121.
43. Lee G, Kim H, Elkabetz Y, et al. Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* Dec 2007;25(12):1468-1475.
44. Potterf SB, Furumura M, Dunn KJ, Arnheiter H, Pavan WJ. Transcription factor hierarchy in Waardenburg syndrome: regulation of MITF expression by SOX10 and PAX3. *Hum Genet.* Jul 2000;107(1):1-6.
45. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* Jun 2009;119(6):1420-1428.
46. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol.* Mar 27 2006;172(7):973-981.
47. Cavatorta AL, Giri AA, Banks L, Gardiol D. Cloning and functional analysis of the promoter region of the human Disc large gene. *Gene.* Nov 15 2008;424(1-2):87-95.
48. Whiteman EL, Liu CJ, Fearon ER, Margolis B. The transcription factor snail represses Crumbs3 expression and disrupts apico-basal polarity complexes. *Oncogene.* Jun 19 2008;27(27):3875-3879.
49. McCoy EL, Iwanaga R, Jedlicka P, et al. Six1 expands the mouse mammary epithelial stem/progenitor cell pool and induces mammary tumors that undergo epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* Sep 2009;119(9):2663-2677.
50. Micalizzi DS, Christensen KL, Jedlicka P, et al. The Six1 homeoprotein induces human mammary carcinoma cells to undergo epithelial-mesenchymal transition and metastasis in mice through increasing TGF-beta signaling. *J Clin Invest.* Sep 2009;119(9):2678-2690.



**Figure 1 : Global gene expression patterns analysis for the hES cells (ES) and the two precursor cells, NPC and MPC derived from the same hES cells.** Schematic representation of the experimental procedure (A). Correlation plots between all arrays of the experiment hybridized with ES, NPC and MPC mRNAs ( $n=6$  per condition). (B) Correlation was normalised in a scale from  $r^2=0.79$  (green) to  $r^2=1$  (red). Principal component analysis of the three cell populations (C). Comparison of the expression profiles (D). Genes were selected as differentially expressed either between NPC vs hES or MPC vs hES for a threshold of FC (Fold change)  $>2$  and a corrected p-value  $\alpha < 0.05$ . The lists of modulated genes in all the conditions were crossed by Venn diagrams.

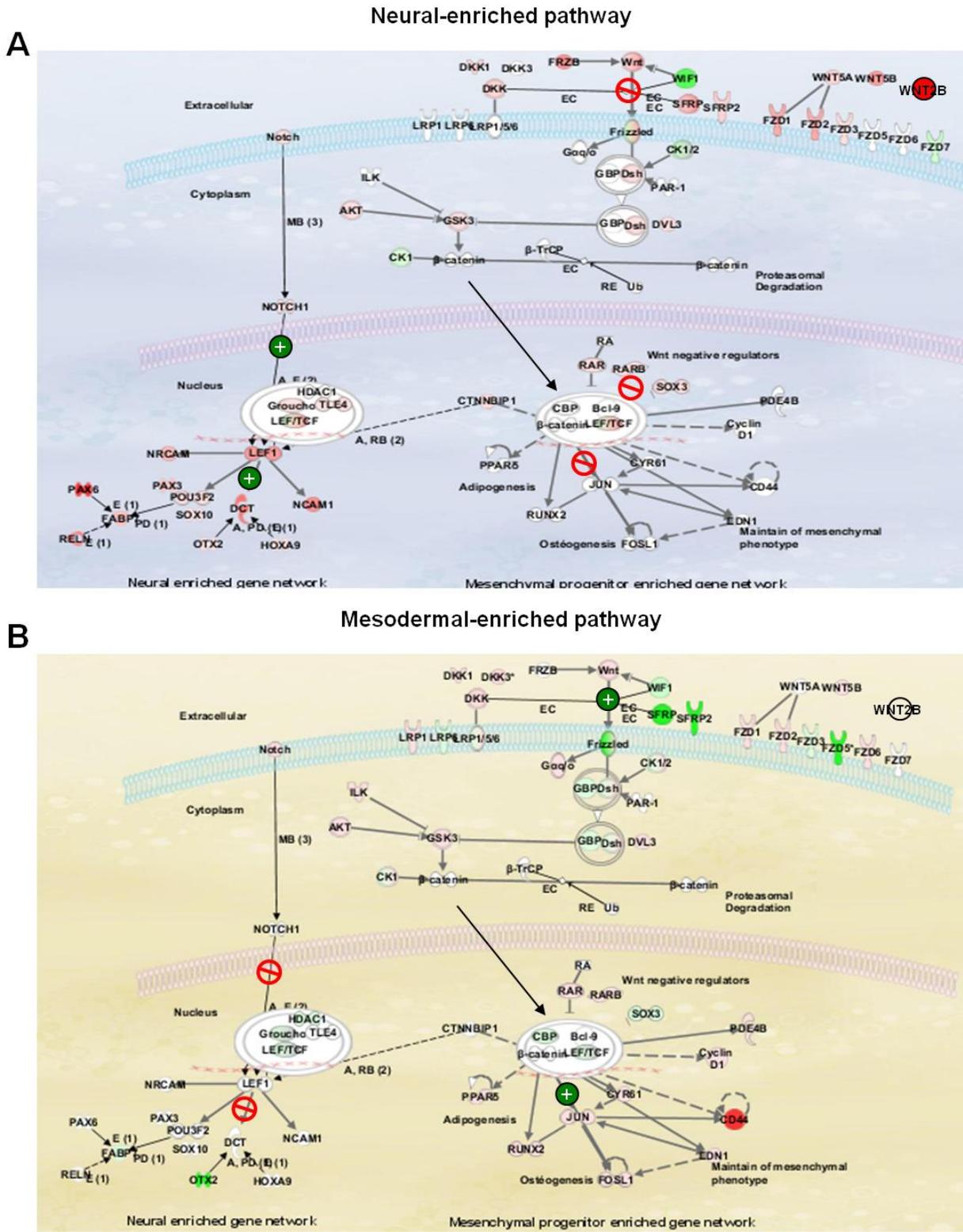


**Figure 2: Global gene networks.** Networks were constructed using the Ingenuity software based on expression relationships described in the literature. Modulated genes are represented as a box with its gene symbol inside. Global neural gene network (A) and global mesenchymal gene network (B). Genes in red were up-regulated and genes in green were down-regulated in NPC or MPC compared to hES. Colour intensities of genes were correlated to fold change intensities.

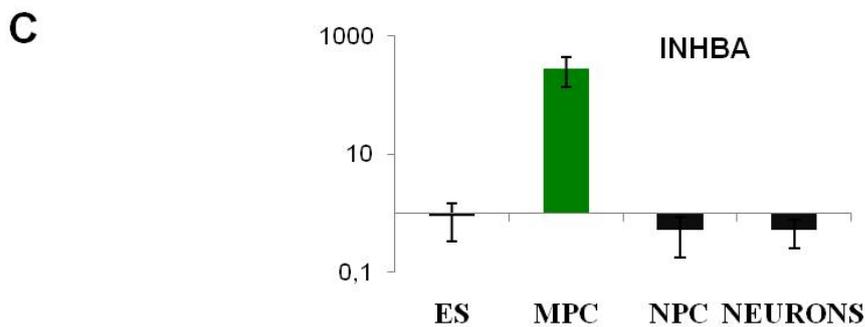
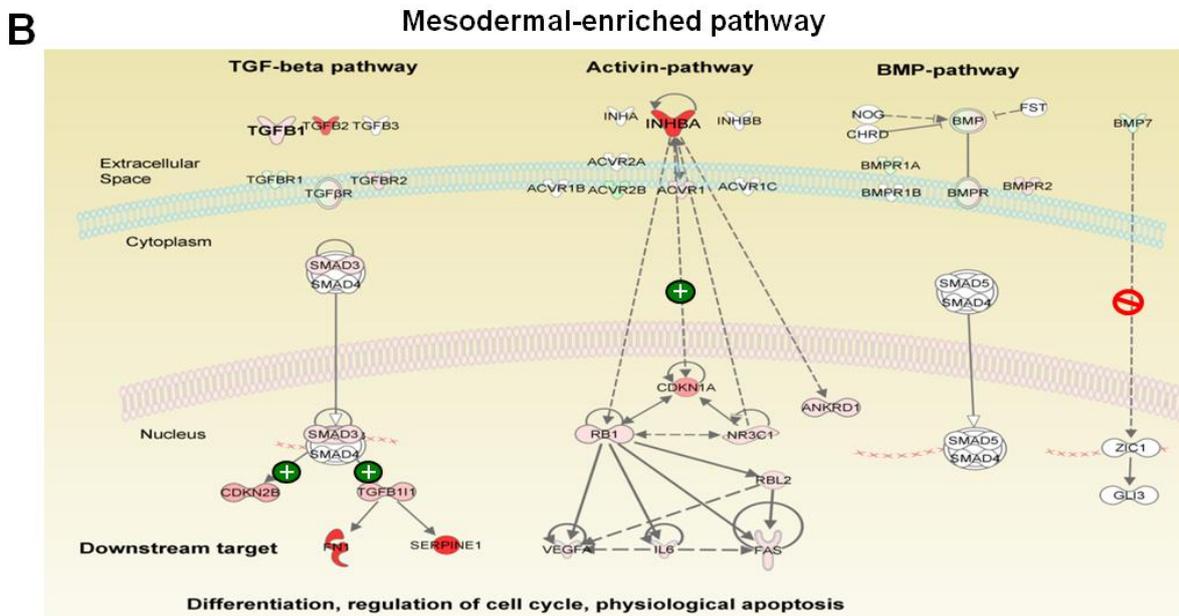
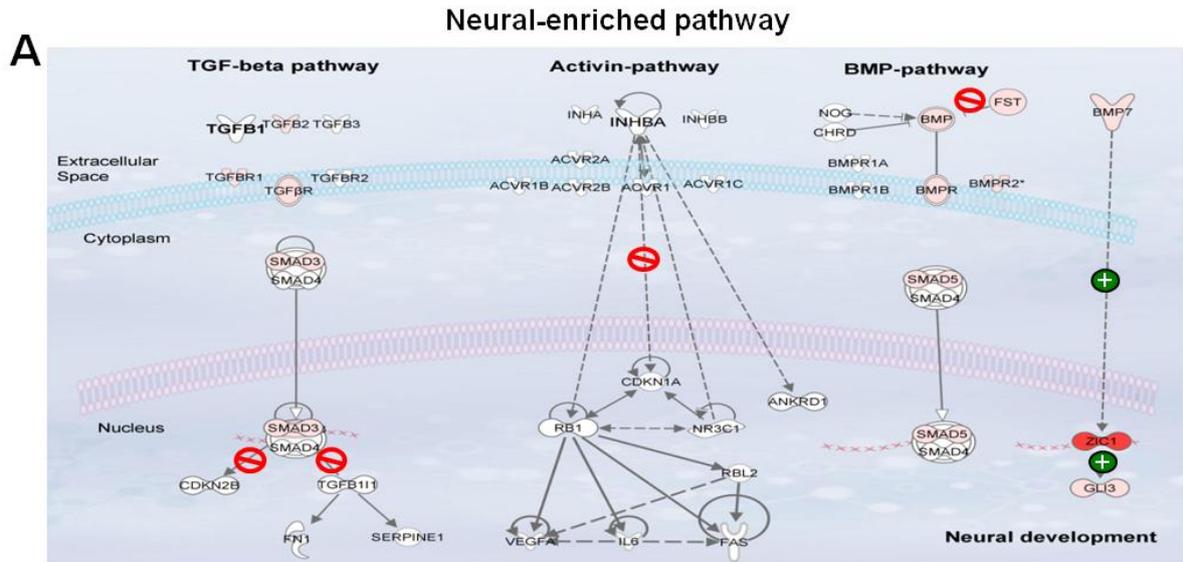


**Figure 3: Comparison of gene expression modulations within Notch signalling pathway either in NPC or in MPC.** Modulated genes are represented as a box with its gene symbol inside. Genes modulated between NPC and hES were shown in A and those modulated between MPC and hES in B. Genes up-regulated by comparison with hES are in red and those down-regulated in green. Colour intensities of genes were correlated to fold change intensities.

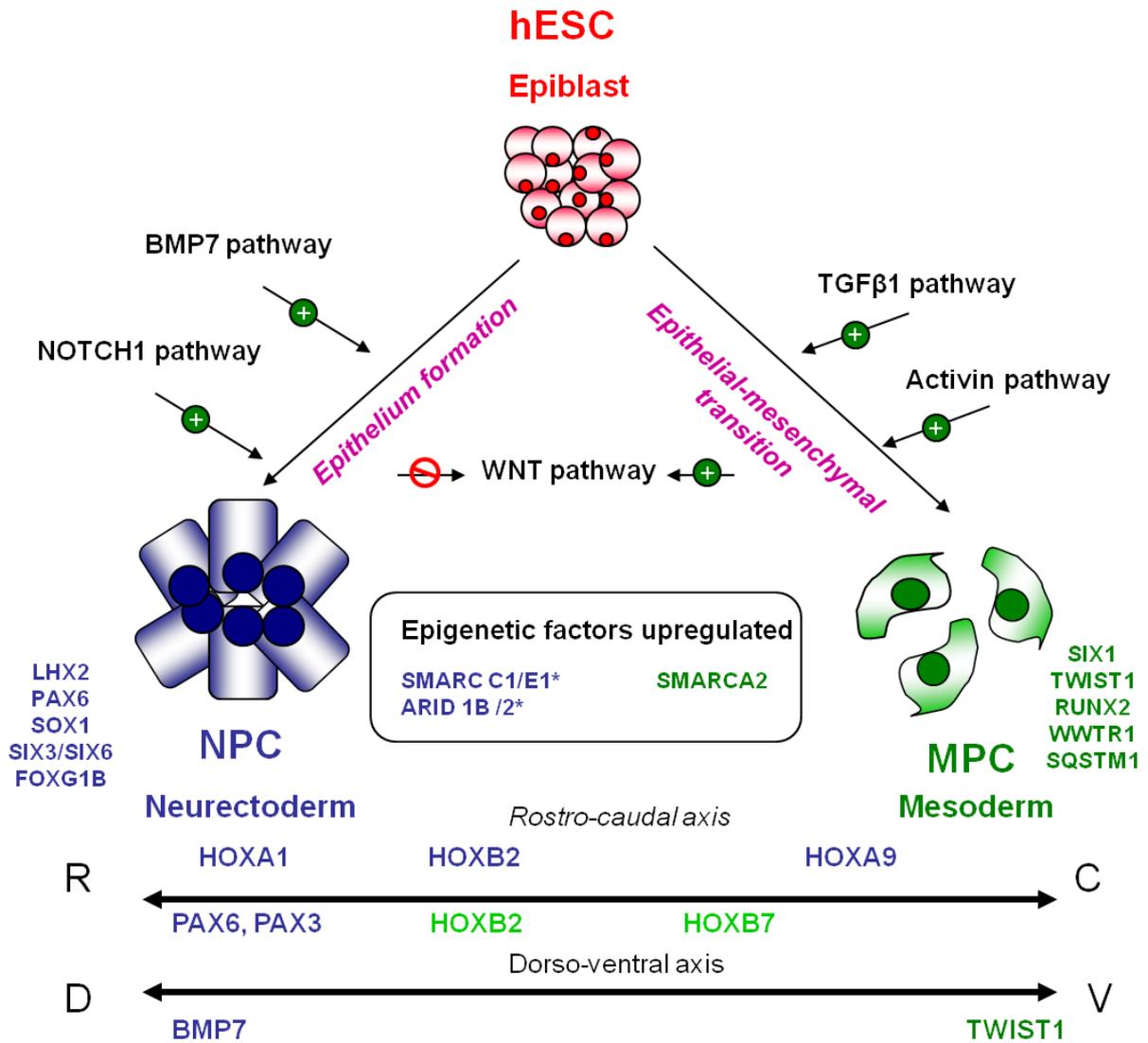
The following symbol (  ) indicated a relation of “inhibition“ and (  ) a relation of “activation” between genes in the path. Differential expression measured by quantitative RT-PCR (C) for some genes in hES (ES), MPC, NPC and neurons. Results are presented as relative expression level compared to hES cells considered arbitrarily as 1 from 3 independent samples.



**Figure 4 : Comparison of gene expression modulations within canonical Wnt/ $\beta$  catenin pathway either in NPC or in MPC. Genes modulated between NPC and hES are shown in A, those modulated between MPC and hES in B. Same legend as described in Figure 3.**



**Figure 5: Comparison of gene expression modulations within TGF $\beta$ /Activin/BMP signalling pathway either in NPC or in MPC.** Genes modulated between NPC and hES are shown in A, those modulated between MPC and hES in B. Differential expression measured by quantitative RT-PCR in C. Same legend as described in Figure 3.



**Figure 6 : Comprehensive developmental path model** based on our gene expression data which may be controlled the hES cell fate decision toward either neural or mesodermal fates.

Table S1 : Primers used for quantitative RT-PCR (qPCR) or PCR experiments

Gene Name	Forward primer	Reverse primer	Use
<b>DLL1</b>	F: CCA ACT GCC AGC GTG AGA	R: GAA GTC CGC CTT CTT GTT GGT	qPCR
<b>HES1</b>	F: GGT GCT GAT AAC AGC GGA AT	R: TGA GCA AGT GCT GAG GGT TT	qPCR
<b>HES5</b>	F: ACA TCC TGG AGA TGG CTG TC	R: TAG TCC TGG TGC AGG CTC TT	qPCR
<b>INHBA</b>	F: GAA AAG GAG CAG TCG CAC AGA	R: GGC GAT GAG GGT GGT CTT C	qPCR
<b>NOTCH1</b>	F: CGG GTC CAC CAG TTT GAA TG	R: GTT GTA TTG GTT CGG CAC CAT	qPCR
<b>18S</b>	F: GAG GAT GAG GTG GAA CGT GT	R: TCT TCA GTC GCT CCA GGT CT	qPCR
<b>ACTIN</b>	F: CTC TTC CAG CCT TCC TTC CT	R: AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG	PCR
<b>GFAP</b>	F: CAG GAC CTG CTC AAT GTC AA	R: ATC TCC ACG GTC TTC ACC AC	PCR
<b>NANOG</b>	F: ATA CCT CAG CCT CCA GCA GA	R: ATT GTT CCA GGT CTG GTT GC	PCR
<b>NCAM-1</b>	F: TTG TTT TTC CTG GGA ACT GC	R: ATC CTC GCC TGT AAC CAC AC	PCR
<b>NESTIN</b>	F: AGA GAA CCA GGA GCC ACT GA	R: TTC TCT TGT CCC GCA GAC TT	PCR
<b>OTX2</b>	F: ACA AGT GGC CAA TTC ACT CC	R: ATG CCC CCA AAG TAG GAA GT	PCR
<b>PAX6</b>	F: GGC AAC CTA CGC AAG ATG GC	R: TGA GGG CTG TGT CTG TTC GG	PCR
<b>SOX1</b>	F: CAA TGC GGG GAG GAG AAG TC	R: CTC TGG ACC AAA CTC TGG CG	PCR

## **Article II**

### **DEFECTS OF CYCLE SIGNALLING PATHWAY IN HUMAN NEURAL STEM CELLS FROM HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS CARRYING MUTATION FOR MYOTONIC DYSTROPHY**

Jérôme Denis, Sophie Aubert, Karine Chaillou Giraud-Triboult, Pauline Poydenot, Benoite Champon, Yves Maury, Alexandra Benchoua, Marc Pechanski, Cécile Martinat and Geneviève Pietu

**(En préparation)**

**Les figures supplémentaires ne sont pas incluses dans cette version en raison de leurs tailles importantes.**

**INTRODUCTION**



Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is an autosomal dominant disorder caused by a triplet CTG repeat expansion in the 3'-untranslated region (UTR) of the dystrophin myotonia protein kinase (DMPK) gene (Mahadevan et al., 1992). As with several other type of muscular dystrophy, disease in DM1 is not limited to skeletal muscle. Instead it is a multi-systemic disorder that includes myotonia, progressive weakness, muscle wasting insulin resistance, cardiac conduction defects, early cataracts, gonadal atrophy and neuropsychiatric symptoms. In the central nervous system (CNS), myotonic dystrophy can produce a variable mix of hypersomnolence, behavioural disturbance or cognitive impairments. The severity of the disease is proportional to the size of the expansion. The number of repeats tends to increase from generation to generation, accounting for the genetic anticipation characteristic of this disease. Congenital DM is the most severe form of the disorder. CDM patients present more than 2000 CTG repeats and suffer from profound hypotonic, mental retardation, and developmental abnormalities (Machuca-Tzili et al., 2005).

Although some of the symptoms of DM1 may be attributed to reduced levels of the DMPK protein, much of the disease pathogenesis is recapitulated by expression of the mutant DMPK 3'-UTR. This is, at least in part, because transcripts containing the expanded CUG repeats accumulate in nuclear foci where they alter the function of several RNA-binding proteins either by sequestering them directly, such as MBNL1, or by modifying their level of phosphorylation, such as CUGBP1 (Timchenko et al., 2001). As CUGBP1 and MBNL1 are both splicing regulators, several clinically relevant mRNAs, including the muscle-specific chloride channel (Charlet et al., 2002), the insulin receptor (Savkur et al., 2001) and the cardiac troponin T exhibit aberrant splice patterns in DM1 patients' cells. However, different evidences suggest that DM1 is not only a splicing defect disorder. Thus, the presence of CUG repeats induced an increased PKC activity causing hyperphosphorylation of CUGBP1 suggesting that the expression of noncoding DMPK-CUG repeat could disrupt normal signalling pathways.

This broad spectrum of molecular and cellular mechanisms affected by the expression of DM1 mutation could be at the origin of the multi-systemic feature of this disorder. Whereas physiopathological studies have mostly focused on the effect of the DM1 mutation on the cell biology of skeletal muscle, little is known about the impact of the mutation on the central nervous system. Thus, in the central nervous system, neurons exhibit splicing defects in three genes including NMDAR1, APP (Jiang et al., 2004) and MAPT (Sergeant et al., 2001). These findings have been associated to some neurologic symptoms but specific pathological



mechanism is still elusive. This is mostly due to the absence of pertinent cellular model in order to analyse the effect of DM1 mutation on neural cells.

Here, by taking advantage of the capacity of human embryonic stem cells to be differentiated into neural stem cells (NSC), we developed a model based on the use NSC carrying the causal mutation of DM1 that exhibits the main molecular sigma associated with the DM1 mutation: the nuclear aggregation of the mutant mRNA with MBNL1 protein. In addition, we demonstrated that DM1 neural stem cells exhibit a proliferative defect likely related to a decrease in mTOR signalling pathway.

## RESULTS

### Differentiation of hES cell lines toward mutant neural stem cells

Two wild type (VUB01\_WT and H9\_WT) and three DM1 (VUB01\_DM, VUB03\_DM and VUB24\_DM) hES cell lines were differentiated toward a homogenous population of neural stem cells (NSC) using a feeder free protocol, recently described (Chambers et al., 2009) (**Supplementary data 1**). During differentiation, a strong decrease of Oct4/POU5F1 pluripotent gene and an increase of the neural marker SOX1 expression were observed in both WT and mutant NSC compared to hES cells. The expression of SOX2 involved in hES self-renewal was maintained. These NSC deciphered a capacity to differentiate toward neurons expressing the pan-neuronal marker TUJ1.

NSC derived from the three DM1 hES cells lines contained 580, 1480 and more than 3000 CTG repeats respectively. A weak increase in the CTG repeats size was observed during the neural induction as compared with hES cells in which the expansion sizes were about 450 CTG for VUB19\_DM, 1000 CTG for VUB03\_DM and more than 3000 CTG in VUB24\_DM

(**Figure 1A**).

By using *in situ* hybridization combined with immunocytochemistry, nuclear mutant mRNA aggregates in association with the protein MBNL1 are observed in the three DM1\_NSC populations, validating the pathological relevance of these cells (**Figure 1B**). This result was confirmed by western blot showing an increase of MBNL1 accumulation in the nuclei of mutant NSC when compared with control (**Figure 1C**). In addition, the automatic quantitative detection of foci revealed the correlation between the size of CTG repeats and the number of



foci per nucleus (**Figure 1E and 1D**) suggesting that this cell-based model may reflected various stages of the severity of the disease.

### **Proliferative capacity of NSC**

By measuring the mean doubling time using the quantification of ATP concentration, cell proliferation of NSC derived from DM1 cells was observed to be slower than the two WT cells (VUB01\_WT and H9\_WT)). For the two DM1\_NSC cell lines containing more than 1000 CTG expansions (VUB03\_DM and VUB24\_DM), the mean doubling time was more than hundred hours compared to about thirty hours for the WT cell lines. The doubling time for the VUB19\_DM NSC, which was the less affected, was not statistically different from control (**Figure 2A**). The Cdk inhibitor, p27<sup>kip1</sup>, is a key regulator of cell proliferation. Interestingly, an increased expression of p27<sup>kip1</sup> can be detected in the two DM1\_NSC exhibiting proliferative defects, VUB03\_DM and VUB24\_DM (**Figure 2B**) correlating with the slow proliferation rate observed in these DM1\_NSC cell lines. For further characterization, the VUB03\_DM NSC was used.

### **The proliferative defect of DM1\_NSC is associated to an abnormal cell signalling pathway related to mTOR**

The catabolism of p27<sup>kip1</sup> is mainly controlled by mTOR signalling, which plays a crucial role in cell growth and cell cycle. One main target of mTOR is p70 ribosomal S6 kinase which regulates translation by phosphorylating the 40S ribosomal protein S6 (P-S6). In order to decipher the cell cycle signalling pathway affected by the presence of the DM1, we extended our analysis to the quantification of P-S6. This revealed that the expression of the P-S6 protein was decreased in DM1 NSC compared to WT after forty-eight hours of culture in standard conditions whereas the expression of total S6 was not affected (**Figure 3A**). A similar observation could be made by using a “gain of function” model based on the nucleofection of VUB01\_WT NSC with a plasmid containing 960 CTG repeats. In these conditions, mutant mRNA aggregates co-localized with MBNL1 were detected in the transfected control VUB01\_WT NSC at twenty-four hours post-nucleofection (**Supplementary data 3**) and a decrease of P-S6 expression was observed (**Figure 3B**). Altogether, these results indicate that the DM1 mutation affects cell proliferation through a defect in the cell cycle signalling pathway implicating mTOR.



In order to define the cellular determinant of this observation, quantification of P-S6 was investigated after treatment of NSC with the factors, EGF, FGF2 and BDNF, used in the composition of the standard NSC culture medium. For this purpose, NSC were starved for these factors for twenty-four hours and then treated for one hour with each factor alone or in combination. Whereas no effect on the quantity of P-S6 was observed with EGF and BDNF, a dramatic increase of the P-S6 expression level was observed in mutant NSC and less pronounced in WT cells in the presence of FGF2 (alone or in combination) (**Figure 3C**) suggesting that the FGF2-controlled signalling pathway could be implicated in the different proliferation rate observed between DM1 and control NSC. Interestingly, whereas the WT-NSC are able to maintain a constant activation of the P-S6 after forty eight hours of FGF2 treatment, DM1-NSC presented a decrease in the P-S6 activation under a long time of FGF2 treatment (**Figure 3D**) correlating with the slower proliferation rate observed in the presence of the mutation. Confirming the implication of mTOR signalling pathway, treatment of NSC with rapamycin, a potent inhibitor of the mTOR pathway, leads to a strong decrease of the P-S6 expression after one hour of treatment, at concentrations of 10 or 100 nM in both WT and DM1 NSC (**Figure 3D**). Decrease of P-S6 expression was also observed after extended treatment for six, twenty-four and forty-eight hours of WT and DM1 NSC with 10 nM of rapamycin (**Figure supplementary**).

### **Study of signalling pathway upstream mTOR**

As mTOR is regulated by a multitude of signaling cascades (Dowling et al.) (**Dowling, 2010**), we evaluate the cause of the mTOR signalling defect by investigating upstream signals known to be involved in its activation. As FGF2 regulates mainly the MAPK signalling pathway, we quantified this pathway by testing the phosphorylation of ERK1/2 protein (notified thereafter P-ERK1/2). We confirmed that FGF2 is able to stimulate P-ERK1/2 pathway but no difference in the kinetic profile was observed between mutant and control cells. This profile is strongly correlated with modulation of P-S6. This result indicated that FGF2-mediated ERK1/2 activation is able to compensate the decrease of P-S6 in DM1 NSC cells but only during the activation of the pathway and signal decrease when ERK pathway stopped to be activated (**Figure 4A**). In addition, in both WT and DM1 NSC, the expression of P-ERK1/2 was not observed in the absence of FGF2 and increased similarly in a dose dependent manner with one hour treatment with increasing concentrations of FGF2 (**Figure 4B**).



Moreover, in condition where P-S6 is decreased in DM1 cells, we tested two signalling pathways known to modulate upstream mTOR signalling pathway : 1) Phospho-Akt which is an active form of the kinase controlling positively mTOR and 2) Phospho-AMPK which in his active form regulated negatively mTOR. No effect was observed between DM1 and WT indicating that this two signalling pathway may not explain difference observed for P-S6.

In contrast, treatment of WT NSC for one hour with LY292002, an inhibitor of the PI3K at both 10 and 50 mM was able to completely inhibit the mTOR activation as indicated by the disappearance of P-S6 expression mimicking the effect of the DM1 mutation of the level of P-S6 (**Figure 4D**). This result suggested that the main signalling pathway involved in the mTOR activation in NSC acted through PI3K.

## DISCUSSION

In this study, we provide new evidence that large CTG expansions trigger *in vitro* mTOR dependent cell cycle signalling pathway alteration which reduces significantly the proliferative capacity of DM1 hES-derived neural stem cells. Indeed, altered expression of two main targets of mTOR signalling, P-S6 and p27, is observed in DM1 neural stem cells.

In mammals, mTOR integrates growth factor, amino acid, nutrient and energy sensing signals, and thus plays a major role in cell growth and proliferation, protein synthesis and autophagy. Thus, due to the pivotal role of mTOR in signaling, the aberrant regulation of mTOR has been implicated in several disease processes, including cancer, diabetes, ocular diseases and neurodegenerative disorders, as well as in lifespan extension. As mTOR is regulated by a multitude of signaling cascades (Dowling et al.), our results indicate that among the different growth factors used for hES-derived neural stem cells cultures, FGF2 is the one which mediates mTOR activation and that treatment with the mTOR inhibitor rapamycin abolishes FGF2 stimulation. This is concordant with a recent study showing that mTOR is involved in FGF2 mediated cell-proliferation of mouse neural stem cells (Sato, 2010). Moreover, by looking at the three different pathways known to be implicated in mTOR activation, our results suggest that FGF2-mediating mTOR activation might implicate PIK3 and consequently that this signalling pathway might be affected by the DM1 mutation.

However, the question as to how the CTG mutation interferes with mTOR-dependent cell cycle signalling remains to be solved. It is now well accepted that the main molecular mechanism implicated in DM1 development relies on the nuclear aggregation of the mutant



mRNA which lead to the altered function of several RNA-binding proteins either by sequestering them directly, such as MBNL1, or by modifying their level of phosphorylation, such as CUGBP1. Due to the role of MBNL1 and CUGBP1 in the regulation of alternate splicing, physiopathological studies of DM1 have mostly focused on the identification of splicing defects leading to the characterization of approximately twenty different alternate splicing defects in DM1 based on the clinical symptom that they could be related to. However, several lines of evidence strongly suggest that the presence of CTG expansions could result in a larger spectrum of affected mechanisms. Thus, post-transcriptional modifications as well as defects in translation efficiency or mRNA stability have been recently reported to contribute to the development of DM1 (Timchenko et al., 2004; Zhang et al., 2008). In addition, several alterations of cell signalling pathways have been also described in DM1 patients' cells. Thus, a defective signalling pathway downstream the receptor to insulin has been described in a mouse model of DM1 and should participate to the insulin-resistance associated to DM1 . These defects could be either due to the altered splicing of the gene coding for the insulin receptor or due to an abnormal intracytoplasmic trafficking of this receptor related to the DMPK haploinsufficiency (Llagostera et al., 2007). Interestingly, defects in cell cycle signalling pathways have been also reported in DM1 muscular cells. Thus, the increased steady state expression of CUGBP1 due to its hyperphosphorylation by an abnormal protein kinase C activity is responsible of the misexpression of p21, a cell cycle inhibitor (Timchenko et al., 2004), leading to the inhibition of myogenesis (Harris et al., 2001) and consequently could contribute to the development of muscle deficiency in DM1 patients. Aberrant expression of the cyclin D inhibitor p16 has been also described in muscular reservoir cells isolated from congenital DM1 patients, leading to the limited proliferative capacity observed in these satellite cells (Bigot et al., 2009) that could alter the mechanism of muscle mass maintenance and participate to the muscular atrophy that takes place in DM1. Concordant to these results, our data extend the effect of CTG repeats on cell cycle to another type of precursor cells, the neural stem cells. In addition, they contribute to the demonstration that DM1 is not merely a splicing disorder but in contrast should be considered as a more complex disease for which a lot of pathological questions remain elusive.

By analogy with the studies on muscular cells, we can postulate that the limited proliferative capacity observed in neural stem cells could affect neuronal differentiation as well as neuronal replacement. However, these considerations remain clearly speculative as few is known about the neurophysiopathological consequences of DM1 mutation. Contrasting with



the substantial advances in understanding DM1 muscle pathology, the molecular and cellular basis of DM1 in the nervous system has just started to be revealed. There is extensive evidence for central nervous system involvement in DM1, including patterns of psychological dysfunction, mental retardation, excessive daytime sleepiness, and neuropathological abnormalities (Abe et al., 1994; Turnpenny et al., 1994; Delaporte, 1998; Perini et al., 1999; Meola et al., 2003; Modoni et al., 2004). Alterations of personality that are associated with DM1 include avoidant personality (Meola et al., 2003), obsessive-compulsive, passive-aggressive, and schizotypic traits, whose occurrence is not attributable to the disabling condition of patients (Delaporte, 1998). Other studies have found severe impairment in all measures of general intelligence and verbal fluency and particularly frontal, executive, visuospatial, arithmetic, and attention ability deficits (Abe et al., 1994; Modoni et al., 2004; Winblad et al., 2006). On the molecular aspect, altered splicing of the glutamate receptor to the NMDA as well as altered splicing of Tau proteins have been reported in brain biopsies from DM1 patients (Jiang et al., 2004). However, due to a lack of neuronal models for DM1, the exact consequences of DM1 mutation of the neuronal biology remain unclear.

In a larger point of view, studies of neurological diseases are often limited by the access to human biological samples. To overcome these major problems, most of models used ever tumorigenic or transformed cells but their nature may sometimes led to incorrect conclusions because their metabolism and signalling pathways were modulated independently to the disease. Among non transformed cells, neural stem cells (NSC) have been proposed to model disease affecting brain (Jakel et al., 2004) because they are self-renewal and they can be differentiated to neurons. Unfortunately, isolation of these cells from human adult brain or aborted embryos is also very limited. The use of pluripotent stem cells and especially human embryonic stem cells (hES) derived from embryos identified to carry a genetic disorder (Verlinsky et al., 2005) as a biological resource to obtain mutant neural stem cells giving, in theory, access to pathological modelling of monogenic disease affecting neural tissue during development (Ben-Yosef et al., 2008). By taking advantage of recent progress in culture protocol allowing the obtention of almost pure NSC population from hES that are highly neurogenic (Chambers et al., 2009), we demonstrated that DM1 hES-derived NSC exhibit some of the main pathological features: mutant mRNA nuclear aggregation combined to the nuclear MBNL1 sequestration. Despite these observations, DM1 associated splice defects, such as NMDAR1 or MATP, have not be found to be altered in DM1 hES-derived NSC, likely due to the embryonic origin of this cell system. Indeed, the different altered splicing associated to



DM1 result in a defective switch between foetal to adult isoform. Besides this limitation, we demonstrated that DM1 hES-derived neural stem cells can be used to identify new early developmental defects. Our results plead for a systematic search for pathological mechanisms using the new biological resource offered by mutant gene-carrying pluripotent stem cell lines, whether they be of embryonic origin or reprogrammed from patients' cells.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cell cultures**

#### ***Human embryonic stem cells (hES) culture***

hES cells were maintained and propagated on a feeder layer of MEF (Murine Embryonic Fibroblasts) or STO (SIM mice Thioguanine and Ouabaine resistant murine embryonic fibroblasts) inactivated by Mitomycin C (Invitrogen ref. M4287) used at 10 µg/mL overnight at 37°C. Cells were cultured into a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C in a serum replacement medium composed of: KO/DMEM ref. 10829018; 20% Knock-out Serum Replacement (KSR) ref. 10828028; 1% Non Essential Amino Acid (NEAA) ref. 11140035; 1% Glutamax 1 mM ref. 35050038; 0.1% β-Mercaptoethanol (BM) ref. 31350010; 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) ref. 15140122, supplemented with 8 ng/mL of bFGF (all from Invitrogen). The culture media was changed daily and routine passages were performed by mechanical cutting of hES cells on a fresh feeder layer every 4-5 days. Phenotypes of hES are regularly controlled by immunochemistry for Nanog and Oct4 expression, and SEA1 was tested by FACS. Caryotypes of cell lines are controlled once a month.

#### ***hES derived-Neural Stem Cells***

The protocol used to obtain NSC from hES has in two steps. The first one is the obtention of neuro-epithelial cells (NEP) from hES and the second one is the obtention of NSC from NEP. The first day of the differentiation, hES medium was replaced by pre-warmed N2B27 medium containing: 1:2 of DMEM/F12 medium with Glutamax I ref. 31331028; 1:2 of Neurobasal medium ref. 21103049; N2 supplement 10X ref. 17502048; B27 supplement without vitamin A 20X ref.12587010; β-Mercaptoethanol 1000X ref. 31350010 (all from Invitrogen). This medium was complemented with: Human recombinant Noggin, an inhibitor of BMP pathway, used at 300 ng/mL (PeproTech ref. 120-10C); SB-431542, an inhibitor of TGFβ pathway, used



at 20  $\mu$ M (Tocris ref. 1614); Y-27632, a ROCK inhibitor, used at 20  $\mu$ M (Calbiochem ref. 688000). hES colonies were carefully cutted into small clumps using a needle under the control of a binocular magnifier. Floating aggregates were placed on a “low attachment” dish during 6 hours. Thereafter, conditioned aggregate was transferred in a new dish pre-coated with 0.01% Polyornithine (Sigma ref. P4957) and Laminin 1 ng/mL (Sigma ref. L2020-1mg) then incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> at least overnight. The next days, medium (without Y-27632) was changed daily until apparition of neural rosettes containing NEP after 8-10 days of differentiation. At this time, medium was replaced by the N2B27 medium supplemented by: EGF (Epidermal Growth Factor) at 10 ng/mL (R&D Systems ref. 236-EG-200); FGF2 (Fibroblast Growth Factor) at 10 ng/mL (PeproTech ref. 100-18B); hBDNF (human Brain-Derived Neurotrophic Factor) at 20 ng/mL (R&D Systems ref. 248-BD-025/CF). NSC are cultured during 3 days until confluence and passed (dilution: 1/3) using 0.05 Trypsin/EDTA. After 6-8 passage phenotype was stabilized and controlled by immunochemistry and FACS methods for expression of specific markers.

### ***Differentiation of Neural Stem Cells to neurons***

NSC were counted and seeded at the density of 50,000 cells per cm<sup>2</sup> on Polyornithine/Laminin coated dishes as mentioned before. The N2B27 medium was used in presence of hBDNF but without EGF and FGF2. Medium was changed every 2 days until apparition of neurons which were fully differentiated after 20 days. Phenotype was controlled based on expression of specific markers by immunochemistry.

### **Pharmacological treatment**

Rapamycin, a FRAP/mTOR inhibitor (Cell Signaling ref. 9904) and LY292002, a PI3 Kinase inhibitor (Cell Signaling ref. 9901) was both used at a concentration corresponding to DMSO <1%.

### **RNA extraction and Real-Time RT-PCR**

Total RNA from cells was extracted by “RNeasy Mini Kit Protocol” (Qiagen ref. 74106). Reverse transcription was performed with SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen ref. 18080-044). To study relative gene expression, real-time PCR were performed with Syber



Green PCR Master Mix (Applied Biosystems ref. 4309155) on a Chromo4 Real-Time system (Bio-Rad). The primers used in this study were:

### **Nucleofection experiment with p960-CTG**

The p960-CTG construction is a gift from Dr. Nicolas Charlet (Strasbourg, France).

Amaxa nucleofection was performed by using the “Rat Neural Stem Cell Nucleofector Kit” (Lonza ref. VPG-1005) according to the manufacturer's protocol (Amaxa). Briefly, NSC were collected and re-suspended at a concentration of 5 millions cells per conditions in 100  $\mu$ L of the appropriate supplemented nucleofection solution. Then, cells were putted in contact with 5  $\mu$ g of plasmid, transferred into an electroporation cuvette and placed into the Amaxa Nucleofector (Lonza ref. AAD-1001). Once the nucleofection process performed with the appropriate program, cells were plated on Polyornithine/Laminin coated dishes and placed at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, for several days. Then, at various time, cells were collected for RNA and proteins extractions or fixed with 4% Paraformaldehyde (PFA) for immunochemistry.

### **Indirect immunocytochemistry and Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH)**

Cells were fixed with 4% Paraformaldehyde (PFA) for 20 minutes at room temperature, rinsed with PBS and blocked with 1% BSA, 5% normal goat serum and 0.1% triton in PBS solution for 1 hour. Thereafter they were incubated with the appropriate primary antibodies overnight at 4°C: Rabbit polyclonal antibodies, included anti-Nestin (Chemicon ref. AB5922), were used at the dilution of 1:500<sup>e</sup>. Mouse monoclonal antibodies (IgG), included anti-TUJ1 (Covance ref. MMS-435P), were used at the dilution of 1:500<sup>e</sup>. The appropriate Alexa 488 or Alexa 555 labeled secondary antibodies were used at the dilution of 1:1000<sup>e</sup> (Molecular Probes). Then, DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) was used for nuclei counterstaining at the concentration of 2  $\mu$ g/mL (Sigma ref. D9542).

*In situ* hybridization was performed to detect the accumulation of pathological RNA (or foci) by using an Alexa 555 labeled (CAG)<sub>10</sub> oligonucleotidic probe, produced by Operon: [aminoC6+alexa555]TTCTTATTCTTCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG. Preparations were analyzed by epifluorescence microscopy with the Zeiss Imager Z1 and the Zeiss Axiovert 40CFL, and images were captured with the Zeiss AxioCam mRM.

### **SDS Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis and Western Blotting**



Cells were first re-suspended in RIPA lysis buffer (Sigma ref. R0278-50ML) and protein concentration of whole cell extracts was determined using Pierce® BCA Protein Assay Kit (Perbio Thermo Scientific ref. 23225) according to the manufacturer's instructions. Cellular proteins from each sample were mixed with NuPAGE® LDS Sample Buffer 4X (Invitrogen ref. NP0007) and DTT 1M (Sigma ref. 646563-10X.5ML), then heated at 70°C for 10 minutes. 10 to 20 µg of total protein were loaded per lane. The SDS Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) was performed using NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gels (Invitrogen ref. NP0335BOX), during 45 minutes at 200 Volts. After that, proteins were transferred onto nitrocellulose membranes using the iBlot® Gel Transfer Stack (Invitrogen ref. IB3010-01). Membranes were blocked with 5% non fat milk in Phosphate Buffered Saline containing 0.1% Tween 20 (PBST) for 1 hour, then incubated overnight at 4°C with primary antibodies at the appropriate dilution. After several washes with PBST, blots were incubated for 1 hour at room temperature with the appropriate horseradish Peroxidase-conjugated secondary antibody (Rabbit or Mouse at 1:10000°). Membranes were washed with PBST, and the immunoreactive bands were revealed by using Amersham ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare ref. RPN2132) and exposed to Amersham Hyper-films ECL (GE Healthcare ref. 28-9068-37). Equal protein loading was controlled by the detection of Actin using a monoclonal Anti-β-Actin–Peroxidase antibody (Sigma ref. A3854-200UL).

### **ArrayScan analysis**

Number of nuclei with foci and number of foci per nucleus are counted using the ArrayScan VTI HCS Reader (Cellomics). Data were examined by using Cell Selecting software (Cellomics).

### **Statistical analysis**

All the data represent means ± standard error of the mean (SEM) and were analyzed by Student t test.



## **AUTHOR CONTRIBUTION**

MP (MD; PhD): Elaboration of the project.

JD (Pharm.D; MSc), CM (PhD), GP (PhD): Conception and design; Data analysis and interpretation; Manuscript writing.

AB: Design of NSC induction protocol.

SA (MSc), PP (MSc), YM (MSc), BC (BS), KGT (MSc): Provision of study material; Data analysis and interpretation.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM), MediCen (IngeCell program) and Genopole.

We thank Dr. Genevieve Gourdon (INSERM U781, Paris) and Pauline Georges for performing CTG repeats analysis; Karen Sermon (UZ Brussels, Belgium) for providing DM1 and control hES cell lines; Dr. Denis Furling (INSERM U787, Paris), Drs. Marie-Laure Caillet-Boudin and Nicolas Sergeant for their helpful discussions and their expertise on the field of Myotonic Dystrophy disease; Dr. Nicolas Charlet for his plasmid p960-CTG construction and Dr. Glen Morris for MBNL1 antibody.

## **AUTHORS INFORMATIONS**

The authors declare no competing financial interests.

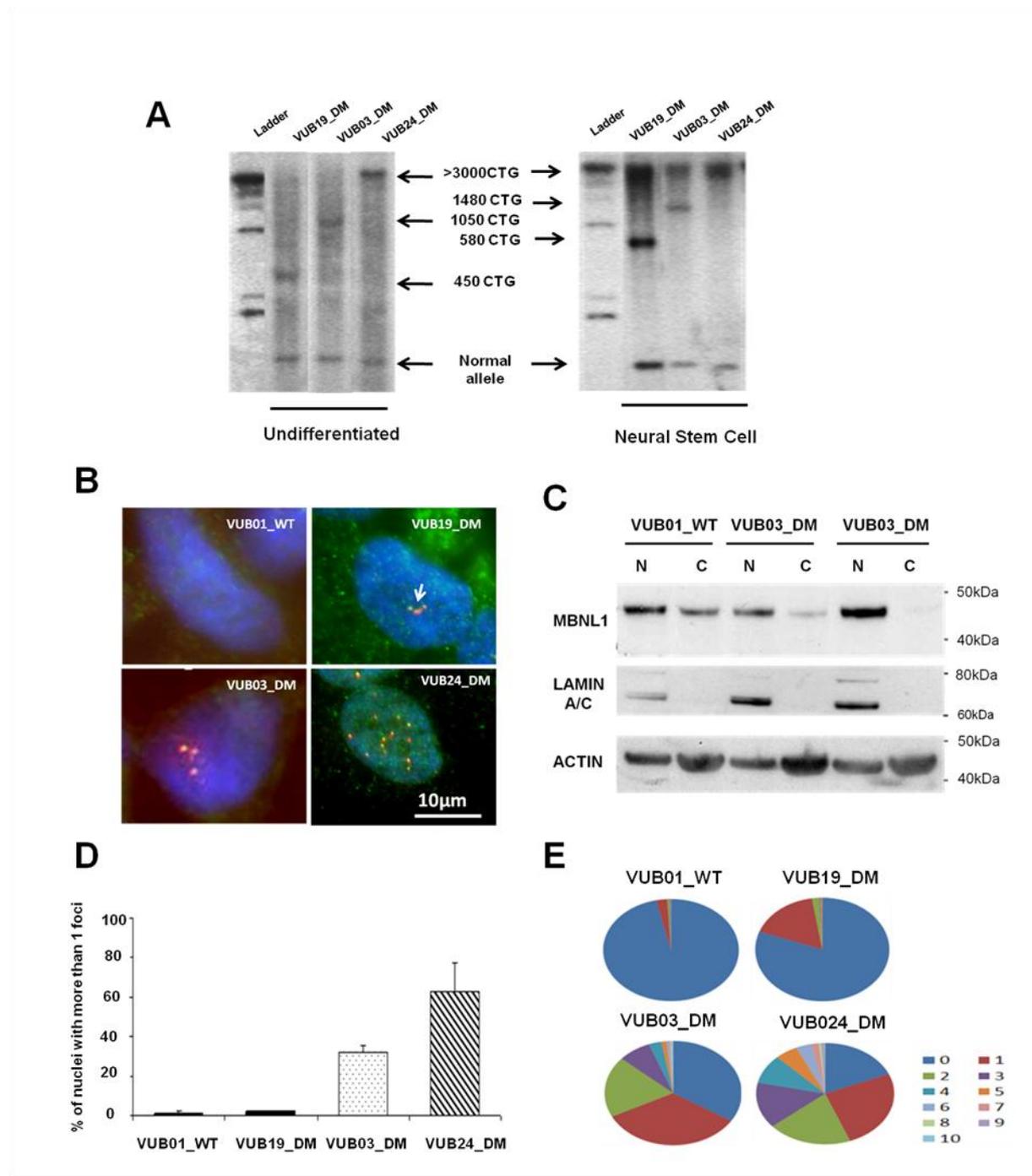


## REFERENCES

- Ben-Yosef, D., Malcov, M., and Eiges, R. (2008). PGD-derived human embryonic stem cell lines as a powerful tool for the study of human genetic disorders. *Mol Cell Endocrinol* 282, 153-158.
- Bigot, A., Klein, A. F., Gasnier, E., Jacquemin, V., Ravassard, P., Butler-Browne, G., Mouly, V., and Furling, D. (2009). Large CTG repeats trigger p16-dependent premature senescence in myotonic dystrophy type 1 muscle precursor cells. *Am J Pathol* 174, 1435-1442.
- Chambers, S. M., Fasano, C. A., Papapetrou, E. P., Tomishima, M., Sadelain, M., and Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol* 27, 275-280.
- Charlet, B. N., Savkur, R. S., Singh, G., Philips, A. V., Grice, E. A., and Cooper, T. A. (2002). Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol Cell* 10, 45-53.
- Dowling, R. J., Topisirovic, I., Fonseca, B. D., and Sonenberg, N. Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 1804, 433-439.
- Harris, T. E., Albrecht, J. H., Nakanishi, M., and Darlington, G. J. (2001). CCAAT/enhancer-binding protein-alpha cooperates with p21 to inhibit cyclin-dependent kinase-2 activity and induces growth arrest independent of DNA binding. *J Biol Chem* 276, 29200-29209.
- Jakel, R. J., Schneider, B. L., and Svendsen, C. N. (2004). Using human neural stem cells to model neurological disease. *Nat Rev Genet* 5, 136-144.
- Jiang, H., Mankodi, A., Swanson, M. S., Moxley, R. T., and Thornton, C. A. (2004). Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons. *Hum Mol Genet* 13, 3079-3088.
- Llagostera, E., Catalucci, D., Marti, L., Liesa, M., Camps, M., Ciaraldi, T. P., Kondo, R., Reddy, S., Dillmann, W. H., Palacin, M., *et al.* (2007). Role of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) in glucose homeostasis and muscle insulin action. *PLoS One* 2, e1134.
- Machuca-Tzili, L., Brook, D., and Hilton-Jones, D. (2005). Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies: a review. *Muscle Nerve* 32, 1-18.
- Mahadevan, M., Tsilfidis, C., Sabourin, L., Shutler, G., Amemiya, C., Jansen, G., Neville, C., Narang, M., Barcelo, J., O'Hoy, K., and *et al.* (1992). Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* 255, 1253-1255.
- Savkur, R. S., Philips, A. V., and Cooper, T. A. (2001). Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet* 29, 40-47.

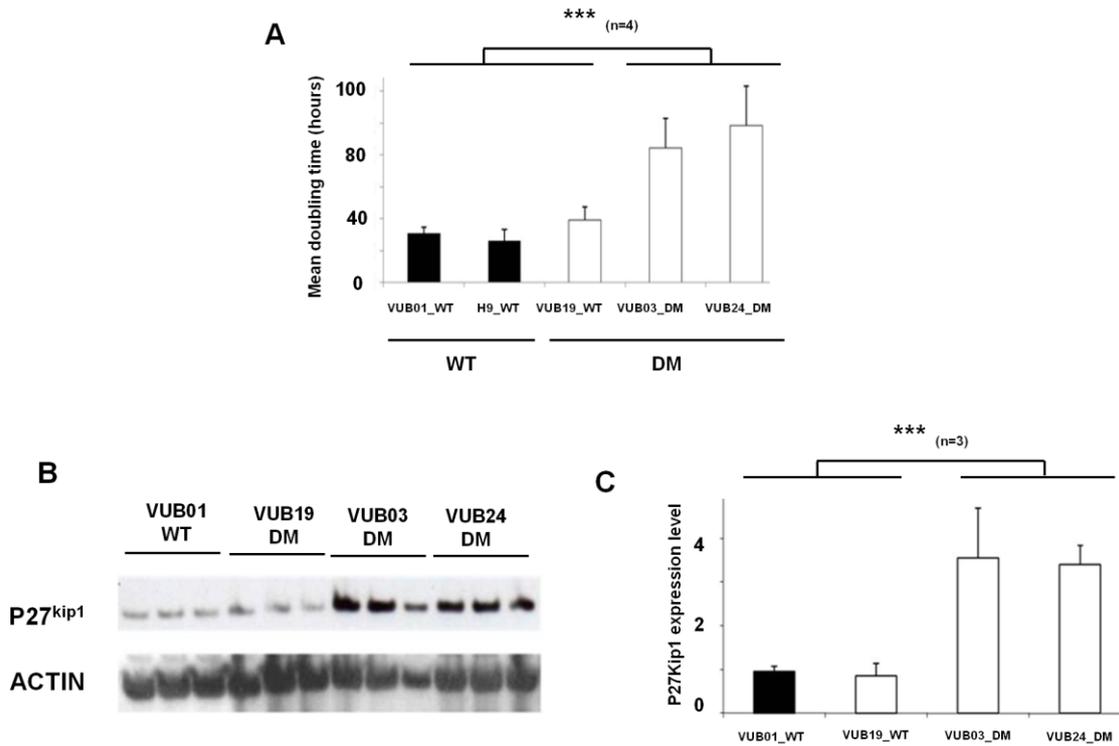


- Sergeant, N., Sablonniere, B., Schraen-Maschke, S., Ghestem, A., Muraige, C. A., Watzet, A., Vermersch, P., and Delacourte, A. (2001). Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 10, 2143-2155.
- Timchenko, N. A., Cai, Z. J., Welm, A. L., Reddy, S., Ashizawa, T., and Timchenko, L. T. (2001). RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1. *J Biol Chem* 276, 7820-7826.
- Timchenko, N. A., Patel, R., Iakova, P., Cai, Z. J., Quan, L., and Timchenko, L. T. (2004). Overexpression of CUG triplet repeat-binding protein, CUGBP1, in mice inhibits myogenesis. *J Biol Chem* 279, 13129-13139.
- Verlinsky, Y., Strelchenko, N., Kukhareno, V., Rechitsky, S., Verlinsky, O., Galat, V., and Kuliev, A. (2005). Human embryonic stem cell lines with genetic disorders. *Reprod Biomed Online* 10, 105-110.
- Zhang, L., Lee, J. E., Wilusz, J., and Wilusz, C. J. (2008). The RNA-binding protein CUGBP1 regulates stability of tumor necrosis factor mRNA in muscle cells: implications for myotonic dystrophy. *J Biol Chem* 283, 22457-22463.



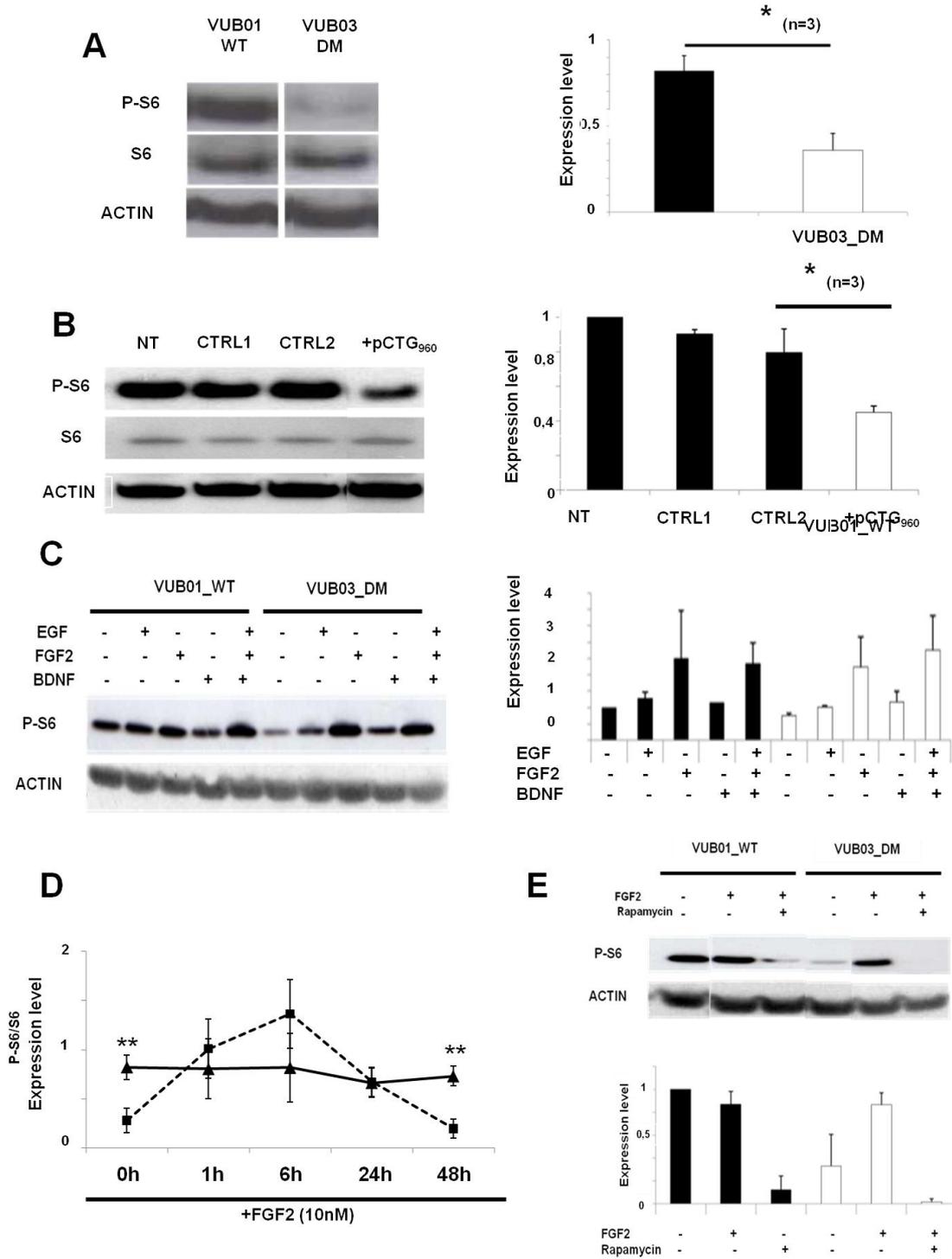
**Figure 1: Derivation of DM1 neural stem cells (NSC) from human embryonic stem cells.**

(A) Southern blot for monitoring the size of CTG repeat at undifferentiated state and at neural stem cells stage. (B) Co-localisation of MBNL1 with foci in nuclei of mutant NSC. Yellow dots are the result of the fluorescence superposition of red signal (mutant RNA) and green signal (MBNL1). (C) Subcellular localisation of MBNL1 and CUGBP1 in mutant NSC in nucleus and cytoplasm. Lamine A/C has been used as quality control for nucleus extract. (D) Quantification of foci and MBNL1 accumulation in nuclei parameters by ArrayScan correlated with CTG repeats size.



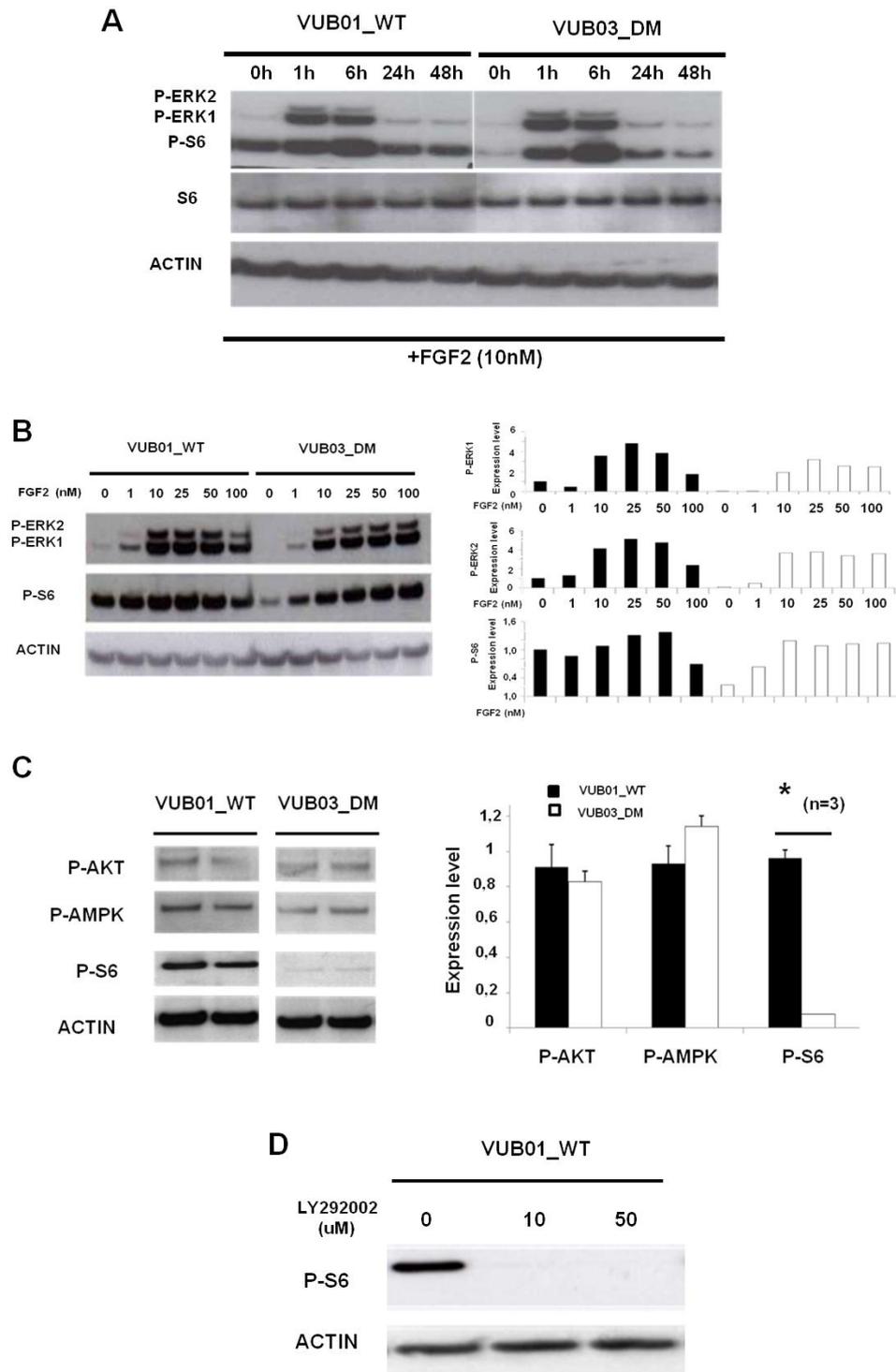
**Figure 2: Decrease of proliferative capacity of mutant neural stem cells with large CTG.**

(A) Mean doubling time in proliferation condition of mutant neural stem cells. (B) Expression of P27<sup>kip1</sup> by western blot. Actin is used as loading control. (C) Quantification of P27<sup>kip1</sup>.



**Figure 3: Decrease of P-S6 in mutant neural stem cells**

(A) Measure of P-S6 ribosomal protein after 48h of culture. (B) Effect of p960-CTG after nucleofection in VUB01\_WT NSC on P-S6 expression level. (C) Effect of EGF, FGF2 and BDNF on P-S6. (D) Monitoring of P-S6 during 48 hours in presence of FGF2 (10nM). (E) Effect of rapamycin after FGF2 treatment (1h treatment).



**Figure 4: Search of signaling pathway involved upstream of mTOR**

(A) Effect of FGF2 treatment at different time during 48 hours. onto ERK1/2 and P-S6; (B) Effect of different dose of FGF2 onto ERK1/2 and P-S6 pathway after 1h treatment; (C) Effect of P-AKT and P-AMPK onto P-S6 after 48h treatment of FGF2 (10nM). (D) Effect of LY292002, an inhibitor of PI3K signaling pathway, on the P-S6 expression level. Actin is used as loading control.

## Résumé

Parmi leurs applications prometteuses, les lignées de cellules souches embryonnaires humaines (hES) présentent un potentiel inestimable pour améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement de maladies monogéniques. Cette application de modélisation pathologique est devenue possible grâce à l'utilisation de lignées hES porteuses de la mutation causale d'une maladie monogénique, obtenues au cours d'un diagnostic pré-implantatoire.

L'équipe dans laquelle j'ai effectué mes travaux de thèse a démontré que des lignées hES et leurs progénies, porteuses de la mutation causale de la dystrophie myotonique de type 1 (DM1), exprimaient des défauts moléculaires caractéristiques de la pathologie, permettant ainsi leur analyse de façon plus pertinente par rapport à des cultures primaires dérivées de biopsies de patients et validant l'utilisation de ce modèle cellulaire.

Dans ce contexte, dans la première partie de mon travail de thèse, mon objectif a été de mettre au point des conditions de culture permettant la différenciation des cellules hES normales et mutantes vers le lignage neural afin d'obtenir des populations homogènes de progéniteurs neuraux et de cellules souches neurales, puis de les caractériser sur le plan phénotypique et fonctionnel. Par une étude transcriptomique, j'ai ensuite comparé le profil d'expression de ces progéniteurs neuraux à une autre population homogène de précurseurs mésenchymateux. J'ai ainsi identifié des gènes et des voies de signalisation spécifiques à chacune de ces populations. (Article 1).

Dans la seconde partie de mes travaux, ma contribution au projet de modélisation pathologique de DM1 a été d'utiliser ces progéniteurs neuraux et les cellules souches neurales mutés pour explorer les mécanismes physiopathologiques responsables des symptômes neurologiques observés dans cette pathologie. J'ai ainsi identifié une anomalie dans une voie de signalisation cellulaire perturbée, la voie la voie mTORC1, basée sur l'observation selon laquelle les cellules NSC porteuses de la mutation DM1 proliféraient plus lentement que les cellules contrôles (Article II). J'ai également étudié l'expression la protéine Tau, connue pour son implication dans la maladie d'Alzheimer, et mis en évidence des modifications suggérant une altération du transport axonal dans les neurones issus des lignées hES mutantes.

Ces résultats, associés à ceux réalisés dans l'équipe, permettent d'apporter la preuve de concept de l'intérêt d'un tel modèle cellulaire pour la modélisation pathologique des maladies monogéniques.

**Mots clés** : Cellules souches embryonnaires humaines, modélisation pathologique, Dystrophie Myotonique de type I, Progéniteurs neuraux, Cellules souches neurales